

Л.О.Юшко, Л.О. Сахно, к.біол.н., В.В. Сарнацька, к.біол.н.,
В.М. Масленний, к.біол.н., В.Г. Ніколаєв, д.мед.н., проф.

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ АЛЬБУМІНІЗАЦІЇ ДЕЛІГАНДИЗУЮЧИХ ВУГЛЕЦЕВИХ ГЕМОСОРБЕНТІВ НА ЇХ СОРБЦІЙНУ АКТИВНІСТЬ

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького НАН України, м. Київ

Проблема створення гемосорбентів, що поєднують значну сорбційну активність з високою біосумісністю та призначені для глибокого очищення плазми та мембран клітин крові хворих, не втрачає своєї актуальності й нині. Велике значення для рішення цієї проблеми мала розробка вуглецевих мас-фрактальних пірополімерів — делігандизуючих гемо-, плазмосорбентів (ГСГД), здатних забезпечити швидку кінетику масообміну, необхідну для формування високого сорбційного потенціалу щодо не тільки до водорозчинних, а й до гідрофобних метаболітів, міцно зв'язаних з білками і мембранами клітин крові [1]. Слід зазначити також високу поглинальну ємність ГСГД до білкових молекул [2], що відкриває можливість синтезу комбінованих білок-вуглецевих сорбентів з метою підвищення гемосумісності ГСГД та надання їм біоспецифічних властивостей. Для того, щоб мінімізувати при цьому втрату сорбційної активності щодо білок-зв'язаних речовин у якості покриття нами використані делігандизований сироватковий альбумін людини (САЛ), а також його В-конформер (рН 8,0). Делігандизований САЛ на відміну від фармакопейного препарату має істотно підвищену акцепторну ємність щодо білок-зв'язаних метаболітів за рахунок видалення під час сорбційної делігандизації САЛ великої частини гідрофобних лігандів [3]. Структурно-функціональні перебудови у молекулі білка, що відбуваються у процесі отримання В-конформеру під впливом зміни рН, також сприяють збільшенню його

комплексоутворюючого потенціалу. Так, вивчення впливу покриття конформерами САЛ вуглецевих пірополімерів ГСГД на їх здатність видаляти під час перфузії *in vitro* білок-зв'язані "печінкові" та "ниркові" токсини з модельних альбумін-вмісних розчинів показало, що В-конформери певною мірою зберігають сорбційні властивості вуглецевої матриці [4].

Мета дослідження полягала у вивченні впливу альбумінізації делігандизуючих вуглецевих гемосорбентів на ефективність видалення водорозчинних та білок-зв'язаних метаболітів з цільової крові донора.

Дослідження були проведені за підтримки цільової наукової програми НАН України "Фундаментальні основи геноміки і протеоміки", № держреєстрації 0107U002244.

Матеріали і методи

У роботі використано делігандизуючі гемосорбенти ГСГД з насипною вагою 0,17 г/см³ та наступні реактиви: креатинін, білірубін (Merck, Німеччина), L-триптофан (ООО "Хімлаборреактив", Україна) та фармакопейний розчин донорського САЛ (ЗАО "Біофарма", Україна).

Сорбційна делігандизація донорського САЛ була виконана за методом Chen RF [5]. В-конформер делігандизованого САЛ був отриманий шляхом зміни іонної атмосфери білка до рН 8,0 за допомогою 1N розчину гідроксиду натрію. Альбумінізація ГСГД включала інкубацію у розчині отриманого делігандизованого САЛ та у розчині його В-конформеру при температурі 4°C протягом не менше 12 годин. Наси-

чені альбуміном сорбенти перенесли у колонки та відмивали натрій-фосфатним буфером (рН 7,2) до відсутності слідів білка.

Перфузія крові проводилась через колонки об'ємом 5 см³ зі швидкістю 0,625 мл/хв протягом 2 годин. Перед початком перфузії у кров донора (відділення переливання крові, Національний інститут раку МОЗ України) було введено додаткову кількість креатиніну, білірубину та L-триптофану. Проби крові на аналіз відбирались на початку та після перфузії з пулу та на виході з колонки. Вміст L-триптофану у плазмі крові визначався спектрофлуориметричним методом після осадження білків та конденсації L-триптофану з утворенням флюорофору [6], вміст решти метаболітів — за стандартними біохімічними методами [7]. Величину адсорбції (поглинальну ємність) визначали за зниженням вмісту метаболіту в крові та розраховували на 1 г сорбенту.

