

ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗЫВАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ АЛЬБУМИНА МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДИРОВАНИЯ И ЭЛИМИНАЦИИ ГИДРОФОБНЫХ СУБСТАНЦИЙ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПЛАЗМОСОРБЦИИ

*Ф.И. Казаков¹, Е.В. Королик^{1,2}, А.А. Иванов¹, Н.И. Инсарова¹, В.Г. Лещенко¹,
А.К. Королик¹, В.В. Кирковский¹*

¹Белорусский Государственный Медицинский Университет, пр. Дзержинского, 83, БГМУ, 220116, г. Минск, Беларусь, тел. +375 17 2725287, E-mail: kazakovf@rambler.ru

²Институт физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси пр. Независимости, 68, 220072, г. Минск, Беларусь, тел. +375 17 2841687, E-mail: korolik@dragon.bas-net.by

Abstract. Informative approach to assess the severity of endogenous intoxication syndrome is the method of fluorescent probes. The principle of the method is to evaluate the parameters of the binding of hydrophobic fluorescent probes plasma albumin. For effective implementation of the necessary hemoperfusion selection uncoated hemosorbent capable of removing from blood the hydrophobic metabolites. Study deligand ability of uncoated coal hemosorbents for plazmaperfusion stand with blood plasma of patients with cirrhosis of the liver, done using the method of fluorescent probes.

Чрезвычайно информативным подходом для оценки степени выраженности синдрома эндогенной интоксикации (СЭИ) пациента, а так же для диагностики эффективности проведенной гемокарбоперфузии и выбора наиболее оптимального для конкретной клинической ситуации угольного гемосорбента, обладающего способностью удалять из крови гидрофобные метаболиты, является тестирование изменений связывающей способности основных транспортных белков крови, определяемое с помощью метода флуоресцентного зондирования [1,2]. Этот метод является наиболее перспективным для изучения процесса функционирования белков плазмы крови при СЭИ, для выяснения молекулярных механизмов патогенеза различных заболеваний. Принцип метода заключается в оценке параметров связывания разнозаряженных гидрофобных флуоресцентных зондов с транспортными белками плазмы. Основное значение в связывании с белками играет заряд молекулы низкомолекулярных гидрофобных лигандов: анионные преимущественно сорбируются альбумином, их можно анализировать с помощью флуоресцентного зонда с анионным зарядом: – 8–анилино–нафталин–1–сульфонат (АНС). Поскольку связывание анионного гидрофобного лиганда билирубина – одна из самых важных функций альбумина в плазме крови [3], то в данном исследовании был использован флуоресцентный зонд АНС, который в цельной плазме связывается, в основном, с альбумином.

Одно из основных преимуществ методики гемокарбоперфузии состоит в способности непокрытых угольных гемосорбентов удалять с поверхности транспортных белков и мембран форменных элементов гидрофобные вещества, нерастворимые в воде. Делигандизация этих структур приводит к ряду позитивных эффектов, таких как улучшение реологических свойств крови, повышение чувствительности к лекарственным препаратам, иммунокоррекции и др.

Цель работы – исследование делигандизирующей способности непокрытых углеродных гемосорбентов по изменению связывающей способности альбумина (ССА) плазмы крови пациентов с циррозом печени в ходе проведения стендовых опытов с использованием метода флуоресцентного зондирования и данных биохимического анализа.

Материалы и методы. Для оценки эффективности и выбора оптимального из используемых в клинической практике углеродных гемосорбентов, были исследованы промышленные образцы гемосорбентов: «ВНИИТУ» (Россия); «ГСГД» (Украина); «КАРБОН» (Украина) и «ТЭТРА» (Россия).

Для объективной оценки сорбционных свойств углеродных гемосорбентов, был проведен ряд динамических стендовых экспериментов моделирования гемосорбции по уни-

фицированной методике с перфузией плазмы (ПП) крови больных циррозом печени (ЦП) через микромассообменник с указанными выше сорбентами. Условия эксперимента были максимально приближены к характеристикам ГС в реальных клинических условиях. Параметры стендового опыта: объем плазмы - $250,0 \pm 5,0$ мл; скорость перфузии - 12 ± 1 мл/мин; режим перфузии - рециркуляция; время сорбции - $60 \pm 0,5$ мин; объем сорбента в микроколонках - 15 мл и 30 мл; общий объем перфузированной плазмы - 720 ± 10 мл.

Образцы плазмы отбирались в начале эксперимента, на 20 минуте сорбции (соответствует 1,0 ОЦП) и после окончания проведения опыта (соответствует 3,0 ОЦП) из приводящей и отводящей магистралей до и после колонки. В образцах определялись следующие биохимические показатели: общий белок, альбумин, билирубин и его фракции, средние молекулы (СМ). ССА изучали по данным пиковой интенсивности флуоресценции зонда АНС - I_{АНС} и интенсивности флуоресценции зонда АНС, нормированной на единицу молярной концентрации альбумина - I_n. С каждым образцом гемосорбента выполнено по 10 стендовых опытов.

В работе был использован гидрофобный флуоресцентный зонд – 8-анилинонафталин-1-сульфонат (АНС) («Реахим», Москва, Россия). Спектр флуоресценции зонда АНС в плазме крови регистрировался в области частот 400-650 нм при длине волны возбуждения 370 нм на спектрофлуориметре SFL-1211А («СОЛАР», Минск, Беларусь).

