

## МЕТОД ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДИРОВАНИЯ В ОЦЕНКЕ ДЕЛИГАНДИЗИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ БИОСПЕЦИФИЧЕСКИХ СОРБЕНТОВ

*Е.В. Королик<sup>1</sup>, А.А. Иванов<sup>1</sup>, Н.И. Инсарова<sup>1</sup>, В.Г. Лещенко<sup>1</sup>, А.К. Королик<sup>1</sup>,  
В.В. Курковский<sup>1</sup>, А.А. Федоров<sup>2</sup>, В.П. Голубович<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Белорусский Государственный Медицинский Университет, г. Минск, Беларусь

E-mail: elena\_korolik@mail.ru

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь

The paper describes the analysis of the deliganding ability of biospecific sorbents for removing LDL and VLDL from the blood plasma of patients with dyslipidemia. Fluorescence sensing was used during the bench tests. It is shown that the most effective biospecific antilipoprotein hemosorbents were sorbents based on polyethylene matrix modified radiation grafting of acrylic acid with chitosan ligands.

**Целью работы** является использование метода флуоресцентного зондирования для оценки сорбционных свойств новых биоспецифических сорбентов на основе модифицированных матриц полиэтилена, разработанных сотрудниками ИБОХ НАН Беларуси, и широко применяемого в клинике гемосорбента - DALI, предназначенных для удаления липопротеинов низкой (ЛПНП) и очень низкой плотности (ЛПОНП) у пациентов с дислипидемией

**Материалы и методы.** В работе были исследованы сорбционные свойства новых биосорбентов, полученных на основе полиэтиленовой матрицы (гранулы размером 1,5×3,0 и 3,0×5,0 мм), модифицированной радиационной прививкой акриловой кислоты (ПЭ-ПАК). В качестве лигандов были использованы три аминокислоты (бензиловый эфир L – фенилаланина, ацетил L– лейцина и метиловый эфир нитро – L – аргинина) и хитозан.

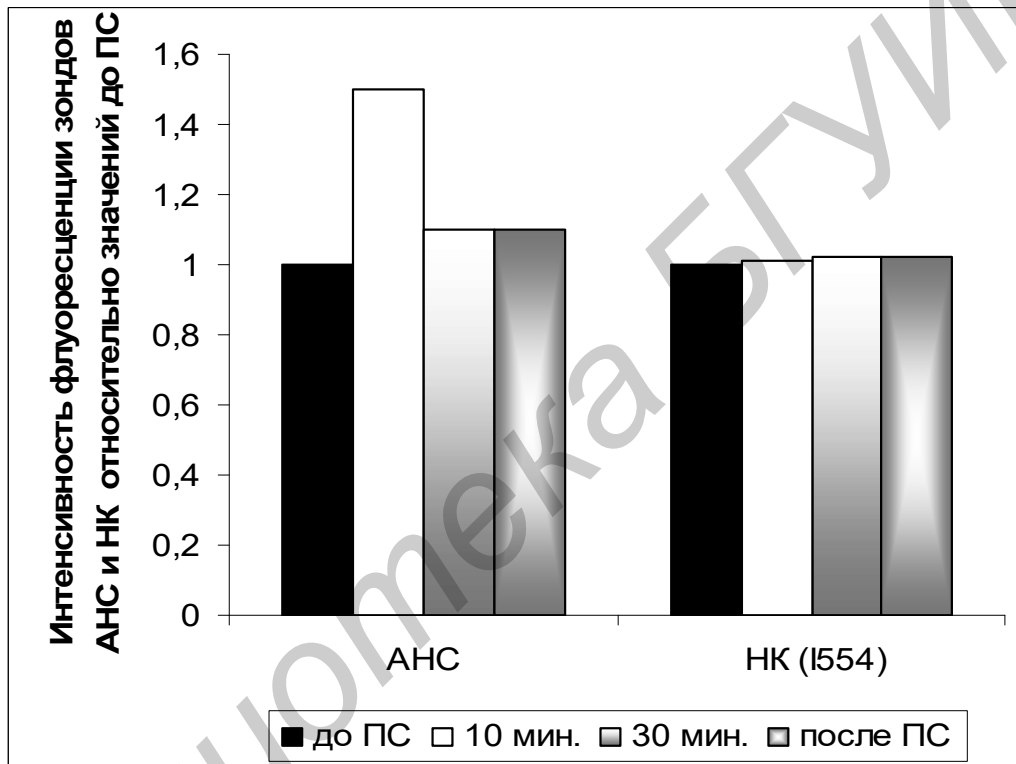
Для моделирования процесса плазмсорбции вне организма были проведены стендовые опыты на плазме крови больных с дислипидемией с использованием полученных сорбентов. Образцы плазмы отбирались до начала проведения стендовых опытов, на 10-ой и 30-ой минуте сорбции и после окончания проведения опытов. Условия перфузии были максимально приближены к ситуациям, имеющим место в процессе проведения гемосорбции в реальных клинических условиях.