Результати дослідження та їх обговорення

У результаті 2-годинної перфузії крові через колонки з непокритим ГСГД (ГСГД) та ГСГД, покритим делігандизованим САЛ (ГСГД+дСАЛ) і його В-конформером (ГСГД+В-конф.), вміст водорозчинних метаболітів у крові знижувався — сечової кислоти на 78,1; 83,0 та 84,0 % відповідно (рис. 1А), креатиніну на 83,0; 85,2 та 86,0 % відповідно (рис. 1 Б). Адсорбція сечової кислоти становила 2,85 мг на 1 г ГСГД, 3,03 мг — на 1 г ГСГД+дСАЛ та 3,06 мг на 1 г ГСГД+В-конф. Поглинальна ємність ГСГД, ГСГД+дСАЛ та ГСГД+В-конф. за креатиніном дорівнювала 2,25; 2,31 та 2,32 мг/г відповідно. Привертає увагу той факт, що обидва альбумінових покриття не тільки не знижували, а й певною мірою підвищували сорбційну активність ГСГД щодо сечової кислоти та креатиніну.

Вміст L-триптофану, відносно слабо зв'язаного з САЛ ($K_{ас} = 2.7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$), зменшувався після перфузії через колонку з ГСГД на 76,4 % , з ГСГД+дСАЛ — на 77,7 % та з ГСГД+В-конф. — на 79,8 % відповідно (рис. 2 А), тобто спостерігалось незначне підвищення сорбційної активності ГСГД після альбумінізації.

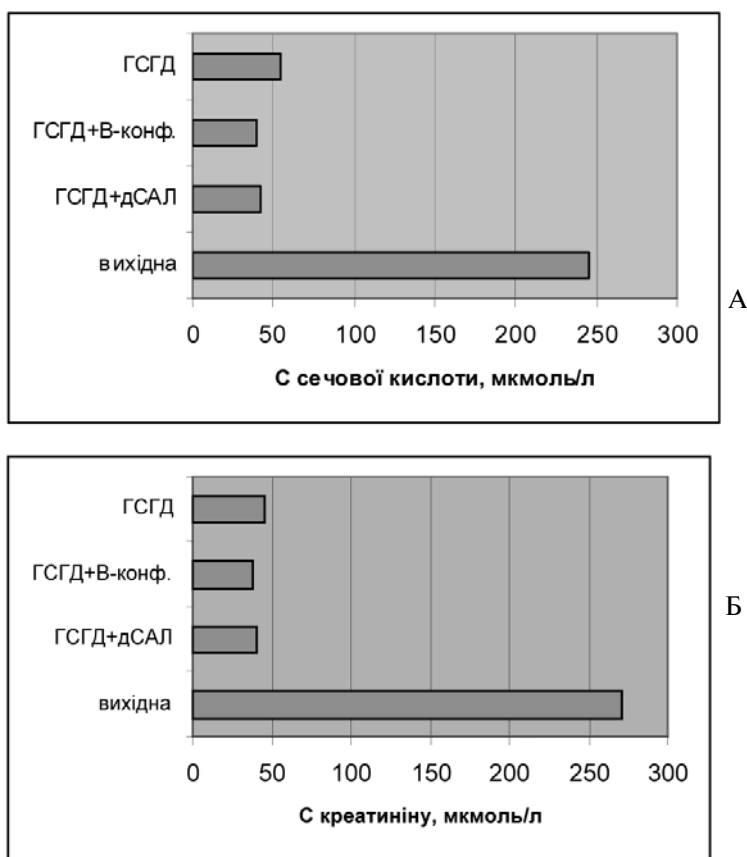


Рис. 1 Поглинання сечової кислоти (А) та креатиніну (Б) з крові донора після гемоперфузії

