

Бурдашкина К. Г., Бычко Г. Н., Лобачева Г. А.

**РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНО-МАССОВОГО
РАСПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ И ПРОДУКТОВ ИХ ПРОМЕЖУТОЧНОГО
ОБМЕНА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ ПАТОЛОГИИ**

УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск

Для многих тяжелых видов патологии характерно нарушение протеиназно-ингибиторного баланса, в результате которого происходит накопление 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 [1].

Для выделения фракции пептидов группы СМ в клинике применяются экспресс-методы прямого спектрофотометрического определения с помощью осаждения белковых фракций трихлоруксусной кислотой [2, 3]. Однако данные методы нечетко отражают уровень СМ из-за ряда существенных недостатков, которые были учтены и устранены в методе Николайчика и соавт. [4]. 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 [5]. Однако 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 [6], 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 данной работы было изучение характера распределения молекулярных масс белков и продуктов их деградации в плазме крови при различных патологических состояниях ГХ-методом.

Проведена оценка данных гель-хроматографического фракционирования плазмы крови 290 больных с различной патологией, находящихся на лечении в 9-й ГКБ в период с 1984 по 1990 гг. 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 длинах волн 230 и 280 нм. Расчет концентрации (г/л) общего пула СМ вели по стандартному пептиду ангиотензину ($M_w = 1046$ Д).

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).

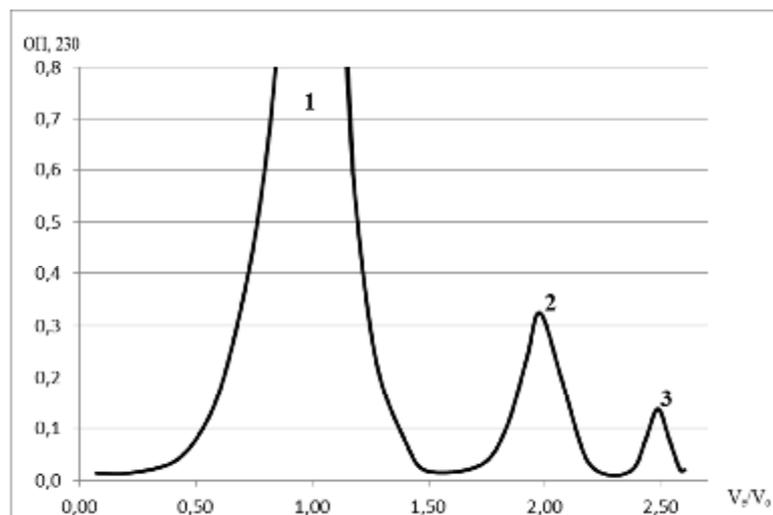


Рис. 1. Гель-хроматограмма плазмы крови доноров на сефадексе G-50 Fine

Концентрация СМ в плазме крови здоровых людей варьирует в пределах 0,01–0,11 г/л [7]. 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.

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, на которой зона выхода СМ представлена значительно увеличенным остроконечным пиком, что соответствует сравнительно однородной по молекулярной массе группе СМ (рис. 2). Концентрация СМ, рассчитанная по ангиотензину, составляет в среднем $4,08 \pm 0,52$ г/л. В интервале между пиками в элюате белков не содержалось.

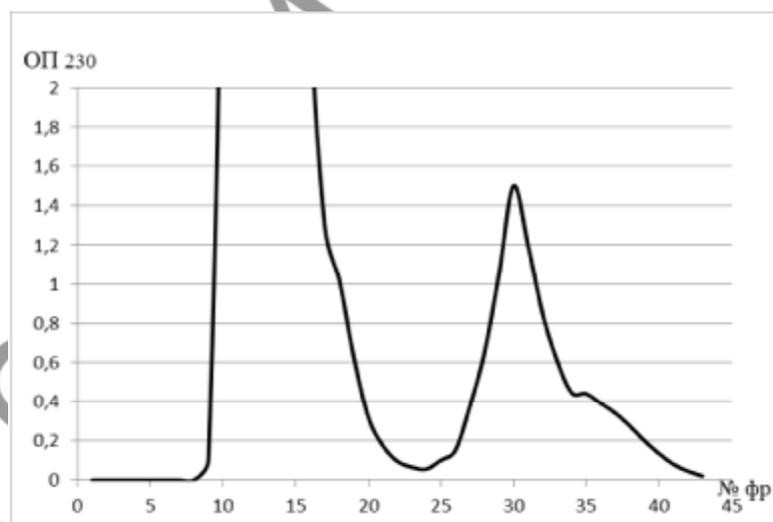


Рис. 2. Профиль элюции плазмы крови на сефадексе G-50 Fine при ХПН

Гель-хроматограммы плазмы больных с ХПЧН отражают нарастание пептидемии, а также существенные изменения соотношения компонентов, входя-

щих в состав пептидов, о чем свидетельствует расширение пика СМ (рис. 3). Концентрация СМ в группе пациентов с ХПЧН составляет в среднем $1,99 \pm 0,2$ г/л.

