

УДК 541.64:547.455.623

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ АНТИПРОТЕИНАЗНЫЙ ГЕМОСОРБЕНТ

© 2019 г. И. Л. Валуев¹ *, Л. И. Валуев¹, Л. В. Ванчугова¹, И. В. Обыденнова¹

¹Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН, Москва, 119991, Россия

*e-mail: valuev@ips.ac.ru

Поступила в редакцию 15.03.2018 г.

После доработки 19.07.2018 г.

Подписано в печать 25.07.2018 г.

Предложен способ повышения тромборезистентности биоспецифического антипротеиназного гемосорбента путем одновременной иммобилизации в объеме полиакриламидного гидрогеля овомукоида из белка утиных яиц и антикоагулянта крови — гепарина или гирудина. Показано, что модификация гемосорбента гирудином приводит к существенному повышению его совместимости с кровью при сохранении высокой емкости по отношению к сериновым протеиназам.

Ключевые слова: гемосорбент, овомукоид утки, гирудин, гепарин

DOI: 10.1134/S0555109919010173

Операции гемосорбции можно отнести к относительно новому способу лечения заболеваний, основанному не на традиционных методах лечения введением в организм лекарственных препаратов, а на выведении из организма токсичных соединений. Хотя такие способы удаления токсинов из живого организма уже давно известны (например кровопускание и применение рвотных и слабительных веществ), только в 40-х гг. прошлого века появился диализ крови через полупроницаемые полимерные мембраны для удаления из нее низкомолекулярных соединений. В 60-х гг. метод гемосорбции, внеорганный очищение крови с временным замещением детоксикационной функции печени, стал широко применяться в традиционной медицине [1]. К гемосорбентам, непосредственно контактирующим с кровью, предъявляются достаточно жесткие требования, главными из которых являются избирательность сорбции, высокая поглощающая способность и совместимость с кровью. Они не должны сорбировать или травмировать жизненно важные компоненты крови, включая ее форменные элементы, белки и ферменты, изменять электролитный баланс, компоненты свертывающей системы, артериальное давление и другие медико-биологические показатели.

Большинству из этих требований в значительной степени отвечает биоспецифический гемосорбент “Овосорб”, созданный в ИНХС РАН совместно с ИНБИ РАН и БелНИИ гематологии и переливания крови и предназначенный для селективного извлечения из крови активных протеолитических ферментов. Гемосорбент представляет собой полиакриламидный гидрогель, в

котором иммобилизован овомукоид из белка яиц утки — гликопротеин с ММ 31000 Да, способный ингибировать сериновые протеиназы, образуя с ними неактивные комплексы с константами диссоциации порядка 10^{-8} М [2]. Овомукоид эффективно связывает трипсин, α -химотрипсин, катепсин, панкреатическую и нейтрофильную эластазы, а также бактериальные протеиназы, не изменяя содержание предшественников и ингибиторов этих ферментов. Клинические данные свидетельствуют о высокой эффективности этого гемосорбента в коррекции нарушений белкового метаболизма и связанных с ними системных нарушений. Селективно удаляя из гемокрикуляции активные формы протеиназ, “Овосорб” в отличие от угольных гемосорбентов и сорбентов на основе ионообменных смол не обладает свойством неспецифической сорбции ингибиторов протеиназ и других индивидуальных белков плазмы, что приводит к нормализации метаболических процессов поддержания гомеостаза в целом. Этот гемосорбент находит применение для лечения гнойного перитонита, сепсиса, ожоговой и лучевой болезни, бронхиальной астмы, печеночной и почечной недостаточности и других заболеваний, сопровождающихся активацией протеолиза и ферментативной интоксикацией [3–5].

