

В. В. Кирковский¹, К. Г. Бурдашкина¹, Г. Н. Бычко¹, А. П. Власов², Д. Н. Садовский³

ОЦЕНКА БЕЛКОВО-ПЕПТИДНОГО ГОМЕОСТАЗА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ ПРИ СОСТОЯНИЯХ, СОПРОВОЖДАЮЩИХСЯ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИЕЙ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»¹,

ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий»²,

УЗ «9 городская клиническая больница»³

В статье приведены данные по эффективности исследования молекулярно-массового распределения белков и пептидов, определения уровня средних молекул методами колоночной гель-хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии для оценки характера динамики и диагностики патологического процесса при состояниях, сопровождающихся симптомами эндогенной интоксикации. Подобраны оптимальные условия хроматографического фракционирования белково-пептидных компонентов плазмы крови с проведением сопоставительного анализа хроматографических методов. Дана оценка молекулярно-массовому распределению белково-пептидных компонентов в плазме крови в норме и при патологических состояниях, нарушающих функциональное состояние почек при острой почечной недостаточности и хронической болезни почек. Рассмотрена возможность дальнейшего изучения белково-пептидного гомеостаза в плазме крови при патологических состояниях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Ключевые слова: гель-хроматография, эндогенная интоксикация, молекулярно-массовое распределение, «средние молекулы».

V. V. Kirkovsky, K. G. Burdashkina, G. N. Bychko, A. P. Vlasov, D. N. Sadovsky

PROTEIN-PEPTIDE HOMEOSTASIS ESTIMATION IN BLOOD PLASMA IN PATIENTS WITH ENDOGENOUS INTOXICATION STATES

Data about efficiency of the molecular weight distribution of proteins and peptides study, middle molecule level determination with column gel chromatography and high performance liquid chromatography were presented in the work to assess the dynamics nature and the pathological process diagnosis in the states with endogenous intoxication signs. Optimal chromatographic fractionation conditions of protein-peptidic components of blood plasma with a comparative analysis of chromatographic methods were reviewed. The molecular weight distribution of protein-peptidic components in plasma in normal and pathological conditions to affect the functional status of the kidney in patients with acute renal failure and chronic kidney disease was assessed. The possibility of further protein-peptidic homeostasis study in plasma under pathological conditions by high performance liquid chromatography was reviewed.

Key words: gel chromatography, endogenous intoxication, molecular weight distribution, «middle molecules».

Критические состояния, сопровождающиеся развитием синдрома эндогенной интоксикации (ЭИ) и часто осложненные полиорганной недостаточностью, требуют оперативной и объективной оценки состояния пациента. Это необходимо как для своевременного включения в терапию экстракорпоральных методов детоксикации и гемокоррекции, так и контроля эффективности их проведения.

В настоящее время не вызывает сомнений тот факт, что пептиды группы «средних молекул» (СМ) являются интегральными маркерами эндогенной интоксикации и, по мнению многих авторов [1, 2, 5, 6], наиболее объективно отражают выраженность ЭИ и ее динамику. В норме эти вещества, в среднем, определяются в жидкостных средах организма (плазма, сыворотка, ликвор, моча) в концентрации 0,35 г/л, и только при развитии патологического процесса, формирующихся тяжелых нарушений обменных процессов, кардинального извращения метаболических реакций их уровень возрастает многократно, коррелируя с тяжестью заболевания.

Существует несколько базовых методов экспресс-диагностики уровня пептидемии [8, 9] и многочисленные их модификации, создаваемые с целью повышения точности, информативности и оперативности определения этого показателя [3, 7].

Тем не менее, до настоящего времени наиболее точным методом оценки уровня пептидных эндотоксинов является хроматографическое фракционирование биологических жидкостей с использованием колоночной хроматографии на носителях типа сефадекса. Этот метод позволяет осуществлять разделение высокомолекулярных соединений от средне- и низкомолекулярных компонентов.

При всех своих достоинствах данный метод, тем не менее, не лишен одного существенного недостатка – длительность

проведения процедуры. Весь процесс хроматографического разделения биообразца (в зависимости от выбранной марки носителя, высоты колонки, гидростатического давления), начиная от заготовки плазмы или сыворотки, подготовки их к работе – нанесение на колонку, элюирование, сбор фракций и измерение их оптической плотности, оценки полученного результата, – в среднем, занимает порядка 7–8 часов.

В современных условиях, с развитием технического прогресса и созданием методов для аппаратного выполнения клинических анализов, кажется перспективным создание оперативного, сочетанного метода диагностики эндотоксемии по изменению характера молекулярно-массового распределения белков, продуктов их ограниченного протеолиза и определения концентрации пептидов группы СМ при патологических состояниях, сопровождающихся симптоматикой ЭИ.

