

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДИРОВАНИЯ ДЛЯ АНАЛИЗА СОРБЦИОННЫХ СВОЙСТВ БИОСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИЛИПОПРОТЕИНОВЫХ ГЕМОСОРБЕНТОВ

Е.В. Королик^{1,3}, В.П.Голубович², Д.А. Макаревич², Е.М. Ермола², Н.И. Инсарова³, В.Г. Лещенко³, А.К. Королик³, В.В. Курковский³

¹Институт физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси, пр.Независимости 68, 220072, г. Минск, Беларусь, E-mail: korolik@dragon.bas-net.by

²Институт биорганической химии НАН Беларуси, ул.Купревича 5, 220141, г. Минск, Беларусь,

³Белорусский Государственный Медицинский Университет, пр. Дзержинского 83, 220116, г. Минск, Беларусь

Abstract. 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 Ca²⁺ tartrate matrix with starch sulphate + pentapeptide and chitosan ligands.

Дислипидемия - аномально повышенный уровень липопротеинов в крови человека, связанный с различными патологическими состояниями организма и является как следствием, так и причиной различных заболеваний. В настоящее время доказана ведущая роль определенных классов липопротеинов – липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и очень низкой плотности (ЛПОНП) в патогенезе атеросклероза. Атеросклероз является причиной наиболее серьезных сердечно-сосудистых заболеваний. Коррекция нарушений липидного обмена – актуальная проблема практической медицины. В результате развития современной науки наиболее широкое распространение при коррекции дислипидемии получили методы эфферентной терапии, в частности, биоспецифическая гемосорбция. Она основана на избирательном извлечении из плазмы крови соединений, обуславливающих патологические проявления конкретных заболеваний. Это дало толчок к разработке нового класса гемосорбентов – биоспецифических или селективных. Такие сорбенты состоят из носителя – вещества, составляющего основу сорбента – матрицы и иммобилизованного на нем биоспецифического лиганда, который обеспечивает селективное извлечение из биологических сред токсических метаболитов. Использование различных гемосорбентов направленного действия связано с рядом проблем, главным из которых является неприемлемо высокая стоимость импортных сорбентов и отсутствие их промышленного производства в Беларуси. Это послужило поводом для проведения работ по созданию биоспецифического сорбента, способного извлекать из крови липопротеины низкой и очень низкой плотности, и разработке объективного метода контроля его эффективности.

Одним из важнейших показателей гомеостаза является функциональное состояние основных транспортных белков плазмы крови, связывающая способность которых может претерпевать изменения при заболеваниях. К важнейшим транспортным белкам плазмы крови относятся сывороточный альбумин человека (САЧ) и липопротеины, которые отличаются друг от друга не только структурой, но и различной степенью сродства к определенным видам низкомолекулярных лигандов и обладают относительной специфичностью в связывании разнозаряженных лигандов. Для оценки связывающей способности основных транспортных белков плазмы крови используется метод флуоресцентного зондирования, основанный на оценке параметров связывания гидрофобных флуоресцентных зондов с этими белками [1-2].

Целью данной работы является оценка сорбционных свойств биоспецифических сорбентов на основе Ca²⁺ виннокислой матрицы с различными лигандами, предназначенных для удаления ЛПНП и ЛПОНП у пациентов с дислипидемией методом флуоресцентного зондирования с использованием зонда Нильского красного (НК).

Материалы и методы. В данной работе были исследованы сорбционные свойства биосорбентов, полученных на основе Ca^{2+} виннокислой матрицы с различными лигандами. В качестве лигандов были использованы: гепарин; крахмал сульфат; крахмал сульфат+тетрапептид; крахмал сульфат+пентапептид; хитозан. Все образцы сорбентов были синтезированы в лаборатории прикладной биохимии Института биоорганической химии НАН Беларуси

При проведении стендовых опытов, моделирующих экстракорпоральный метод детоксикации – плазмсорбцию вне организма больного, использовалась плазма пациентов с заведомо высоким уровнем общего холестерина. В ходе стендовых опытов 250 мл плазмы пропускать через колонку с сорбентом и с помощью перистальтического насоса (аппарат МД73М) по замкнутому контуру и возвращалось в пластиковый мешок. Сорбция проводилась в режиме рециркуляции в течение 60 минут со скоростью перфузии 18 мл в минуту. Образцы плазмы отбирались до начала проведения опытов, и после окончания проведения опытов. Объем колонки с гемосорбентом – 10 мл.

Для всех исследованных образцов плазмы крови был проведен биохимический анализ крови на содержание альбумина, общего холестерина, триглицеридов и холестерина липопротеинов различной плотности.

Для оценки сорбционных свойств полученных биоспецифических сорбентов в условиях стендовых опытах был использован гидрофобный флуоресцентный зонд – НК. Спектры зондовой флуоресценции регистрировались на спектрофлуориметре SFL-1211A («СОЛАР», Минск, Беларусь).

