

*Бычко Г. Н., Бурдашкина К. Г., Старостин А. В., Седёлкина Е. Л.,
Садовский Д. Н.*

МОЛЕКУЛЯРНО-МАССОВОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ И УЛЬТРАФИЛЬТРАТЕ ПАЦИЕНТОВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ПРОДЛЕННОЙ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ПОЧЕЧНОЙ ТЕРАПИИ КАК КРИТЕРИЙ ЕЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ

УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск

При многих тяжелых патологических состояниях сопровождающихся симптоматикой эндогенной интоксикации кардинально нарушается состояние белкового гомеостаза. Обменные реакции приобретают резко выраженный катаболический характер, превалируя над анаболическим звеном, в жидкостных средах организма накапливаются аномально высокие количества продуктов ограниченного протеолиза белка, так называемые «средние молекулы» (СМ) [1]. Они являются токсинами эндогенного происхождения, оказывая выраженное патогенетическое воздействие на многие жизненно важные процессы организма. В периоперационном периоде трансплантации органов не редко возникает или сохраняются явления острой почечно-печеночной недостаточности и в этой ситуации проведение продленной заместительной почечной терапии (ПЗПТ) является методом выбора. Учитывая то обстоятельство, что уровень метаболитов, пептидов группы СМ у этих пациентов может достигать 3 и более граммов на литр, а объем ультрафильтрата (УФТ) при проведении ПЗПТ составляет несколько десятков литров, суточные потери протеинов могут достигать 30–150 г. Этот факт требует особого внимания при проведении заместительной терапии.

Целью данной работы явилось исследование эффективности просеивания мембранных фильтров Fresenius filter AV600S (с пределом пропускания молекул с Mw до 30 000 Д) используемых при проведении методики ПЗПТ методом колоночной гель-хроматографии.

Оценку молекулярно-массового распределения белков и пептидов плазмы крови и УФТ пациентов при проведении ПЗПТ осуществляли, используя метод гель-хроматографии [1, 2] на носителях типа сефадекс G₅₀ (Pharmacia, Швеция) [3].

Сефадекс G-50 Fine, подготавливали к работе согласно [3, 4], упаковывали в колонку размером 14 × 700 мм и уравнивали элюирующим буфером 0,14 М NaCl или 0,13 М NaCl в 0,01 М трис HCl, pH 7,8. Образец плазмы перед нанесением на колонку разводили буфером для снижения вязкости, а УФТ уплотнялся сахарозой до конечной концентрации 0,2 % для увеличения его вязкости, что улучшает разделение, препятствуя «размыванию» пиков. Колонка перед началом работы калибровалась альбумином (Mw 69000 Д) и витамином B₁₂ (Mw 1355 Д), в качестве контрольного образца использовали донорскую плазму (рис. 1).

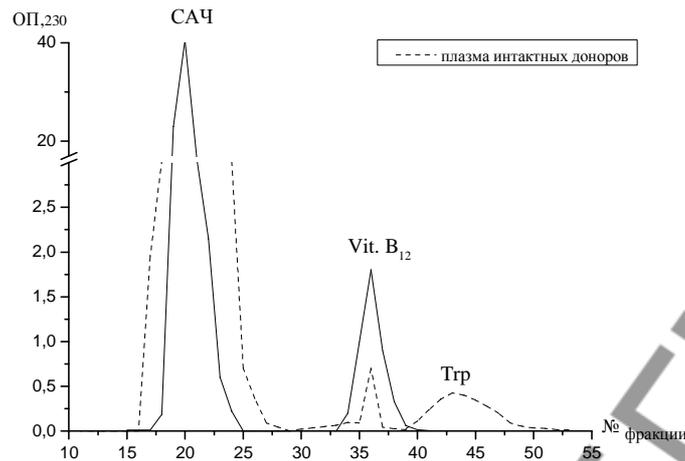


Рис. 1. Калибровка колонок с сефадексом G-50 Fine альбумином (САЧ), витамином В₁₂ и триптофаном (Трп). Контроль — плазма интактных доноров

Характерный хроматографический профиль элюции плазмы интактных доноров на сефадексе G₅₀ представляет собой три четко выраженных, симметричных пика: 1 — высокомолекулярный, > 20 000 Д; 2 — средномолекулярный, от 5000 до 300 Д; 3 — низкомолекулярный, < 500Д.

