

УДК 541.64:546.26:535.371

*В.О. ШАБЛОВСКИЙ, Е.В. КОРОЛИК, Е.А. КОРОЛЕНКО, А.В. ТУЧКОВСКАЯ,
А.К. КОРОЛИК, Ф.И. КАЗАКОВ, В.В. КИРКОВСКИЙ, О.В. ИВАШИНА*

УГОЛЬНЫЕ ГЕМОСОРБЕНТЫ ДЛЯ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОЙ ОЧИСТКИ КРОВИ И ОЦЕНКА ИХ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДИРОВАНИЯ

The technology of producing of the coal hemosorbents with numerous functional groups is offered in the present work. This technology allows getting anionic and cationic hydrophobic metabolites from blood plasma. Also, it has been shown by using methods of fluorescent probes and biochemical analysis that hemosorbents made from ion-exchange resin «Purolite» possessed high purification range especially to the uncharged and cationic hydrophobic metabolites. At the same time these sorbents do not change the content of total protein and albumin in blood plasma that appears them safe for plasmadsorption performing.

Угольные гемосорбенты широко применяются в клинической практике при коррекции синдрома эндогенной интоксикации, сопровождающей ряд тяжелых заболеваний [1, 2]. К рекомендуемым для

применения в клинике сорбентам предъявляются высокие требования, обусловленные их контактом с кровью: высокая механическая прочность и сорбционная активность, однородный гранулометрический состав, минимальное травмирование форменных элементов крови, отсутствие токсических свойств [3–5].

Лечебный эффект от применения угольных гемосорбентов (УГС) достигается за счет адсорбции широкого спектра гидрофобных и гидрофильных метаболитов и токсинов, что делает гемосорбцию достаточно эффективной. Многие биологически активные вещества, в том числе и низкомолекулярные гидрофобные соединения, транспортируются в крови в виде комплекса с белками [6]. Наиболее адекватным и информативным подходом к диагностике эндогенной интоксикации является тестирование связывающей способности основных транспортных белков, осуществляющих сорбцию и перенос гидрофобных метаболитов и лекарственных препаратов в организме. К важнейшим транспортным системам крови относятся сывороточный альбумин человека (САЧ), липопротеины (ЛП) и α -1-кислый гликопротеин (АГП), которые отличаются друг от друга не только структурой, но и различной степенью сродства к определенным видам низкомолекулярных лигандов и обладают относительной специфичностью в связывании разнозаряженных лигандов [7, 8]. Для оценки связывающей способности основных транспортных белков плазмы крови в настоящее время используется метод флуоресцентного зондирования, принцип которого заключается в оценке параметров связывания гидрофобных флуоресцентных зондов с транспортными белками. При этом применяется набор флуоресцентных зондов с различными зарядами, квантовый выход флуоресценции которых значительно повышается при связывании с транспортными белками, и, таким образом, флуоресценция этих зондов в первую очередь определяется их связанной фракцией [9–11]. Это позволяет оценить связывающую способность транспортных белков плазмы крови к гидрофобным метаболитам. Основную роль в процессе связывания с белками играет заряд молекулы низкомолекулярных гидрофобных лигандов: анионные преимущественно сорбируются САЧ [12–14], катионные – АГП [13, 15], а незаряженные распределяются между ЛП и САЧ [16, 17]. Поэтому связывание низкомолекулярных гидрофобных токсинов 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).

Цель данной работы – оценить эффективность экспериментальных партий угольных гемосорбентов, пригодных для гемосорбции в клинических условиях с использованием метода флуоресцентного зондирования и данных биохимического анализа.

Материал и методика

Для решения поставленной задачи были получены экспериментальные партии угольных сорбентов из различного исходного сырья – макропористые синтетические смолы: катионообменная КУ-23, анионообменная АН-221, анионообменная смола фирмы «Purolite» – аналог АН-221.

При стандартных способах получения активированных углей путем парогазовой активации карбонизатов и последующего окисления в структуре получаемого сорбента могут существовать группы кислотного типа (фенольные, карбоксильные и др.). Поскольку токсины в плазме крови могут быть заряжены как отрицательно, так и положительно, а также быть электронейтральными, то дополнительные активные функциональные группы УГС должны быть соответственно кислотного и щелочного характера. Для формирования УГС с функциональными щелочными группами необходимо специальным образом вводить в структуру группы, содержащие азот, например, в форме пиридинового кольца.