Для оценки сорбционных свойств полученных биоспецифических сорбентов в условиях стендовых опытах были использованы гидрофобные флуоресцентные зонды: анионный – 8-анилино-нафталин-1 - сульфонат (АНС) и нейтральный – Нильский красный (НК) [1]. Спектры зондовой флуоресценции регистрировались на спектрофлуориметре SFL-1211A (фирма «СОЛАР», Минск, Беларусь). Интенсивности флуоресценции зондов АНС и НК были измерены при комнатной температуре. В случае зонда НК регистрировались спектры флуоресценции в режиме синхронного сканирования по длинам волн возбуждения и эмиссии при постоянной разности между ними  $\Delta\lambda=15$  нм. Методика проведения эксперимента подробно была описана в работе [2].

**Результаты.** Известно [1-3], что спектр синхронного сканирования флуоресцентного зонда НК в плазме крови здорового донора состоит из 2-х хорошо разрешенных полос при 554 и 592 нм. Для уточнения отнесения указанных выше полос нами были исследованы спектры синхронного сканирования флуоресценции зонда НК в растворах модельных соединений - ЛПНП, ЛПНОП и альбумина. Показано, что в спектре флуоресценции НК в плазме крови интенсивность при 554 нм в основном определяется суммарным содержанием ЛПНП (максимум при 554 нм) и ЛПОНП (максимум при 562), а интенсивность полосы при 592 нм – содержанием альбумина. Кроме того нами была проанализирована зависимость интенсивности флуоресценции зонда НК ( $I_{554}$ ) от

содержания холестерина (ЛПНП+ЛПОНП) в плазме крови пациентов с дислипидемией и показано, что наблюдается прямолинейная зависимость между интенсивностью флуоресценции зонда НК ( $I_{554}$ ) и содержанием холестерина (ЛПНП+ЛПОНП) [2]. Это позволило проводить оценку изменения содержания атерогенных липопротеинов у пациентов с дислипидемией при гемосорбции с помощью интенсивности флуоресценции зонда НК при 554 нм.

Анализ спектров флуоресценции зонда НК в условиях стендового эксперимента перфузии плазмы крови пациента с дислипидемией через колонку с биоспецифическим сорбентом (ПЭ-ПАК-три аминокислоты) на мелких гранулах показал, что интенсивность флуоресценции зонда НК при 554 нм остается практически неизменной на протяжении всего времени эксперимента (Рисунок 1).



**Рисунок 1** – Влияние процесса плазмосорбции на флуоресцентные параметры зондов АНС и НК в плазме крови пациента с дислипидемией (биосорбент – ПЭ (гранулы 1,5×3 мм) - ПАК - три аминокислоты)

Поскольку в спектре синхронного сканирования интенсивность флуоресценции  $I_{554}$  линейно зависит от суммарного содержания ЛПНП и ЛПОНП, то можно предположить, что полученный гемосорбент практически не удаляет из плазмы крови липопротеины низкой и очень низкой плотности. В то время как, согласно рисунку 1, рассматриваемый сорбент, по данным флуоресцентного зонда АНС, достаточно эффективно удаляет из плазмы крови анионные гидрофобные лиганды. Вывод о сохранении липопротеинового состава в плазме крови в процессе плазмосорбции подтверждается и данными биохимического анализа, которые приведены в таблице 1.

