

УДК 535.371

## ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ТРАНСПОРТНОЙ СИСТЕМЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДИРОВАНИЯ И ЭЛИМИНАЦИИ ГИДРОФОБНЫХ СУБСТАНЦИИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИМ ГЕМОСОРБЦИИ

Е.В. КОРОЛИК, А.А. ИВАНОВ, Н.И. ИНСАРОВА, В.Г. ЛЕЩЕНКО, Ф.И. КАЗАКОВ\*,  
А.К. КОРОЛИК\*, В.В.КИРКОВСКИЙ\*

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

*\*Отделение экстракорпоральных методов детоксикации 9-ой ГКБ  
Семашко, 8, Минск, 220089, Беларусь*

*Поступила в редакцию 22 ноября 2016*

Приведены результаты исследования связывающей способности основных транспортных белков плазмы крови пациентов с циррозом печени методом флуоресцентного зондирования. Показано, что данный метод позволяет получать экспресс информацию о функциональном состоянии основных транспортных систем плазмы крови пациентов.

*Ключевые слова:* флуоресцентное зондирование, цирроз печени, сывороточный альбумин человека, липопроотеины,  $\alpha$ -1-кислый гликопротеин.

### Введение

Ряд тяжелых заболеваний, в том числе цирроз печени (ЦП), сопровождается развитием у больных синдрома эндогенной интоксикации в результате неконтролируемого высвобождения в жидкие среды организма продуктов липидного и белкового обмена. Многие биологические активные вещества, в том числе различные метаболиты, токсины, а также лекарственные препараты относятся к низкомолекулярным гидрофобным соединениям и транспортируются кровью в виде комплексов с белками. Наиболее адекватным и информативным подходом к диагностике эндогенной интоксикации является тестирование связывающей способности основных транспортных белков плазмы крови, осуществляющих сорбцию и перенос гидрофобных метаболитов и лекарственных препаратов в организме. К важнейшим транспортным системам крови относятся сывороточный альбумин человека (ЧСА), липопроотеины (ЛП) и  $\alpha$ -1-кислый гликопротеин (АГП), которые отличаются друг от друга не только структурой, но и различной степенью сродства к определенным видам низкомолекулярных лигандов, обладают относительной специфичностью в связывании разнозаряженных лигандов [1].

Для оценки связывающей способности основных транспортных белков плазмы крови в настоящее время используется метод флуоресцентного зондирования, который позволяет оценить степень связывания гидрофобных флуоресцентных зондов с транспортными белками. В методе флуоресцентного зондирования используется набор флуоресцентных зондов с различными зарядами, квантовый выход флуоресценции которых значительно возрастает при связывании с транспортными белками. Таким образом, интенсивность флуоресценция таких зондов в первую очередь определяется их связанной фракцией. Это позволяет оценить связывающую способность транспортных белков плазмы крови к гидрофобным метаболитам. Основное значение в связывании с белками играет заряд молекулы низкомолекулярных гидрофобных лигандов: анионы преимущественно сорбируются альбумином, катионы –  $\alpha$ -1-

кислым гликопротеином, а незаряженные – распределяются между альбумином и липопротеинами. Поэтому связывание низкомолекулярных гидрофобных токсинов и лекарственных препаратов белками крови можно анализировать с помощью набора флуоресцентных зондов с различными зарядами: анионный – 8-анилино-нафталин-1 – сульфонат (АНС), катионный – Хинальдиновый красный (ХК), нейтральный – Нильский красный (НК) [1, 2].

Цель данной работы – исследование методом флуоресцентного зондирования особенностей транспорта различных гидрофобных метаболитов белками плазмы крови (ЧСА, АГП и ЛП) у больных циррозом печени с целью разработки на этой основе адаптированных к клиническим условиям флуоресцентных тестов оценки тяжести патологического процесса и выбора наиболее эффективного гемосорбента для экстракорпоральной очистки крови.