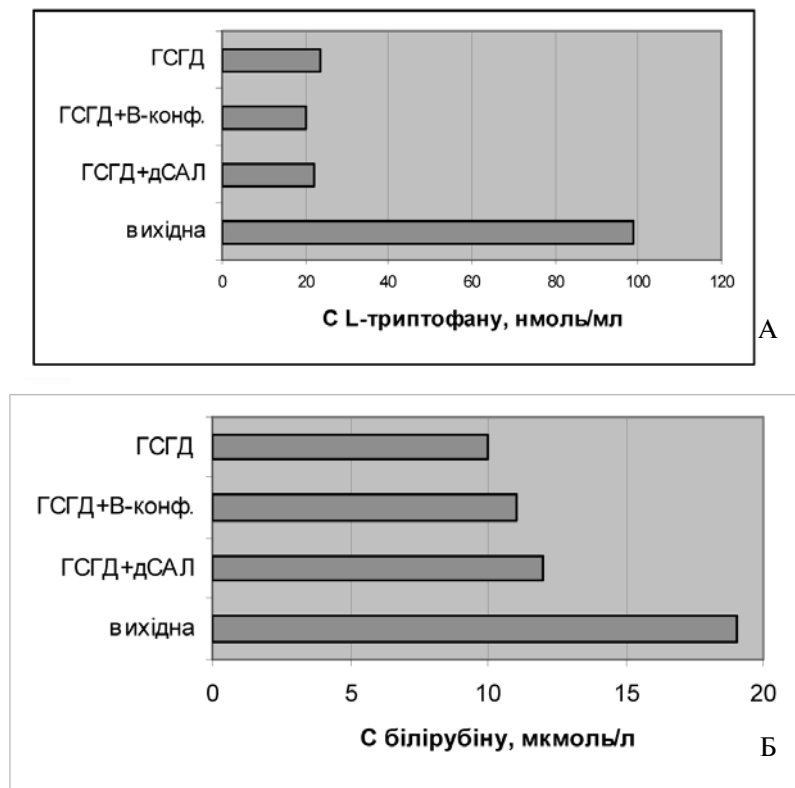


Рис. 2 Поглинання L-триптофану (А) та некон'югованого білірубіну (Б) з крові донора після гемоперфузії

Результати адсорбції некон'югованого білірубіну представлені на рис. 2 Б. Максимальне зниження вмісту некон'югованого білірубіну (47,4 %) спостерігалось після перфузії крові через колонку з непокритим ГСГД. Після контакту з ГСГД+дСАЛ та ГСГД+В-конф. вміст некон'югованого білірубіну падав на 36,8 та 42,1 % відповідно. Непокритий ГСГД поглинав 0,46 мг білірубіну на 1 грам сорбенту. Покриття ГСГД делігандизованим САЛ викликало зменшення адсорбції некон'югованого білірубіну (0,36 мг/г) на 21,7 % та покриття В-конформером (0,41 мг/г) лише на 10,9 %. Через 2 години гемоперфузії концентрація некон'югованого білірубіну на виході з колонок, заповнених ГСГД, ГСГД+дСАЛ та ГСГД+В-конф., становила 11; 13 та 12 ммоль/л відповідно, тобто не більше 68,0 % від вихідної концентрації (19 ммоль/л). Це свідчення того, що непокритий та покриті альбуміном ГСГД не вичерпали поглинальної ємності по відношенню до некон'югованого білірубіну.

Розглянемо, як впливає альбумінізація на поглинальну активність ГСГД щодо білка. Після 2-годинної перфузії крові через колонку з ГСГД у пулі було зафіксовано зниження вмісту загального білка та альбуміну на 18,3 та 24,3 % відповідно (рис 3 А і Б). У результаті гемоперфузії через колонку з ГСГД+дСАЛ вміст загального білка і альбуміну падав лише на 2,8 та 5,4 % та через колонку з ГСГД+В-конф. — на 1,4 і 2,7 % відповідно. Поглинальна ємність непокритого ГСГД щодо загального білка та альбуміну становила 1,15 і 0,79 г/г відповідно та була на порядок більшою, ніж поглинальна ємність альбумінізованих ГСГД: величина адсорбції загального білка на ГСГД+дСАЛ та ГСГД+В-конф. дорівнювала 0,17 і 0,09 г/г та альбуміну — 0,18 і 0,09 г/г відповідно. При цьому вже через 2 години гемоперфузії концентрація загального білка та альбуміну на виході з колонок, заповнених ГСГД+дСАЛ та ГСГД+В-конф., практично не відрізнялась від концентрації перед початком процедури. Таким чином, покриття високоємного гемосорбенту делігандизованим альбуміном або його В-конформером надає можливість звести до мінімуму втрату білка під