Такой же подход был использован в работе с целью оценки сорбционных свойств биосорбента (ПЭ-ПАК-хитозан, гранулы 3,0×5,0мм). Показано, что данный сорбент удаляет из плазмы крови ЛПНП и ЛПОНП примерно на 34% на протяжении всего времени эксперимента (по данным флуоресцентного зонда НК и биохимического анализа).

Таблица 1 - Изменения основных биохимических показателей плазмы крови пациента с дислипидемией в процессе плазмасорбции на сорбенте (ПЭ-ПАК-три аминокислоты, гранулы 1,5×3,0 мм)

Плазмасорбция	Триглицериды, ммоль/л	Лipoproteины высокой плотности, ммоль/л	Лipoproteины низкой плотности, ммоль/л	Лipoproteины очень низкой плотности, ммоль/л
До ПС	2,43±0,03	0,68±0,01	2,54±0,02	1,10±0,01
10-ая минута ПС	2,40±0,02	0,61±0,06	2,47±0,02	1,03±0,01
30-ая минута ПС	2,41±0,03	0,72±0,03	2,46±0,04	1,08±0,02
После ПС 60-ая минута	2,42±0,07	0,66±0,04	2,50±0,06	1,09±0,01

Для сравнения в работе была проведена оценка сорбционной эффективности сорбента DALI (фирма «Fresenius», Германия), который широко используется в клинике для удаления из плазмы крови ЛПНП и ЛПОНП. Регистрация спектров синхронного сканирования зонда НК осуществлялась в образцах плазмы, взятых до, на 10, 20 –ой минутах и после проведения стендового опыта. Полученные результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Значения биохимических показателей и флуоресцентных параметров зонда НК в образцах плазмы крови пациента с дислипидемией, полученных в процессе стендовых опытов с использованием сорбента DALI

Плазмасорбция	C <sub>сач</sub> г/л	ЛПНП ммоль/л	ЛПОНП, ммоль/л	ЛПНП+ ЛПОНП, ммоль/л	Параметры флуоресцентного зонда НК	
					I <sub>554</sub>	I <sub>592</sub>
До	36,5	4,31	0,69	5,0	273,3	186,2
10 мин.	32,7	3,64	0,81	4,64	260,1	178,7
20 мин.	31,4	2,93	0,88	3,81	228,8	170,2
После-60мин	29,0	0,41	0,76	1,17	109,2	186,6

Как видно из таблицы, по данным биохимического анализа указанный сорбент снижал содержание суммы липопротеинов низкой и очень низкой плотности в эксперименте на ~ 77 % от исходного значения. По данным флуоресценции зонда НК использование сорбента DALI приводило к уменьшению указанного выше флуоресцентного показателя – I<sub>554</sub> ~ 60 % от исходного значения.

Таким образом, используя метод флуоресцентного зондирования можно проводить оценку эффективности разрабатываемых сорбентов, предназначенных для удаления липопротеинов низкой и очень низкой плотности из плазмы крови пациентов.

### Литература

1. **Korolik, E V.** The Fluorescent Probing Method in the Estimation of the Functional Probabilities of the Blood Plasma Transport Systems. / E V. Korolik, E.A. Korolenko, F.I. Kazakov, A.K. Korolik, V.V. Kirkovskij // NONLINEAR PHENOMENA IN COMPLEX SYSTEMS. 2011. Vol. 14, № 3, p. 290 -294.

2. **Короленко, Е.А.** Применение спектральных методов для исследования структурно-функционального состояния основных транспортных белков плазмы крови пациентов с ишемической болезнью сердца и лакунарным инфарктом головного мозга. / Е.А. Короленко, Е.В. Королик, А.Э. Дикевич, А.К. Королик, В.В. Кирковский // Новости медико-биологических наук, Т.7, №1, 2013, с. 18.

3. **Ivanov, A.I.** Fluorescent probing of the ligand-binding ability of blood plasma in the acute-phase response / A. I. Ivanov, V.B. Gavrillov, D. A. Furmanchuk [et al.] // Clin. Exp. Med. – 2002. – V.2. – P.147–155