Одной из особенностей предлагаемой в работе технологии получения экспериментальных УГС является использование в качестве исходного сырья макропористых ионообменных смол на основе полистиролдвинилбензольной матрицы, которые изначально имеют большой сорбционный объем и размер пор [18]. Однако при термической и термохимической деструкции пористость резко снижается [19]. Для предотвращения «схлопывания» пор нами производилась предварительная пропитка исходных смол так называемыми неорганическими полимерными связками – щелочными на основе силикатов и кислыми на основе алюмофосфата [20], которые имеют жидкую консистенцию при нормальных условиях, а при термообработке полимеризуются. Таким образом, при карбонизации ионообменных смол указанные связки являются армирующими агентами, препятствующими уменьшению исходной пористости ионитов. По окончании синтеза армирующие материалы легко отмываются из активированных углей.

Активированные угли согласно предложенной технологии получали в восстановительной среде при изменении температуры от 400 до 650 °С. При нижней температурной границе синтеза формируются частично карбонизированные угли с содержанием углерода 90÷92, при верхней – так называемые угольные с содержанием углерода 96÷98%. Дальнейшее увеличение температуры считаем нецелесообразным вследствие образования графитированных углей.

При получении сорбентов варьировалась пористость исходного сырья, изменялись режимы карбонизации и активирования (табл. 1). Адсорбционный объем пор определялся эксикаторным методом [21].

Таблица 1

Характеристика синтезированных сорбентов

№ образца	Исходное сырье	Армирующая связка	Температура карбонизации и активирования, °С	Адсорбционный объем пор по бензолу, см ³ /г
1	КУ-23 (стенд № 1)	Силикат	400	0,22
2	КУ-23 (стенд № 2)	Алюмофосфат	600	0,26
3	АН-221 (стенд № 3)	Силикат	500	0,45
4	АН-221 (стенд № 4)	Алюмофосфат	600	0,45
5	АН-221 (стенд № 5)	Алюмофосфат	650	0,55
6	«Purolite» (стенд № 6)	Алюмофосфат	600	0,85
7	«Purolite» (стенд № 7)	Алюмофосфат	650	0,90

Для моделирования процесса гемосорбции вне организма были проведены динамические стендовые опыты по стандартной методике [2] на плазме крови больных циррозом печени с использованием полученных сорбентов. Образцы плазмы отбирались до начала проведения стендовых опытов на 20-й минуте сорбции из отводящей магистрали после колонки и после окончания проведения опытов (через 90 мин работы). В качестве стабилизатора был взят гепарин. Условия перфузии были максимально приближены к ситуациям, имеющим место в процессе проведения гемосорбции в реальных клинических условиях.

В работе были использованы различные гидрофобные флуоресцентные зонды: АНС («Реахим», Москва, Россия); ХК («Реахим», Москва, Россия); НК («Sigma», St. Louis, Mo., USA). Зонды НК и ХК растворялись в этиловом спирте. Конечная концентрация этанола в исследованных образцах плазмы крови не превышала 2%. Зонд АНС растворяли в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,4 со 100 мМ NaCl. Оптимальные условия для использования зондов приведены в табл. 2.

Таблица 2

Оптимальные условия использования флуоресцентных зондов

Зонд	Заряд	Концентрация зонда, мкМ	Разведение плазмы	Условия регистрации флуоресценции
АНС	Анионный	65	1:100	Спектр в области 400÷650 нм; $\lambda_B=370$ нм; $\lambda_{max}=475$ нм
ХК	Катионный	1	1:15	Спектр в области 540÷720 нм; $\lambda_B=520$ нм; $\lambda_{max}=605$ нм
НК	Незаряженный	2	1:5	Спектр синхронного сканирования; $\lambda_B=480\div650$ нм; $\lambda_{рег}=495\div665$ нм; $\Delta\lambda=15$ нм