### Материалы и методы

Пациенты с циррозом печени (42 больных) по уровню печеночно-клеточной недостаточности были разделены на три группы согласно прогностической шкале Child-Pugh : к 1-ой отнесены пациенты с ЦП в компенсированной стадии (группа А), ко 2-ой – в субкомпенсированной стадии (группа В) и к 3-ей – в декомпенсированной стадии (группа С) цирроза. Диагноз был поставлен на основании соответствующих клинических, лабораторных, морфологических и инструментальных данных. Группу контроля составили 30 здоровых доноров. При проведении гемосорбции больным циррозом печени (стадия декомпенсации) были использованы угольные гемосорбенты «Карбокол» (Украина), «УВГ» (Россия), «СУГС» (Украина), «ТЭТРА» (Россия), «ГСГД-4» (Украина), «КАРБОН-4» (Украина) и аппарат «Prometheus» (фирма «Fresenius», Германия). Аппарат разработан и создан для высокоэффективной очистки альбумина плазмы крови от связанных с ним гидрофобных метаболитов. Он используется в клинических условиях для искусственной поддержки печени и почек при явлениях выраженной печеночно-почечной недостаточности.

Для каждого образца плазмы крови был проведен биохимический анализ на содержание общего белка, альбумина, молекул средней массы (МСМ), общего билирубина. В работе были использованы различные гидрофобные флуоресцентные зонды: анионный – АНС («Реахим», Москва, Россия); катионный – ХК («Реахим», Москва, Россия); нейтральный – НК («Sigma», St. Louis, Mo., USA). Спектры зондовой флуоресценции регистрировались на спектрофлуориметре SFL-1211A («СОЛАР», Минск, Беларусь). Оптимальные условия регистрации и использования зондов приведены в работах [1, 2].

### Результаты и их обсуждение

Изучено распределение степени связывания флуоресцентных зондов между сывороточным альбумином, липопротеинами и  $\alpha$ -1-кислым гликопротеином в плазме крови здоровых доноров и больных с циррозом печени на разных стадиях заболевания. Изучение спектров зондовой флуоресценции показало, что у больных циррозом печени в стадии компенсации возрастает связывающая способность альбумина к анионным гидрофобным метаболитам по сравнению с контрольной группой (рис.1). Наиболее вероятной причиной увеличения связывающей способности ЧСА в группе 1 является возрастание уровня незатерифицированных жирных кислот, концентрация которых при ЦП в плазме крови значительно увеличивается. Связывание высокоаффинных лигандов, в том числе незатерифицированных жирных кислот может индуцировать конформационные изменения молекулы альбумина. Это, в свою очередь, может привести к созданию дополнительных центров связывания на этом белке. В стадии компенсации вклад липопротеинов и альбумина в транспорт незаряженных гидрофобных веществ (по данным зонда НК) существенно не меняется по сравнению со здоровыми донорами. Резко повышается связывающая способность  $\alpha$ -1-кислого гликопротеина к катионным гидрофобным метаболитам (по данным зонда ХК). Учитывая, что  $\alpha$ -1-кислый гликопротеин является белком острой фазы воспаления и имеет

один широкий и гибкий центр связывания, то изменения в интенсивности флуоресценции зонда ХК, по-видимому, связаны с повышением концентрации этого белка в плазме крови.

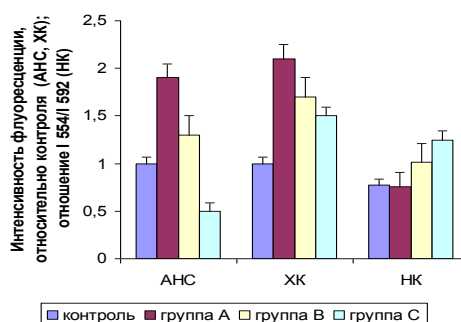


Рис. 1. Влияние цирроза печени на флуоресценцию зондов АНС, НК и ХК в плазме крови в зависимости от стадии заболевания

При циррозе печени в стадии субкомпенсации снижается связывающая способность ЧСА к анионным гидрофобным лигандам по сравнению с группой компенсации, но она остается выше, чем у здоровых доноров. Для этой фазы патологического процесса характерно повышение вклада липопротеинов и снижение вклада альбумина в транспорт незаряженных гидрофобных метаболитов (рис. 1). Эти изменения, вероятно, связаны со значительным нарушением белоксинтезирующей функции печени и последующим снижением концентрации альбумина в плазме крови больных, а также с загруженностью альбумина продуктами патологического метаболизма. Установлено уменьшение связывающей способности  $\alpha$ -1 кислого гликопротеина по сравнению с соответствующим показателем в компенсированной стадии, однако, она остается выше, чем в случае здоровых доноров. Это может свидетельствовать о том, что повышенная выработка катионных субстанций при циррозе уже не компенсируется избыточным содержанием АГП и/или содержание АГП в плазме падает.