Результаты. Альбумин является основным транспортным белком, связывающим анионный флуоресцентный зонд АНС в плазме крови. Интенсивность флуоресценции зонда зависит как от концентрации альбумина в плазме крови, так и от его загруженности метаболитами и ксенобиотиками. При высокой концентрации альбумина и большой загруженности его гидрофобными лигандами интенсивность флуоресценции АНС может быть низкой. В этой связи, для объективизации данных, нами было предложено использовать параметр интенсивности флуоресценции зонда АНС - I_{АНС}, приведенный и нормированный на единицу молярной концентрации альбумина - I_n.

В таблице 1 представлены результаты тестирования ССА в образцах плазмы крови больных ЦП с использованием флуоресцентного зонда АНС при проведении стендовых экспериментов на различных углеродных сорбентах.

Как видно из таблицы 1, увеличение ССА отмечается лишь при исследовании таких гемосорбентов как «ГСГД» и «КАРБОН». При этом ПП через гемосорбент «ГСГД» приводит к незначительному увеличению как пиковой I_{АНС}, так и нормированной I_n на 20 минуте после колонки и к моменту окончания стендового опыта. Следует отметить повышение значения I_n на 20 минуте проведения ПП через гемосорбент «КАРБОН» после колонки на 24 %. Флуоресцентный параметр I_n увеличивается на протяжении всей ПП: на 20 минуте до колонки на 26 %, после колонки на 29 % и до 34 % к моменту окончания ПП. Таким образом, происходит эффективное очищение поверхности сывороточного альбумина от широкого спектра отрицательно заряженных гидрофобных метаболитов.

Следует отметить тот факт, что по данным биохимического анализа, сорбционная емкость гемосорбента «КАРБОН» в отношении СМ достоверно превышает этот показатель у других исследованных образцов гемосорбентов. Так после окончания сорбции отмечено снижение концентрации этого метаболита на 54% от исходного уровня. Анализ данных по динамике изменений общего билирубина в течение ПП через сорбент «КАРБОН» указывает на процессы перераспределения этого метаболита между плазмой и сорбентом: момента насыщения сорбента билирубином не происходит до конца ПП. Элиминация билирубина из плазмы к окончанию ПП достоверно достигает 24 %.

Таблица 1 - Изменения флуоресцентных показателей зонда АНС в плазме крови пациентов с циррозом печени при проведении стендовых экспериментов на различных углеродных сорбентах

Показатели	до ПП	20' до колонки	20' после колонки	после ПП
ВНИИТУ				
I _{АНС} , о.е.	94,5±1,7	98,4±1,8	93,2±1,6	97,2±1,8
I _п , о.е./мкМ/л	24,8±2,1	28,8±2,3	27,5±2,3	26,0±2,2
ГСГД				
I _{АНС} , о.е.	94,5±1,7	94,6±1,6	99,4±1,8*	100,6±1,8*
I _п , о.е./мкМ/л	24,8±2,1	24,8±2,1	30,8±2,4*	26,9±2,2
ТЕТРА				
I _{АНС} , о.е.	94,5±1,7	91,4±1,6	96,6±1,8	91,8±1,6
I _п , о.е./мкМ/л	24,8±2,1	26,0±2,2	26,7±2,2	25,0±2,1
КАРБОН				
I _{АНС} , о.е.	94,5±1,7	106,2±1,9*	108,0±1,9*	117,0±2,0*
I _п , о.е./мкМ/л	24,8±2,1	31,3±2,4*	31,9±2,4*	33,2±2,4*

- отмечается достоверное изменение показателей, $p < 0,05$

Экспериментальная ПП с гемосорбентом «КАРБОН» по унифицированной методике была выполнена и с двукратным увеличением массы гемосорбента с 15 до 30 мл, с соблюдением всех условий ранее выполненных экспериментов. На 20 минуте до микроколонки, после микроколонки и после окончания ПП отмечен статистически значимый рост показателей ССА. На 20 минуте до колонки I_{АНС} составила 23 %, после массообменника уровень этого показателя увеличился до 42 %, а к моменту окончания опыта до 59 % по сравнению с начальными данными. При изучении флуоресцентного параметра I_п отмечены статистически значимые нарастающие значения этого показателя. На 20 минуте до микроколонки I_п составила 35 %, после колонки 49 %, к 60 минуте окончания ПП рост этого показателя составил 84 %.

Проведенный сравнительный анализ полученных биохимических данных и данных флуоресцентного зондирования показал, что гемосорбент «КАРБОН» не оказывает отрицательного влияния на основные показатели белкового метаболизма, проявляет наиболее выраженный сорбционный потенциал и делигандизирующее действие по отношению к различным классам гидрофобных и гидрофильных метаболитов.

Литература

- Короленко, Е.А.** Оценка методом флуоресцентного зондирования связывающей способности основных транспортных белков плазмы крови при циррозе печени. / Е.А. Короленко, Е.В. Королик, А.К. Королик, В.В. Кирковский //ЖПС. - 2007. - №4. - С.507-511.
- 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.
- Ландау, М.А.** Молекулярная природа отдельных физиологических процессов. - М.: Наука. 1985. – 259 с.