Спектры зондовой флуоресценции регистрировались при комнатной температуре на спектрофлуориметре SFL-1211A («Солар», Минск, Беларусь). Флуоресцентные данные анализировались с помощью значения пиковых интенсивностей зондов как показатель общей связывающей способности транспортных белков. Для зонда АНС определялась интенсивность его флуоресценции, нормированная на единицу концентрации альбумина ($I/C_{САЧ}$) [11]. В случае же зонда НК регистрировались спектры флуоресценции в режиме синхронного сканирования по длинам волн возбуждения и эмиссии при постоянной разности между ними $\Delta\lambda = 15$ нм и определялось отношение интенсивностей флуоресценции липопротеин-связанного при $\lambda_{max}=554$ нм и альбумин-связанного при $\lambda_{max}=592$ нм зонда

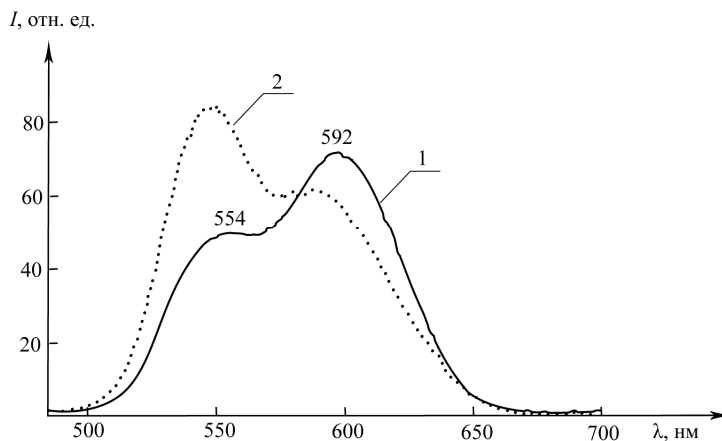
НК – I_{554}/I_{592} , отражающее распределение НК между этими двумя фракциями в плазме крови [10] (рисунок).

Был проведен также биохимический анализ каждого образца плазмы крови на содержание общего белка, альбумина, молекул средней массы (МСМ), общего билирубина.

Результаты и их обсуждение

С целью выбора оптимальных технологических условий получения гемосорбентов было изучено распределение флуоресцентных зондов (АНС, НК, ХК) между САЧ, ЛП и АГП в плазме крови и проанализированы данные биохимического анализа, при моделировании процесса плазмсорбции (стендовые опыты) на указанных модификациях угольных сорбентов с использованием плазмы крови больных циррозом печени.

В условиях стендовых экспериментов перфузия плазмы крови больных циррозом печени через колонку с угольными сорбентами на основе КУ-23 (стенды № 1, 2) не сопровождалась изменением параметров флуоресцентных зондов НК и ХК. Однако для зонда АНС (стенд № 1) его относительная интенсивность возрастала, что свидетельствует об увеличении связывающей способности молекул САЧ по отношению к анионным лигандам в процессе плазмсорбции (табл. 3). По данным биохимического анализа, проведение плазмсорбции на этих сорбентах приводит к снижению концентрации общего билирубина, в том числе и непрямого, уменьшению содержания МСМ и общего белка, оставляя практически неизменным содержание альбумина в плазме крови (табл. 4). Однако, несмотря на относительно положительные характеристики этих сорбентов, не удалось получить гемосорбенты с однородным составом гранул и их адсорбционный объем пор был очень мал. Поэтому в дальнейших исследованиях смолы КУ-23 не использовались.



Спектры синхронного сканирования флуоресценции зонда НК в плазме крови здорового донора (1) и пациента с циррозом печени (2)

Таблица 3

Параметры флуоресцентных зондов в плазме крови больных циррозом печени в процессе плазмсорбции