Материалы и методы. В работе использовали пул донорской плазмы, полученный из трех образцов крови практических здоровых людей. Кровь заготавливали на цитратном консерванте в соотношении 1:9, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 20 мин. Плазму отделяли от эритроцитов, смешивали, замораживали и хранили при -18°C в течение не более двух недель.

Для разделительной гель-хроматографии использовали колонку размером 700×14 мм, в которую упаковывали СефадексG-50 Fine и уравнивали элюирующим буфером (0,14 М хлорид натрия или 0,13 М хлорид натрия в 0,01 М трис-ОН, pH 7,8). 1,5 мл плазмы или сыворотки разводили равным объемом элюирующего раствора для снижения вязкости [4] и наносили на стартовую границу колонки. Элюцию вели стартовым буфером. Фракции собирали в объеме 3,0 мл и спектрофотометрировали при длинах волн 230 нм и 280 нм. Измерение вели против контроля – элюирующего раствора. Диаграмму элюирования

строили, откладывая на оси ординат полученные величины оптической плотности ($ОП_{230, 280}$), а по оси абсцисс – относительную величину V_e/V_0 (отношение объема выхода исследуемого вещества к свободному объему) для сопоставления результатов, полученных в различных экспериментах. Это соотношение не зависит от геометрии колонки. В случае гель-хроматографического разделения образцов на одной колонке, на оси абсцисс откладывали номера фракций. Колонки перед началом работы калибровались альбумином (69000 Да), витамином B_{12} (1355 Да), триптофаном (204 Да), в качестве контрольного образца использовали донорскую плазму (рисунок 1).

Количественное определение содержания СМ проводили по формуле:

$$СМ, г/л = ОП : 3,$$

где ОП – сумма оптических плотностей точек, составляющих пик выхода СМ, 3 – коэффициент перерасчета в г/л, рассчитанный по выходу ангиотензина.

Сопоставительный анализ хроматографического фракционирования пула донорской плазмы был проведен также на хроматографе «АКТАpurifier, GEHealthcareСША» разделение проводили на колонке Superdex75 10/300 GL, пределы эксклюзии которой включали белки и пептиды с молекулярной массой (ММ) в диапазоне 300–70000 Да и стабильностью по рН в области 3,0–12,0. В качестве элюирующего раствора использовали буферную систему PBS (phosphatebufferedsaline), состоящую из 0,05 М фосфатного буфера и 0,15 М NaCl, рН 7,2.

Результаты и обсуждение. При оптимально подобранных условиях фракционирования (марка сефадекса, размер колонки, состав буфера, скорость элюирования, соответствующий подбор маркеров – белков и пептидов с известной молекулярной массой), как видно из данных рисунка 1, хроматограмма нативной плазмы или сыворотки здоровых доноров представляет собой три четко разделенных между собой, симметричных пика, по своему распределению напоминающие Гауссову кривую. Соотношение пиков и их геометрия не зависит от способа заготовки крови и получения ее жидкой компоненты (плазма или сыворотка).

Первый, высокомолекулярный пик, представлен в основном белками, второй, соотносится с пептидными компонентами и третий, небольшой по высоте – с аминокислотами (рисунок 1). Если предварительно откалибровать колонку веществами с точно известной молекулярной массой, приближенной к средним значениям ММ пептидных фрагментов (например, ангиотензином, ММ 1034 Да), то можно не только определить их молекулярную массу, но и с высокой достоверностью оценить количественный

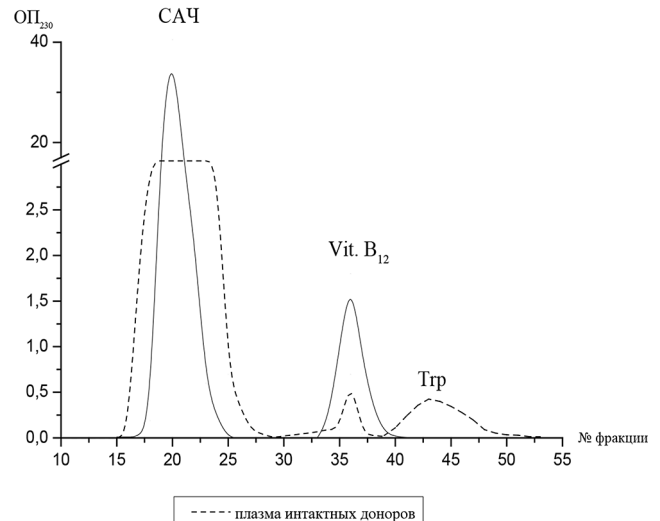


Рис. 1. Положение маркеров при калибровке колонки с Сефадексом G-50 Fine.