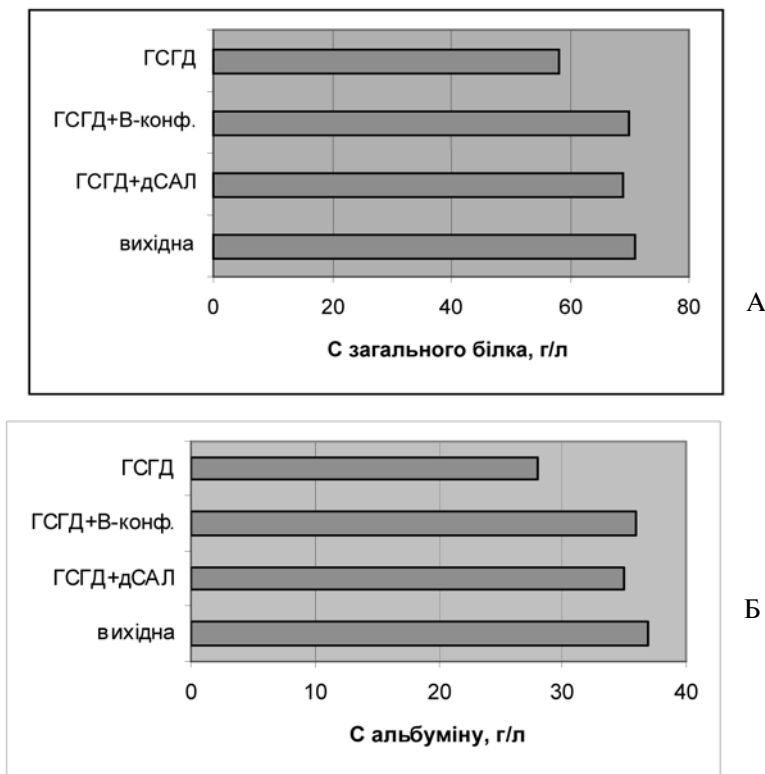


Рис. 3 Поглинання загального білка (А) та альбуміну (Б) з крові донора після гемоперфузії

час гемоперфузії, що має особливе значення при хворобах, для яких характерна білкова недостатність, наприклад, у онкологічних хворих у стані кахексії [8], у пацієнтів з тяжкою термічною травмою [9], у хворих з виразними порушеннями білоксинтетичної функції печінки [10].

Одержані результати показали, що альбумінове покриття і особливо В-конформер незначною мірою покращують адсорбційну активність вуглецевої матриці щодо водорозчинних метаболітів та L-триптофану (рис. 1 А і Б та 2 А).

Пояснюється цей феномен, імовірно тим, що покриття ГСГД альбуміном знижує адсорбцію білків плазми крові на його зовнішній поверхні, отже, запобігає росту дифузного опору на поверхні розділу фаз. Ця гіпотеза підтверджується зменшенням поглинання загального білка та альбуміну на альбумінізованих ГСГД (рис. 3 А і Б). Інтерпретуючи дані з адсорбції некон'югованого білірубину, слід врахувати те, що відрив цього ліганду, міцно зв'язаного з молекулою альбуміну ($K_{ас} = 9,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$), відбувається всередині вуг-

лецевого ядра, доступ до якого певним чином ускладнюється будь-яким покриттям, у тому числі й альбуміновим. Цей ефект слабкіше виражений при покритті гемосорбенту В-конформером, що пов'язано з його меншим дифузним опором, обумовленим, вірогідно, стеричними факторами або більшою здатністю В-конформеру бути проміжним субстратом для переносу білірубину всередину вуглецевого ядра. Отримані дані цілком підтверджують результати досліджень, у яких доведена дифузійна "прозорість" В-конформерного покриття ГСГД для гідрофобних метаболітів в умовах адсорбції з модельних альбуміновмісних розчинів 4.

Висновки

1. Вивчення впливу покриття делігандизованим САЛ і його В-конформером вуглецевих пірополімерів ГСГД на їх здатність видаляти під час перфузії *in vitro* водорозчинні та білок-зв'язані токсини з цільної крові донора показало, що використані покриття дозволяють максимально зберігати сорбційний потенціал вуглецевої матриці.
2. Покриття високоємного гемосорбенту делігандизованим альбуміном або його В-конформером надає можливість мінімізувати поглинання білка.
3. Використання для покриття високоактивних вуглецевих гемосорбентів ГСГД альбуміну, одного з найважливіших компонентів плазми крові, слід вважати достатньо перспективним підходом щодо підвищення їх гемосумісності.