Результаты. В нефракционированной плазме крови зонд НК распределяется между сывороточными липопротеинами и альбумином, поэтому для регистрации спектров флуоресценции зонда НК был использован метод синхронного сканирования. Основная идея этого метода базируется на известном факте зависимости между максимумами спектров поглощения и спектров флуоресценции для флуорофоров и описывается теорией Стоксова сдвига. Для большинства флуорофоров величина Стоксова сдвига лежит в пределах от 15 нм до 40 нм. Используя этот факт, можно описывать флуоресценцию многокомпонентных систем с помощью спектра синхронного сканирования - одновременное изменение длины волны возбуждения и регистрации при постоянной разности между ними. Такая запись спектра флуоресценции значительно уменьшает спектральное перекрытие полос и упрощает анализ многокомпонентных смесей без их разделения. В нашем случае такая запись спектров флуоресценции позволила четко выделить две полосы флуоресценции, обусловленные липопротеин – связанным ($\lambda = 554$ нм) и альбумин – связанным ($\lambda = 592$ нм) зондом НК. При этом было показано, что интенсивность при 554 нм в основном определяется суммарным содержанием ЛПНП и ЛПОНП, а при 592 нм – фракцией альбумина [2]. Поэтому изменение содержания липопротеинов низкой и очень низкой плотности в плазме крови пациентов можно контролировать с помощью интенсивности флуоресценции зонда НК при 554 нм.

Анализ спектров флуоресценции зонда НК в условиях стендового эксперимента перфузии плазмы крови больного с дислипидемией через колонки с указанными выше биоспецифическими сорбентами (таблица 1) показал, что интенсивность флуоресценции зонда НК при 554 нм на 60-ой мин. сорбции уменьшается для всех исследованных сорбентов по сравнению со значением до начала эксперимента. Поскольку в спектре синхронного сканирования интенсивность флуоресценции I_{554} линейно зависит от суммарного содержания ЛПНП и ЛПОНП, то это позволило нам оценить эффективность каждого сорбента по удалению из плазмы крови липопротеины низкой и очень низкой плотности. Наиболее эффективным оказался сорбент IV (снижение содержание ЛПНП+ЛПОНП к концу эксперимента ~ на 30%). Наименее эффективный - сорбент I (~ на 11,2%). Сорбенты II и III по эффективности занимают промежуточное положение и уменьшают содер-

жание ЛПНП+ЛПОНП к концу эксперимента ~ на 26,2 и 25,8%, соответственно. По данным биохимического анализа (таблица 1) наблюдается такая же закономерность по эффективности исследованных сорбентов на предмет удаления ЛПНП и ЛПОНП. Следует отметить, что только сорбент I не изменяет содержания альбумина во время сорбции.

Таблица 1 – Значения биохимических показателей и флуоресцентных параметров зонда НК в образцах плазмы крови пациента с дислипидемией, полученных в процессе стендовых опытов

| Плазмосорбция | С(сач), г/л | ЛПНП ммоль/л | ЛПОНП, ммоль/л | ЛПНП+ЛПОНП, ммоль/л | Параметры флуоресцентного зонда НК | | |
|--|-------------|--------------|----------------|---------------------|------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| | | | | | I ₅₅₄ ^{o.e.} | I ₅₉₂ ^{o.e.} | I ₅₅₄ / I ₅₉₂ |
| Сорбент I (Ca²⁺ виннокислый + гепарин) | | | | | | | |
| до | 38,4±1,5 | 1,86±0,27 | 1,24±0,06 | 3,10±0,27 | 50,0±1,7 | 55,8±1,7 | 0,89 |
| После 60 мин. | 35,8±1,5 | 1,73±0,27 | 0,89±0,06 | 2,62±0,27 | 44,4±1,7 | 53,4±1,7 | 0,83 |
| Сорбент II (Ca²⁺ виннокислый + крахмал сульфат) | | | | | | | |
| до | 38,4±1,5 | 1,86±0,27 | 1,24±0,06 | 3,10±0,27 | 50,0±1,8 | 55,8±1,8 | 0,89 |
| После 60 мин. | 18,6±1,5 | 0,99±0,27 | 0,73±0,06 | 1,72±0,27 | 36,9±1,8 | 51,7±1,8 | 0,71 |
| Сорбент III (Ca²⁺ виннокислый + крахмал сульфат + тетрапептид) | | | | | | | |
| до | 38,4±1,5 | 1,86±0,27 | 1,24±0,06 | 3,10±0,27 | 50,0±1,6 | 55,8±1,6 | 0,89 |
| После 60 мин. | 26,5±1,5 | 0,89±0,27 | 0,80±0,06 | 1,69±0,27 | 37,3±1,6 | 46,7±1,6 | 0,79 |
| Сорбент IV (Ca²⁺ виннокислый + крахмал сульфат + пентапептид) | | | | | | | |
| до | 38,4±1,5 | 1,86±0,27 | 1,24±0,06 | 3,10±0,27 | 50,0±1,8 | 55,8±1,8 | 0,89 |
| После 60 мин. | 26,7±1,5 | 0,69±0,27 | 0,73±0,06 | 1,42±0,27 | 34,7±1,8 | 48,6±1,8 | 0,71 |

Анализ спектров флуоресценции зонда НК в условиях стендового эксперимента перфузии плазмы крови больного с дислипидемией через колонки с новым биоспецифическим сорбентом на основе Ca²⁺ виннокислой матрицы с хитозаном в качестве лиганда показал снижение содержания ЛПНП+ЛПОНП к концу эксперимента ~ на 27% (эксперимент повторялся 5 раз). Следует отметить, что данный гемосорбент по своей эффективности сравним с гемосорбентом IV (Ca²⁺ виннокислый + крахмал сульфат + пентапептид).

Впервые была проведена оценка делигандизирующей функции биоспецифических сорбентов, предназначенных для удаления ЛПНП и ЛПОНП из плазмы крови пациентов методом флуоресцентного зондирования в ходе проведения стендовых опытов. Показано, что наиболее эффективными биоспецифическими антилипопротеиновыми гемосорбентами оказались сорбенты на основе Ca²⁺ виннокислой матрицы, лигандами которых являются крахмал сульфат+пентапептид и хитозан.

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. 18-22.