АНС			НК			ХК		
$I_{C_{SAЧ}}$			I_{554}/I_{592}			I		
До	20 мин	После	До	20 мин	После	До	20 мин	После
Здоровый донор (среднее значение)								
13,6±1,0			0,77±0,07			4,0±0,5		
Стенд № 1 (КУ-23/400 °С)								
4,0	4,5	5,2	0,93	0,88	0,91	4,3	4,0	3,9
Стенд № 2 (КУ-23/ 600 °С)								
4,0	4,7	4,4	0,93	0,90	0,88	4,3	4,0	4,2
Стенд № 3 (АН-221/500 °С)								
7,8	10,2	11,6	1,54	1,37	1,43	4,9	6,5	5,7
Стенд № 4 (АН-221/600 °С)								
8,9	9,6	9,3	1,56	1,49	1,52	4,9	4,6	4,7
Стенд № 5 (АН-221/650 °С)								
5,2	5,7	6,9	1,28	1,28	1,27	5,0	4,3	4,2
Стенд № 6 («Purolite»/600 °С)								
9,1	8,8	9,0	1,37	1,33	1,37	5,4	5,2	5,1
Стенд № 7 («Purolite»/650 °С)								
9,9	8,7	8,2	1,32	1,23	1,16	7,2	5,8	5,4

Были исследованы модификации сорбентов на основе анионообменной смолы АН-221, различающиеся условиями получения (см. табл. 1). Как видно из табл. 3 (стенды № 3–5), эффективность делигандизации крови от гидрофобных соединений различными сорбентами неодинакова. Так, прохождение плазмы крови больных циррозом печени через колонку с угольным сорбентом (стенд № 4) не сопровождалось изменением параметров зондов АНС, НК и ХК. Для других сорбентов (стенды № 3, 5) наблюдается повышение связывающей способности молекул САЧ к анионным лигандам (по данным

зонда АНС). Следует отметить, что только один сорбент (стенд № 3) удаляет нейтральные гидрофобные метаболиты (по данным зонда НК). Все рассмотренные сорбенты снижают содержание МСМ, общего билирубина и очень незначительно влияют на содержание общего белка и альбумина в плазме крови (см. табл. 4). Однако анионообменная смола АН-221 не обладает высокой осмотической стабильностью и при пропитке армирующей связкой этого ионита происходит в значительной степени деструкция гранул. Это в конечном итоге приводит к получению большого количества нетоварных угольных гемосорбентов. Анионообменная смола фирмы «Purolite», являющаяся аналогом АН-221, лишена этих недостатков.

Таблица 4

Изменения основных биохимических показателей плазмы крови больных циррозом печени в процессе плазмсорбции

Общий белок, г/л			Альбумин, г/л			МСМ, г/л			Общий билирубин, мкм/л		
Норма											
60±80 ±3,0			35±55 ±3,0			≤ 0,51 ±0,02			8,5±20,5 ±1,0		
До	20 мин	После	До	20 мин	После	До	20 мин	После	До	20 мин	После
Стенд № 1 (КУ-23/400 °С)											
63,0	58,8	54,6	18,2	16,0	16,0	1,04	0,78	0,69	328,0	311,6	295,2
Стенд № 2 (КУ-23/ 600 °С)											
63,0	58,8	58,8	18,2	16,7	16,7	1,04	0,93	0,68	328,0	311,6	304,6
Стенд № 3 (АН-221/500 °С)											
59,8	52,5	50,4	18,9	18,5	16,7	0,61	0,43	0,24	410,4	361,2	336,4
Стенд № 4 (АН-221/600 °С)											
50,4	46,2	46,2	19,8	16,6	16,6	0,37	0,32	0,29	426,8	336,4	377,6
Стенд № 5 (АН-221/650 °С)											
75,6	67,2	65,0	26,7	25,2	21,8	0,82	0,63	0,41	385,6	352,8	336,4
Стенд № 6 («Purolite»/600 °С)											
60,6	54,6	54,6	24,9	22,0	21,6	0,63	0,45	0,28	84,1	65,6	71,8
Стенд № 7 («Purolite»/650 °С)											
60,9	56,7	56,7	25,7	24,9	24,1	0,84	0,45	0,26	98,5	90,3	82,0

Были получены модификации сорбентов на основе макропористой анионообменной смолы фирмы «Purolite» (см. табл. 1). Анализ спектров флуоресценции зондов АНС, НК и ХК в плазме крови при проведении стендовых экспериментов показал, что исследованные сорбенты не оказывают существенного влияния на содержание гидрофобных метаболитов, за исключением сорбента, используемого в стенде № 7, который эффективно удаляет нейтральные и катионные гидрофобные метаболиты (см. табл. 3). Согласно биохимическому анализу все модификации гемосорбентов на основе смолы «Purolite» практически не оказывают влияния на содержание общего белка и альбумина, эффективно удаляют МСМ, приводят к снижению содержания общего билирубина (см. табл. 4).

