

МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

МОЛЕКУЛЯРНО-МАССОВОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С СИНДРОМОМ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ

Бурдашкина К.Г.

УО «Белорусский государственный медицинский университет»,

кафедра биоорганической химии

г. Минск

Актуальность. Нарушение протеиназно-ингибиторного баланса при многих тяжелых видах патологии приводит к появлению и накоплению большого количества продуктов деградации белков с молекулярной массой 300-5000 Д. В норме эти соединения, именуемые «средними молекулами» (СМ), присутствуют в жидкостных средах организма в незначительных количествах, и только при развитии патологического процесса, сопровождающегося активацией протеолиза и истощением антипротеолитического потенциала, их концентрация резко возрастает, отражая степень патологического белкового метаболизма (3).

Для выделения фракции пептидов группы СМ в клинике применяются экспресс-методы прямого спектрофотометрического определения с помощью осаждения белковых фракций трихлоруксусной кислотой (1, 4). Однако эти методы нечетко отражают уровень СМ из-за ряда существенных недостатков, которые были учтены и устранены в методе Николайчика и соавт (5). Данная методика включает осаждение белков хлорной кислотой и доосаждение кислотостабильных компонентов 80% этанолом с последующим спектрофотометрированием при длине волны 210 нм, максимально приближенной к поглощению пептидной связи. Тем не менее, несмотря на высокую точность и воспроизводимость, этот метод достаточно длителен.

Наиболее точно фракцию СМ можно выделить хроматографическими методами. Жидкостная, газовая хроматография и масс-спектрометрия позволяют достаточно оперативно разделить пул СМ на индивидуальные компоненты и идентифицировать их, что представляет интерес в научных исследованиях для дальнейшего изучения биологической активности СМ (7). Однако и данные методы не нашли широкого распространения в клинической практике, так как требуют дорогостоящего оборудования и расходных материалов. Давно и широко в аналитической хроматографии биополимеров используется метод колоночной гель-хроматографии (ГХ) на различных типах носителей (2), который позволяет с достаточной точностью качественно и количественно изучать характер молекулярно-массового распределения (ММР) белково-пептидных компонентов плазмы здоровых людей и больных.

Хроматограммы молекулярно-массового состава белков и пептидов плазмы, полученные методом ГХ, наглядно иллюстрируют характер распределения продуктов деградации белков и изменения соотношения компонентов, входящих в состав пептидов, что позволило использовать при анализе их роли в патогенезе различных заболеваний.

Целью исследования было изучение характера распределения молекулярных масс белков и продуктов их деградации в плазме крови при различных патологических состояниях ГХ-методом.

Материалы и методы. Проведена оценка данных гель-хроматографического фракционирования плазмы крови 34 больных с различной патологией, находящихся на лечении в 9 ГКБ в период с 1984 по 1990 г. Изучали ММР белков и пептидов плазмы крови пациентов по выставленным диагнозам: острая и хроническая почечная (ОПН, ХПН) и печёночная (ОПЧН, ХПЧН) недостаточность, возникновение ОПН на почве синдрома тяжелой эндогенной интоксикации различной этиологии. Для разделения плазмы крови применялись колонки с сефадексом G-50 Fine, в качестве элюирующего раствора использовали 0,9% NaCl. Полученные

фракции спектрофотометрировали при 230 нм. Расчет концентрации (г/л) общего пула СМ вели по стандартному пептиду ангиотензину ($M_w=1046$ Д).

Результаты и их обсуждение. Профиль фракционирования белков плазмы крови здорового человека на сефадексе G-50 Fine представляет собой три четко выраженных пика: 1 – зона выхода высокомолекулярных белков ($M_w > 20\,000$ Д), 2 – среднемолекулярные пептиды (M_w от 5000 до 500 Д); 3 – низкомолекулярные соединения (аминокислоты) с $M_w < 500$ Д (рис.1). Концентрация СМ в плазме крови здоровых людей варьирует в пределах 0,01–0,11 г/л (6). Гель-хроматограммы представлены в координатах зависимости оптической плотности ($ОП_{230}$) от величины V_e/V_0 (отношение объема выхода исследуемого вещества к свободному объему колонки) для сопоставления результатов, полученных в различных экспериментах, или от № собранных фракций.

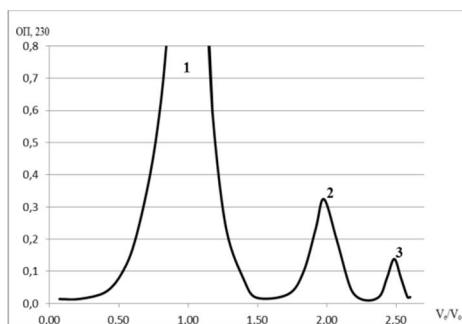


Рисунок 1. – Гель-хроматограмма плазмы крови доноров на сефадексе G-50 Fine

Спектр ММР белков и продуктов их деградации в плазме крови при различных патологических ситуациях имеет характерные черты. Количественные и качественные изменения в белково-пептидном составе плазмы наблюдаются при патологии почек. Так, при ХПН характер ММР описывается кривой, где зона выхода СМ увеличивается и имеет вид остроконечного пика, что соответствует сравнительно однородной по молекулярной массе группе соединений (рис.2). Концентрация СМ, рассчитанная по ангиотензину, в среднем по группе ($n=9$) составляет $4,08 \pm 0,52$ г/л. В интервале между пиками в элюате белков не содержалось.