Для больных в клинической стадии декомпенсации цирроза печени характерно резкое снижение связывающей способности альбумина к анионным гидрофобным метаболитам по сравнению с группами компенсации, субкомпенсации и здоровыми донорами. Это обусловлено, по всей вероятности, с гипоальбуминемией на фоне нарушенной белоксинтезирующей функции печени и гиперпродукцией анионных гидрофобных метаболитов, блокирующих связывающие центры на альбумине. Результаты анализа спектров флуоресценции зонда НК свидетельствуют о повышении вклада липопротеинов и снижении вклада альбумина в транспорт незаряженных гидрофобных метаболитов. Это может быть объяснено как прогрессирующим выходом в кровь патологических нейтральных гидрофобных метаболитов, так и нарушением концентрационного отношения ЛП/ЧСА в плазме крови. Наблюдается дальнейшее уменьшение связывающей способности  $\alpha$ -1 кислого гликопротеина по сравнению с компенсированной и субкомпенсированной стадиями заболевания (рис. 1). Это связано, по всей вероятности, как с повышенным выходом в кровь катионных гидрофобных субстанций, блокирующих места связывания на АГП, так и со снижением концентрации АГП. Однако, надо отметить, что связывающая способность  $\alpha$ -1 кислого гликопротеина в клинической стадии декомпенсации цирроза печени остается выше, чем в случае здоровых доноров.

Таким образом, при ЦП в стадиях компенсации и субкомпенсации происходит увеличение нагрузки по переносу избыточных продуктов метаболизма на основные транспортные белки, которое компенсируется, во-первых, конформационными изменениями ЧСА, приводящими к повышению связывающей способности молекул альбумина, во-вторых, усилением транспортной функции ЛП и АГП. По мере углубления патологического процесса и перехода его в декомпенсированную стадию цирроза печени, уменьшаются транспортные возможности ЧСА и АГП, но остается высокой связывающая способность ЛП.

При коррекции синдрома эндогенной интоксикации широкое клиническое распространение получили методы, моделирующие детоксикационную функцию печени и

основанные на перфузии крови или плазмы через сорбенты. Это, в первую очередь, гемокарбоперфузия – метод очистки крови с использованием различных угольных сорбентов, а также современная высокотехнологичная аппаратура искусственной поддержки печени и почек – «Prometheus» (Германия).

При проведении гемосорбции пациентам с циррозом печени в стадии декомпенсации в клинических условиях были использованы следующие сорбенты: «Карбокол» (Украина), «УВГ» (Россия), «СУГС» (Украина), «ТЭТРА» (Россия), «ГСГД-4» (Украина), «КАРБОН-4» (Украина). Наши исследования по анализу изменений биохимических данных показали, что все выше перечисленные сорбенты приводят к незначительному снижению содержания общего белка и альбумина, исключение составляет гемосорбент "КАРБОН-4", который не оказывает отрицательного влияния на основные показатели белкового метаболизма. Все исследованные сорбенты удаляют пептиды средней молекулярной массы.

Одним из метаболитов, присутствующим в большом количестве в крови больных с циррозом печени, является билирубин. Проведение гемокарбоперфузии этим пациентам приводит к значительному его снижению. Наиболее эффективными в этом плане являются сорбенты «ГСГД-4», «Карбокол» и «КАРБОН-4». Анализ данных флуоресцентного зондирования показал, что гемосорбенты «Карбокол» и «КАРБОН-4» весьма значительно сорбируют анионные гидрофобные метаболиты, тем самым очищая альбумин плазмы крови. «ГСГД-4» незначительно снижает содержание анионных гидрофобных метаболитов, являясь третьим по эффективности.

Таким образом, совокупный анализ полученных биохимических и спектральных данных показал, что гемосорбенты «КАРБОН» и «КАРБОН-4» не оказывают отрицательного влияния на основные показатели белкового метаболизма, проявляют наиболее выраженный сорбционный потенциал и делигандизирующее действие по отношению к различным классам гидрофобных и гидрофильных метаболитов. Для высокоэффективной очистки альбумина плазмы крови от связанных с ним гидрофобных метаболитов биомедицинской фирмой «Fresenius» был разработан и создан аппарат «Prometheus» (рис. 2).