Надо отметить, что все исследованные сорбенты на основе анионообменных смол эффективно удаляют МСМ в течение всего периода плазмсорбции, в то время как максимальное уменьшение содержания билирубина происходит в основном на 20-й минуте сорбции.

Таким образом, разработанная технология получения угольных гемосорбентов с широким спектром функциональных групп позволяет извлекать из плазмы крови гидрофобные метаболиты как анионной, так и катионной природы. Методами флуоресцентного зондирования и биохимического анализа показано, что сорбенты на основе ионообменной смолы «Purolite» обладают высокими делигандизирующими свойствами, особенно по отношению к нейтральным и катионным гидрофобным метаболитам. При этом они практически не влияют на содержание общего белка и альбумина, что делает их безопасными при проведении плазмсорбции.

1. Лопаткин Н.А., Лопухин Ю.М. Эфферентные методы в медицине. М., 1989. С. 351.
2. Кирковский В.В. Детоксикационная терапия при перитоните. Мн., 1997. С. 190.
3. Николаев В.Г., Стрелко В.В. Гемосорбция на активированных углях. Киев, 1979. С. 285.
4. Стрелко В.В., Галинская В.И., Давыдов В.И. и др. // Адсорбция и адсорбенты. 1976. № 4. С. 29.
5. Лопухин Ю.М., Молоденков М.Н. Гемосорбция. М., 1985. С. 287.
6. Галактионов С.Г., Цейтин В.М., Леонова В.И. // Биоорг. химия. 1984. № 1. С. 5.
7. Кукес В.Г. Клиническая фармакология. М., 1999. С. 528.
8. Холфорд Н.Х.Г., Бенет Л.З. Базисная и клиническая фармакология / Под ред. Б.Г. Катцунга. М., 1998. С. 53.
9. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Л. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М., 1980. С. 320.
10. Ivanov A.I., Gavrilov V.B., Furmanchuk D.A. et al. // Clin. Exp. Med. 2002. Vol. 2. P. 147.

11. Короленко Е.А., Королик Е. В., Королик А.К. и др. // ЖПС. 2007. № 4. С. 507.
12. Meijer D.K.F., Van der Sluijs P. // Pharm. Res. 1989. Vol. 6. P. 105.
13. Herve F., Urien S., Albengres E. et al. // Clin. Pharmacokinet. 1994. Vol. 26. P. 44.
14. Kragh-Hansen U. // Dan. Med. Bull. 1990. Vol. 37. P. 57.
15. Kremer J.M.H., Wilting J., Janssen L.M.H. // Pharmacol. Rev. 1988. Vol. 40. P. 1.
16. Tokui T., Kuroiwa C., Muramatsu S. et al. // Biopharm. Drug Dispos. 1995. Vol. 16. P. 91.
17. Wasan K.M., Cassidy S.M. // J. Pharm. Sci. 1998. Vol. 87. P. 411.
18. Ионный обмен / Под ред. М.М. Сенявина. М., 1981.
19. Тулупов П.Е. Стойкость ионообменных материалов. М., 1984.
20. Сычев Н.М. Неорганические клеи. М., 1986.
21. Грег С., Синг К. Адсорбция, удельная поверхность, пористость. М., 1970.

Поступила в редакцию 07.04.09.

Владимир Ольгертович Шабловский – кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник НИИФХП БГУ.

Елена Викторовна Королик – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник ИФ НАН Беларуси.

Елена Алексеевна Короленко – научный сотрудник ИФ НАН Беларуси.

Алла Васильевна Тучковская – старший научный сотрудник НИИФХП БГУ.

Анна Константиновна Королик – научный сотрудник ЦНИЛ БГМУ.

Фидель Иванович Казаков – младший научный сотрудник ЦНИЛ БГМУ.

Валерий Васильевич Кирковский – доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией гемо- и лимфосорбции ЦНИЛ БГМУ.

Ольга Владимировна Ивашина – младший научный сотрудник НИИФХП БГУ.