Зона выхода альбумина совпадает по распределению с высокомолекулярным пиком плазмы, а витамина В₁₂ с зоной выхода пептидов группы СМ.

Для примера эффективности проведения ПЗПТ приводим хроматограммы молекулярно-массового распределения белково-пептидного комплекса в плазме и УФТ больного Б. (д/з: цирроз печени, внутripеченочная форма портальной гипертензии ВРВП 3-й степени, спленомегалия, паренхиматозная желтуха, энцефалопатия), в точке соответствующей 12 ч от начала ПЗПТ. Показанием к проведению ПЗПТ явился развившийся на фоне основного заболевания острый гепаторенальный синдром.

Хроматограмма плазмы больного Б. (рис. 2) спустя 12 ч от начала ПЗПТ, в отличие от молекулярно-массового распределения донорской плазмы (рис. 1), характеризовалась присутствием одного, небольшого по высоте высокомолекулярного пика, соответствующего зоне выхода протеинов, пики низкомолекулярных компонентов (СМ) и аминокислот в плазме больного к этому сроку отсутствовали. Это подтверждает их высокую степень удаления из кровеносного русла через поры использованных мембран.

Следует обратить внимание на слабо выраженный по высоте пик протеинов, включающий в себя и альбумин, свидетельствующий о крайне низкой концентрации этого белка в плазме, что и подтверждается результатами определения его БКЗ методом, по которому в плазме регистрируется только 5–7 г/л этого белка. К 4-м суткам лечения с использованием ПЗПТ пик, соответствующий выходу альбумина, приобретает нормальный характер распределения и высоту, но рядом с ним выявляется дополнительный, неидентифицируемый пик, имеющий молекулярную массу меньшую, чем у протеина. Спустя 4 суток после завершения процедуры уровень альбумина вновь снижается, а высота не идентифициро-

ванного пика несколько возрастает. Пики, характерные для пептидов группы СМ и аминокислот, на хроматограмме отсутствуют.

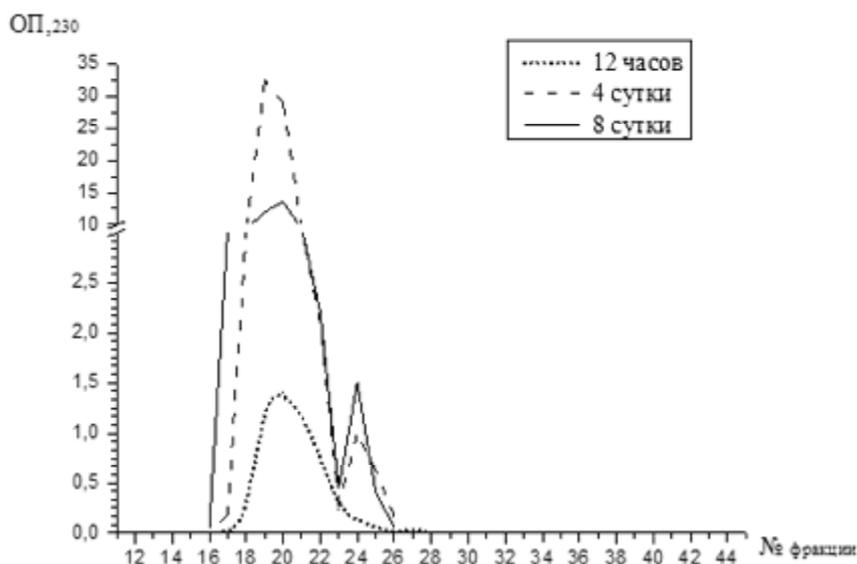


Рис. 2. Динамика изменения белково-пептидных компонентов в плазме больного Б. при проведении ПЗПТ

Молекулярно-массовое распределение УФТ этого же пациента в точке 12 часов ПЗПТ приведено на рис. 3 и характеризуется полным отсутствием пика, соответствующего наличию в УФТ белка и присутствием двух четких, симметричных пиков — пептидов группы СМ и аминокислот, совпадающих с зонами выхода маркеров — витамина В₁₂ (Mw 1355) и триптофана (Mw 204). Концентрация СМ, рассчитанная по ангиотензину, составляет 3,12 г/л.