уровень пептидов группы СМ, а так же степень изменения стационарного состояния белково-пептидных комплексов при той или иной патологии на молекулярном уровне. Для иллюстрации изменения молекулярно-массового распределения биополимеров в зависимости от характера и стадии патологического процесса на рисунке 2 представлены хроматограммы пациентов с острой почечной недостаточностью (ОПН) и хронической болезнью почек (ХБП).

Молекулярно-массовое распределение белково-пептидных компонентов при патологических состояниях, нарушающих функциональное состояние почек в остром периоде заболевания, характеризуется резким изменением хроматографического профиля относительно распределения донорской плазмы. Объем выхода высокомолекулярных белков резко увеличивается, сдвигается вправо, четкость разделения с пептидными компонентами сохраняется, но высота узкого и симметричного пика значительно возрастает, что свидетельствует о гомогенности пептидов группы СМ по молекулярной массе; уровень СМ, рассчитанный по выходу ангиотензина составляет более 3,7 г/л.

При хроническом течении процесса, по мере прогрессирования почечной недостаточности (угасания экскреторной функции, снижения почечного кровотока) на хроматограмме регистрируется еще большее расширение высокомолекулярного пика

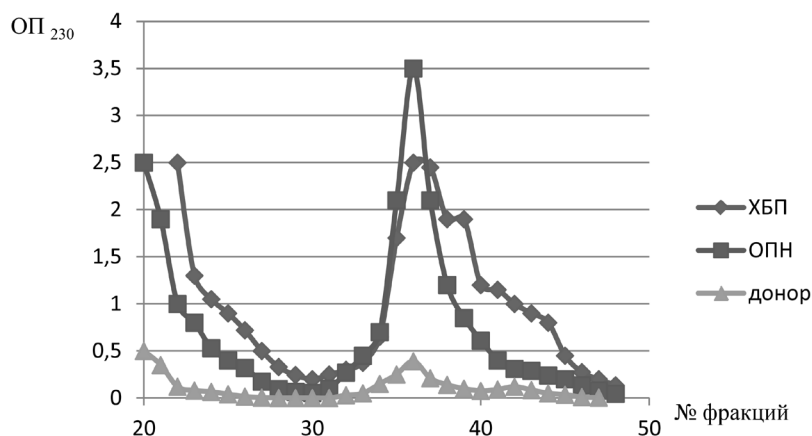


Рис. 2. Фрагменты гель-хроматограмм на сефадексе G-50 Fine плазмы крови пациентов М. – с ОПН (СМ, 3,7 г/л) и Б. – с ХБП, терминальная стадия (СМ, 2,97 г/л), донора (СМ, 0,38 г/л)

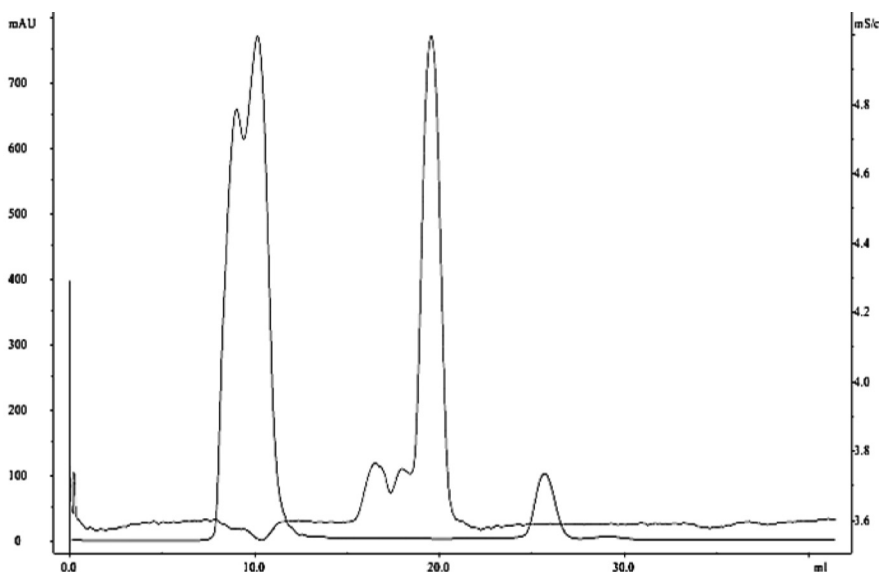


Рис. 3. Разделение пуловой донорской плазмы на колонке Superdex 75 10/300 GL методом ВЭЖХ

со сдвигом его вправо за счет появления белковых фрагментов с ММ меньшей, чем у альбумина. При этом пик СМ расширяется, теряет симметричность, выявляется дополнительное плечо справа, что, в свою очередь, свидетельствует о высокой степени гетерогенности пептидных фракций по ММ, концентрация СМ в этом случае составляет около 3 г/л. Очевидно, что при хроническом течении заболевании почек в процесс нарушения метаболизма белков включаются, вероятно, не только плазменные протеиназы, но и клеточные ферменты, значительно увеличивая концентрацию и расширяя спектр образующихся СМ по молекулярной массе.