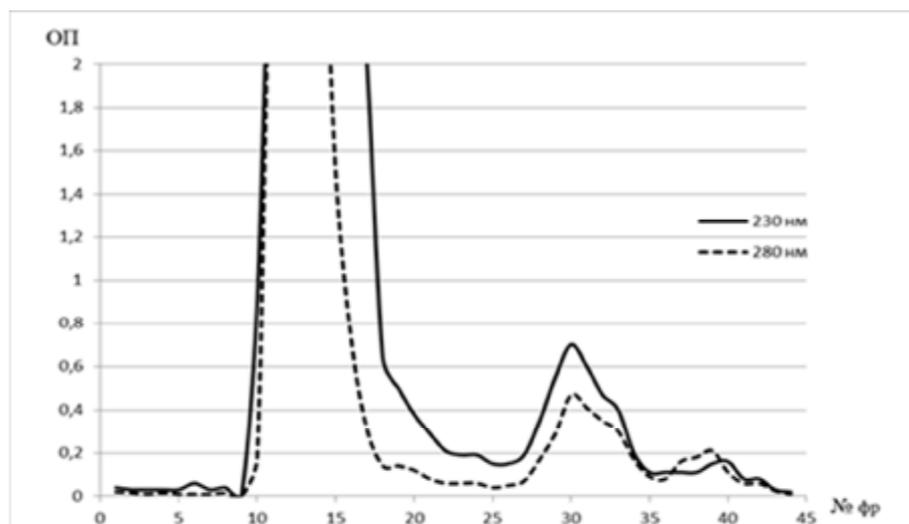


Рис. 3. Профиль элюции плазмы на сефадексе G-50 Fine при ХПЧН

В группе больных с синдромом тяжелой эндогенной интоксикации (гнойный перитонит, сепсис, флегмоны, илеус и др.) профиль ММР характеризуется расширением пика фракции высокомолекулярных белков за счет сдвига правого плеча в сторону СМ (рис. 4).

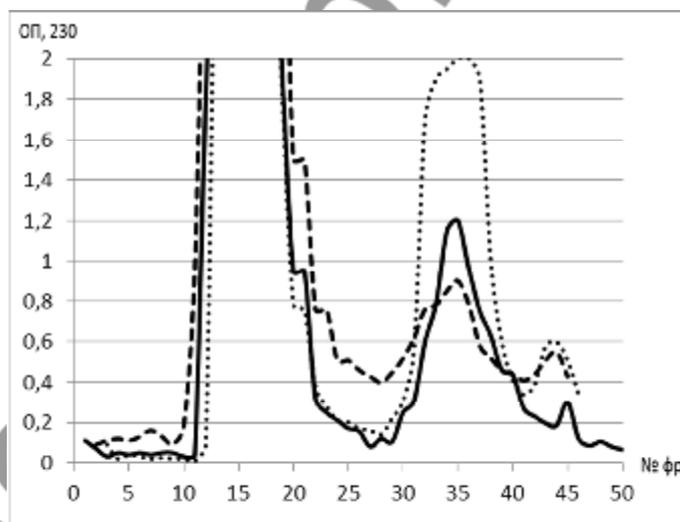


Рис. 4. Профиль элюции плазмы на сефадексе G-50 Fine при эндотоксикации различного генеза с развитием ОПН

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.

Проведенный качественный анализ гель-хроматографических профилей молекулярно-массового распределения белков и пептидов плазмы крови при почечной и печёночной недостаточности показывает наличие характерных зон вы-

хода 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. *Карякина, Е. В.* Молекулы средней массы как интегральный показатель метаболических нарушений (обзор литературы) / Е. В. Карякина, С. В. Белова // *Клин. лаб. диагн.* 2004. № 3. С. 4–8.
2. *Диагностическая* ценность определения средних молекул в плазме крови при нефрологических заболеваниях / Н. И. Габриэлян [и др.] // *Клин. мед.* 1981. Т. LIX, № 10. С. 38–42.
3. *Малахова, М. Я.* Метод регистрации эндогенной интоксикации : метод. рекомендации / М. Я. Малахова. СПб, 1995. 33 с.
4. *Способ* определения «Средних молекул» / В. В. Николайчик [и др.] // *Лаб. дело.* 1991. № 10. С. 15–18.
5. *Separation, identification of uremic middle molecules, and preliminary study on their toxicity* / Li Guohua [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* 2004. Vol. 350. P. 89–98.
6. *Детерман, Г.* Гель-хроматография / Г. Детерман. М. : Мир, 1970. 251 с.
7. *Пилотович, В. С.* Хроническая почечная недостаточность : интеграция и дифференциация лечения / В. С. Пилотович, В. И. Соклаков. Минск : Мет, 1993. 156 с.