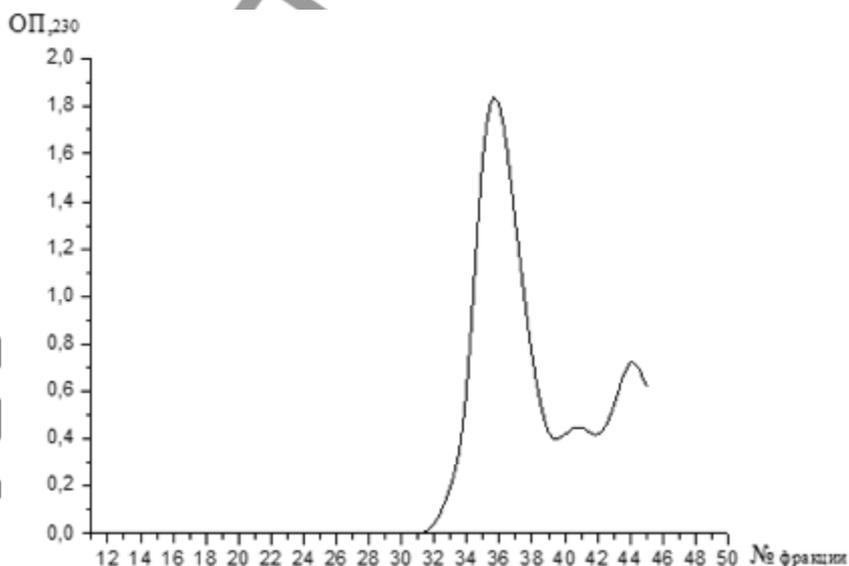


Рис. 3. Хроматограмма УФТ больного Б. через 12 ч проведения ПЗПТ

Учитывая, что процедура проведения ПЗПТ пролонгирована во времени (максимально — 72 ч), наличие в УФТ белка свидетельствовало бы о крайне вы-

сокой степени удаления его из организма пациента и развития состояния гипопроteinемии, однако отсутствие в УФТ высокомолекулярных белковых компонентов свидетельствует, что мембраны Fresenius filter AV600S с пределом просеивания молекул выше M_w 30 000 Д, эффективно удерживают белки и препятствуют их поступлению в УФТ в ходе осуществления ПЗПТ.

Таким образом, при исследовании молекулярно-массового распределения белков и пептидов в плазме и ультрафильтрате, полученных в ходе проведения ПЗПТ, методом гель-хроматографии позволяет сделать следующие предварительные выводы.

Мембраны Fresenius filter AV600S при проведении продленной заместительной почечной терапии эффективно задерживают белковые молекулы с молекулярной массой выше 30 000 Д, препятствуя развитию выраженной гипопроteinемии.

Использование метода гель-хроматографии для оценки молекулярно-массового распределения белков и пептидов в биологических жидкостях, ультрафильтрате после процедуры продленной заместительной почечной терапии позволяет с высокой точностью выявить не только количественный, но и качественный характер удаляемых из плазмы эндогенных токсинов — пептидов группы СМ, тем самым позволяет оценить эффективность проводимой детоксикационной процедуры.

Удаление из плазмы крови и поступления в УФТ пептидных соединений, относящихся к группе СМ как продуктов ограниченного протеолиза белка, с одной стороны оказывают выраженный детоксикационный эффект, а с другой, без соответствующей корригирующей и заместительной терапии может быть причиной выраженного отрицательного азотистого баланса у этих пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Николайчик, В. В.* Молекулярные механизмы развития эндогенной интоксикации и совершенствование путей детоксикации : автореф. дис. ... д-ра. мед. наук / В. В. Николайчик. М., 1984. 44 с.
2. *Об использовании* метода гель-фильтрации для определения тяжести интоксикации и эффективности детоксикационных процедур : метод. письмо / В. В. Николайчик [и др.]. 1983. 22 с.
3. *Детерман, Г.* Гель-хроматография / Г. Детерман. М. : Мир, 1970. 251 с.
4. *Дэвени, Т.* Аминокислоты, пептиды, белки / Т. Дэвени, Я. Гергей. М. : Мир, 1976. 364 с.