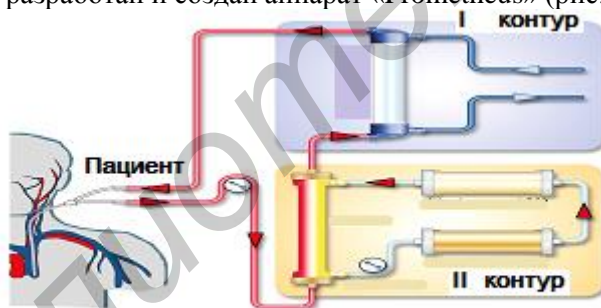


Рис. 2. Общая схема работы аппарата «Prometheus»

Схема работы аппарата «Prometheus» включает в себя два контура: первичный контур состоит из заборной магистрали, альбумин-фильтрующей колонки (размер пор которой обеспечивает проникновение через мембрану плазмы с метаболитами, масса которых не превышает 65000 Да), установки для гемодиализа с ультрафильтрацией и возвратной магистрали. Вторичный контур подсоединяется к первичному и производит непосредственную очистку альбумина. Выделенный с помощью специального фильтра альбумин проходит через две дополнительные колонки с двумя различными сорбентами. Дополнительные колонки вторичного контура последовательно удаляют с альбумина нейтральные и анионные гидрофобные метаболиты. Очищенный альбумин вновь поступает в первичный контур и цельная кровь возвращается пациенту. Длительность одной процедуры детоксикации на данном аппарате составляет 6–8 ч. Эта высокотехнологичная аппаратура используется в клинических условиях для искусственной поддержки печени и почек при явлениях выраженной печеночно-почечной недостаточности. Больному X с циррозом печени после нескольких сеансов гемокарбоперфузии было проведено три сеанса детоксикации на аппарате

«Prometheus». В результате общее клиническое состояние больного улучшилось. По биохимическим анализам крови отмечалось достоверное прогрессирующее снижение содержания билирубина, мочевины, креатинина, нормализация электролитного и кислотно-щелочного баланса при сохраняющихся показателях общего белка и альбумина плазмы крови.

Используя метод флуоресцентного зондирования была проведена оценка эффективности детоксикации аппаратом «Prometheus». Анализ флуоресцентных данных отрицательно заряженного зонда АНС показал высокую делигандизирующую эффективность второй колонки альбуминового контура по очистке альбумина от анионных гидрофобных метаболитов. Интенсивность флуоресценции зонда АНС после второй колонки увеличивалась на 40% через 1 ч от начала процедуры и на 38,2 % через 3 ч от начала процедуры. Повышение соответствующего показателя после первой колонки было несущественным. Это свидетельствует о том, что вторая колонка альбуминового контура эффективно очищает альбумин от анионных гидрофобных метаболитов. Стоит отметить, что эффективность процессов очистки альбумина при использовании аппаратуры «Prometheus» значительно выше, чем при проведении гемокоррекции с использованием серийных угольных сорбентов.

### Заключение

Метод флуоресцентного зондирования позволяет получить экспресс информацию о функциональном состоянии основных транспортных систем плазмы крови пациентов, оперативно оценивать тяжесть заболевания у пациента и, в соответствии с этим, быстро вносить коррекцию в тактику их лечения.

### EVALUATION OF THE FUNCTIONAL PROBABILITIES OF THE BLOOD PLASMA TRANSPORT SYSTEMS OF THE LIVER CIRRHOSIS PATIENTS BY THE FLUORESCENT PROBES METHOD AND ASSESSING OF HYDROPHOBIC SUBSTANCES ELIMINATION AFTER HEMOSORPTION AT THESE PATIENTS

E.V. KOROLIK, A.A. IVANOV, N.I. INSAROVA, V.G. LESHENKO, F.I. KAZAKOV,  
A.K. KOROLIK, V.V. KIRKOVSKII

### Abstract

The results of investigation of the main blood plasma transport proteins binding ability at liver cirrhosis patients by the fluorescent probes method are presented. It is shown that fluorescent probes method allows to get express information about functional state of the main blood plasma transport proteins at liver cirrhosis patients, promptly assess the disease severity, and according to this information change their treatment quickly.

*Keywords:* fluorescent probe, cirrhosis, human serum albumin, lipoproteins,  $\alpha$ -1-acid glycoprotein.

### Список литературы

1. Короленко Е.А., Королик Е.В., Королик А.К. и др. // ЖПС. 2007. Т. 74. № 4. С. 507–511.
2. Ivanov A.I., Gavrilov V.B., Furmanchuk D.A. et. al. // Clin. Exp. Med. 2002. Vol. 2. P. 147–155.