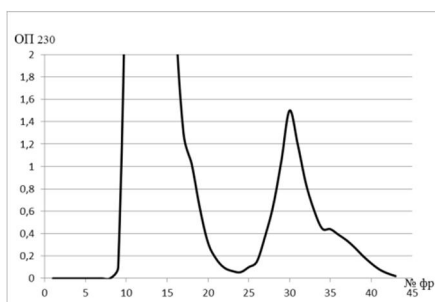


Рисунок – 2. Профиль элюции плазмы крови на сефадексе G-50 Fine при ХПН

Гель-хроматограммы плазмы больных с ХПЧН отражают нарастание пептидемии, а также существенные изменения соотношения компонентов, входящих в состав пептидов, о чем свидетельствует расширение пика СМ (рис.3). Концентрация СМ в группе пациентов с ХПЧН (n=25) составляет в среднем $1,99 \pm 0,2$ г/л.

У больных с синдромом тяжелой эндогенной интоксикации (острый гангренозный аппендицит, илеус, гнойный перитонит и др.) профиль ММР

характеризуется расширением пика фракции высокомолекулярных белков за счет сдвига правого плеча в сторону СМ (рис. 4). Это свидетельствует об активации эндопептидаз при развитии острого процесса, в результате чего образуются и накапливаются продукты промежуточного обмена белков с большей молекулярной массой, чем СМ, но меньшей, чем у крупномолекулярных белков. Появление характерного пика в зоне СМ наглядно отражает нарастание ОПН на почве тяжелой эндогенной интоксикации.

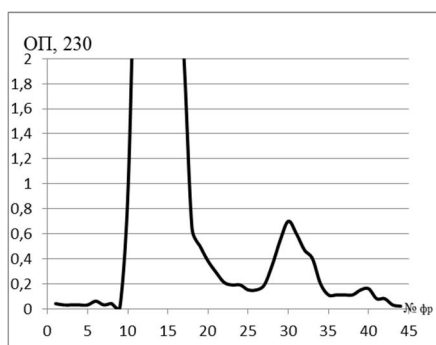


Рисунок – 3. Профиль элюции плазмы на сефадексе G-50 Fine при ХПЧН

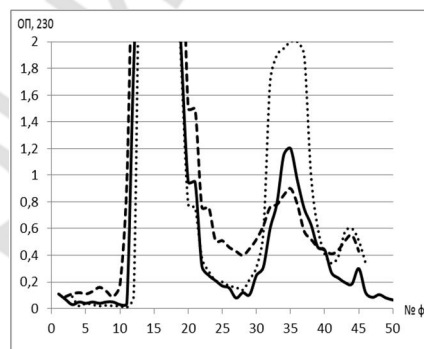


Рисунок 4. – Профили элюции плазмы на сефадексе G-50 Fine при эндотоксикации различного генеза с развитием ОПН

Выводы. Проведенный качественный анализ гель-хроматографических профилей молекулярно-массового распределения белков и пептидов плазмы крови при почечной и печёночной недостаточности показывает наличие характерных зон выхода белково-пептидных компонентов. Определение уровня пептидов группы СМ в плазме позволяет точно отразить степень и выраженность эндогенной интоксикации при различных острых и хронических патологических состояниях и адекватно оценивать эффективность лечения и проводимых детоксикационных мероприятий. При дальнейшем анализе ММР белков и продуктов их промежуточного обмена в плазме крови будет создана возможность объективной биохимической оценки характера патологического процесса, динамики течения заболевания и его осложнений.

Литература

1. Габриэлян Н.И., Дмитриев А.А., Кулаков Г.П., Мекикян А.М., Щербанева О.И. Диагностическая ценность определения средних молекул в плазме крови при нефрологических заболеваниях // Клин. мед. - 1981. - Т. LIX. - № 10. - С.38-42.
2. Детерман Г. Гель-хроматография. Изд-во Мир, М. 1970. – 251 с.
3. Карякина Е.В., Белова СВ. Молекулы средней массы как интегральный показатель метаболических нарушений (обзор литературы) // Клин. лаб. диаг. - 2004. - № 3. - С. 4-8.
4. Малахова М.Я. Метод регистрации эндогенной интоксикации: Методич. рекомендации. - СПб, 1995. - 33 с.
5. Николайчик В.В., Моин В.М., Кирковский В.В., Мазур Л.И., Лобачева Г.А., Бычко Г.Н., Бараташвили Г.Г. Способ определения «Средних молекул» // Лаб. дело, 1991. - № 10. – С.15-18.
6. Пилотович В.С., Соклаков В.И. Хроническая почечная недостаточность: интеграция и дифференциация лечения. – Мн.: «Мет», 1993. – 156 с.
7. Guohua Li, Jiegen Chu, Xiaohang Liu, Zhi Yuan. Separation, identification of uremic middle molecules, and preliminary study on their toxicity Clin Chim Acta. – 2004. – Vol. 350. P. 89–98.