Безусловно, хроматографическая оценка изменения молекулярно-массового распределения белково-пептидных компонентов и уровня пептидемии как показателя степени эндотоксемии при патологических состояниях, сопровождающихся тяжелыми нарушениями обменных процессов, высокоинформативна не только в плане диагностики, но и позволяет адекватно оценивать эффективность проводимых детоксикационных мероприятий. Однако длительность проведения данной процедуры снижает ценность метода для клинико-лабораторного анализа.

С целью сокращения времени, необходимого для выполнения данной процедуры фракционирования белково-пептидных компонентов биологических жидкостей, исследовали возможность хроматографического разделения пула донорской плазмы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием колонки Superdex 75 10/300 GL (рисунок 3). Плазму для этого эксперимента разводили в 5 раз элюирующим буфером. Вся процедура от момента пробоподготовки, нанесения образца и его разгонки и до получения результата занимает, в среднем, 40 мин. Детектирование осуществлялось при 280 нм.

Как следует из представленной хроматограммы (рисунок 3), при фракционировании донорской пуловой плазмы выявляется два четко выраженных и разделенных между собой пика. Выход высокомолекулярных белков регистрируется на 9–10 минуте, что хорошо согласуется с калибровочным графиком фирмы-изготовителя. Однако в отличие от картины хроматографического разделения плазмы на Сефадексе G-50 Fine, высокомолекулярный пик в случае ВЭЖХ, частично раздваивается, причем его левую часть можно соотнести с белками, ММ которых больше, чем у альбумина, а правый пик можно, согласно калибровке, отнести именно к альбумину. Это частичное разделение белков связано с более широким, чем у Сефадекса G-50 Fine пред-

лом эксклюзионной колонки Superdex 75 10/300 GL. Выход второго, небольшого по высоте и симметричного пика отмечается на 26 мин, что соответствует времени выхода маркера, витамина В₁₂ (ММ 1355 Да).

Таким образом, метод колоночной гель-хроматографии может с успехом использоваться для диагностики характера и динамики патологического процесса, тем не менее, в силу своей длительности и трудоемкости он не имеет возможности получить широкое распространение в клинической практике. В то же время, благодаря применению современного оборудования, соответствующих комплектующих для ВЭЖХ, значительно сокращается время проведения анализа молекулярно-массового распределения биологических жидкостей и уровня маркера эндотоксемии – пептидов группы СМ, что позволяет оценивать стационарное состояние белков и пептидов при патологических состояниях на более высоком, а именно, молекулярном уровне.

Литература

1. Владыка, А. С., Левицкий Э. Р., Поддубная Л. П., Габриэлян Н. И. Средние молекулы и проблема эндогенной интоксикации при критических состояниях различной этиологии // *Анестезиология и реаниматология*. – 1987. – № 2. – С. 17–19.
2. Габриэлян, Н. И., Левицкий Э. Р., Щербанева О. И. и др. Гипотеза средних молекул в практике клинической нефрологии // *Терапевтический архив*, 1983. – Т. 60. – № 6. – С. 76–78.
3. Гаврилов, В. Б., Бидула М. М., Фурманчук Д. А., Конев С. В., Алейникова О. В. Оценка интоксикации организма по нарушению баланса между накоплением и связыванием токсинов в плазме крови // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 1999. – № 2. – С. 13–17.
4. Детерман, Г. Гель-хроматография. Изд-во Мир, М. 1970. – 251 с.
5. Карякина, Е. В., Белова С. В. Молекулы средней массы как интегральный показатель метаболических нарушений (обзор литературы) // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2004. – № 3. – С. 4–8.
6. Кирковский, В. В. Детоксикационная терапия при перитоните: Методическое руководство для врачей и студентов. – Мн.: «Полифакт – Альфа», 1997. – 200 с.
7. Малахова, М. Я. Метод регистрации эндогенной интоксикации: методические рекомендации. – СПб, 1995. – 33 с.
8. Николайчик, В. В., Моин В. М., Кирковский В. В., Мазур Л. И., Лобачева Г. А. и др. Способ определения «средних молекул» // *Лабораторное дело*. – 1991. – № 10. – С. 13–18.
9. Скрининговый метод определения средних молекул в биологических жидкостях: Методические рекомендации / Габриэлян Н. И., Левицкий Э. Р., Дмитриев А. А. и др. – М., 1985. – 18 с.

Поступила 12.12.2014 г.