ЛІТЕРАТУРА

1. New approaches to the removal of protein-bound toxins from blood plasma of uremic patients / V.V. Sarnatskaya, L.A.Yushko, A.V.Nikolaev [et al.] // *Biomat. Art. Cells & Artificial Organs.* - 2007. - Vol.35, №3. - P.287-309.
2. Albumine, Bilirubine and Activated Carbon: New Edges of an Old Triangle / V.V.Sarnatskaya, W.E.Lindup, P.Walther [et al.] // *Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology.* - 2002. - Vol. 30, №2. - P. 113-127.
3. Albomax as a promising liquid adsorbent for binding hydrophobic markers / V.Sarnatskaya, K. Lobunets, L.Yushko [et al.] // *Biomat. Art. Cells & Immunob. Biotech.* - 1993. - Vol. 17, №6. - P.487.
4. Биологизация поверхности высокоактивных углеродных адсорбентов конформерами человеческого сывороточного альбумина / В.В. Сарнацкая, Л.А. Юшко, Л.Н. Коренева [и др.] // *Эфферентная терапия.* - 2005. - 1, № 3. - С.10-20.
5. Chen R.F. Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment / R.F. Chen // *J Biol Chem.* - 1967. - Vol. 242, № 2. - P. 173-81.
6. Denecla W.D. The determination of tryptophan in plasma, liver, and urine / Denecla W.D., Dewey H.K. // *J Lab Clin Metod.* - 1967. - 69. - P. 160-8.
7. Лабораторные методы исследования в клинике: [справочник / под ред. В.В. Меньшикова]. - Москва: Медицина. - 1987. - 365с.
8. Кавецкий Р.Е. Взаимодействие опухоли и организма / Р.Е. Кавецкий. - Киев: Наук. думка, 1977. - 234 с.
9. Sevitt S. A review of the complications of burns, their origin and importance for illness and death / Sevitt S. // *J Trauma.* - 1979. - 19. - P. 358-69.
10. Болезни печени и желчевыводящих путей: [руководство для врачей / под ред. В.Т. Ивашкина]. - Москва: ООО "Издательский дом М-Вести", 2002. - 416с.

*Л.О. Юшко, Л.О. Сахно, В.В. Сарнацкая,
В.М. Масленый, В.Г. Николаев*

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ АЛЬБУМИНИЗАЦИИ
ДЕЛИГАНДИЗИРУЮЩИХ УГЛЕРОДНЫХ
ГЕМОСОРБЕНТОВ НА ИХ СОРБЦИОННУЮ
АКТИВНОСТЬ**

Изучение удаления водорастворимых и гидрофобных метаболитов из цельной крови донора в процессе гемоперфузии *in vitro* через колонки с непокрытым делигандизирующим гемосорбентом ГСГД и ГСГД, покрытым делигандизированным человеческим сывороточным альбумином и его В-конформером (рН 8,0) показало, что используемые покрытия максимально сберегают сорбционный потенциал углеродной матрицы в отношении мочевой кислоты, креатинина, L-триптофана и неконъюгированного билирубина на фоне снижения адсорбции общего белка и альбумина. Использование для покрытия гемосорбентов ГСГД одного из важнейших компонентов плазмы крови — альбумина является перспективным подходом для повышения их гемосовместимости.

Ключевые слова: водорастворимые и гидрофобные метаболиты, делигандизирующие гемосорбенты, человеческий сывороточный альбумин, В-конформер ЧСА

*L.O. Yushko, L.O. Sakhno, V.V. Sarnatskaya,
V.M. Maslenny, V.G. Nikolaev*

THE STUDY OF EFFECT OF DELIGANDING CARBON HEMOSORBENTS ALBUMINIZATION ON THEIR SORPTIONAL ACTIVITY

The study of the removal of water-soluble and hydrophobic metabolites from donor's whole blood during hemoperfusion *in vitro* through the columns with uncoated highly active carbon deliganding hemosorbent HSGD, and HSGD coated with deliganded human serum albumin and its B-conformer (pH 8.0) has shown that the used coatings maximally preserve sorption potential of carbon matrix toward uric acid, creatinin, L-tryptophan, and unconjugated bilirubin at the background of decreased adsorption of total protein and albumin. The use of the most important blood plasma component — albumin for coating of HSGD hemosorbents is a promising approach for elevation of their hemocompatibility.

Key words: water-soluble and hydrophobic metabolites, deliganding hemosorbent HSGD, human serum albumin, B-conformers of HSA

Надійшла до редакції: 03.02.10