Изучение особенностей применения гемосорбента в клиниках, наряду с безусловно положительными клиническими результатами, выявило необходимость решения задачи повышения его тромборезистентности. В экспериментах *in vitro* было показано, что контакт нативной крови с гемосорбентом приводит к ее свертыванию в течение

ние 5–7 мин. В связи с этим, для предотвращения свертывания крови в процессе проведения операции гемосорбции пациентам вводят антикоагулянт крови — гепарин (1.0 мг на 1 кг массы) с последующей его нейтрализацией протаминсульфатом [5]. Данный фактор весьма существенен, поскольку протаминсульфат может вызывать аллергические реакции или гемодинамические нарушения. При введении в больших количествах он обладает антикоагулянтным действием, что может привести к повышенной кровопотери [6]. В связи с этим возникает задача снижения содержания используемого при гемосорбции антикоагулянта, что может быть достигнуто повышением совместимости с кровью самого гемосорбента.

Цель работы — изучение возможности повышения тромборезистентности гемосорбента при сохранении его емкости по протеолитическим ферментам.

МЕТОДИКА

В работе использовали акриламид, N,N'-метиленисакриламид, персульфат аммония, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин ("Serva", Германия), гепарин, гирудин, трипсин и α -химотрипсин ("Sigma", США). Овомукоид выделяли из белка яиц утки по методике [2].

Гемосорбент синтезировали путем радикальной полимеризации при комнатной температуре водного раствора, содержащего 8.0% масс. акриламида, 0.8% масс. N,N-метиленисакриламида, ненасыщенных производных овомукоида (0.9% масс.) и гепарина или гирудина (0.08–0.15% масс.). Реакцию полимеризации проводили под действием окислительно-восстановительной каталитической системы: персульфат аммония — N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин. Образующийся гидрогель измельчали с помощью механического пресса через сито с диаметром пор 1 мм и промывали 0.5 М бикарбонатом аммония, pH 8.0, до полного удаления не прореагировавших соединений.

Для получения ненасыщенного производного овомукоид (100 мг) растворяли в 20 мл 0.5 М бикарбоната аммония, pH 8.0, раствор охлаждали до 0–5°C, добавляли 0.01 мл хлорангидрида акриловой кислоты и смесь перемешивали в течение 15 мин.

Аналогичным образом синтезировали ненасыщенные производные гепарина и гирудина.

Количество иммобилизованного в гемосорбенте овомукоида определяли по разнице между исходной его концентрацией и его концентрацией в промывных водах.

Для определения емкости гемосорбент помещали в колонку объемом 25 мл и через него пропускали водный раствор с pH 7.4 или плазму кро-

ви человека, содержащие 2.0 мг трипсина и 1.1 мг α -химотрипсина в 3.0 мл 0.1 М трис-HCl буфера, pH 7.4, до полного насыщения сорбента. Количество связавшегося фермента определяли спектрофотометрическим методом при 280 нм после его удаления с сорбента 0.1 М HCl, pH 1.5.

Для определения времени свертывания крови 2.0 г гемосорбента инкубировали в стеклянной пробирке с 5.0 мл крови и определяли время образования сгустка крови.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Основная задача предотвращения тромбообразования в процессе проведения операции гемосорбции без нежелательного воздействия на свертывающую систему всей крови заключается в концентрировании ее антикоагулянта в объеме гемосорбента, исключающего его выделение в системное кровообращение. В данной работе это достигалось иммобилизацией в объеме гемосорбента антикоагулянта крови, в качестве которого использовали гепарин или гирудин.

Гепарин — кислый мукополисахарид с молекулярной массой около 16000, состоящий из остатков глюкуроновой кислоты и глюкозамина, этерифицированных серной кислотой является естественным противосвертывающим фактором [7]. Механизм его действия заключается, в основном, в нейтрализации свертывающей активности тромбина путем ускорения его реакции с антитромбином III [8–10]. Его применяют для профилактики и терапии различных тромбоэмболических заболеваний и их осложнений, а также для поддержания жидкого состояния крови в аппаратах искусственного кровообращения и в аппаратуре для гемодиализа и гемосорбции [11].

Гирудин — полипептид, выделяемый из слюнных желез медицинских пиявок или получаемый рекомбинантным способом, состоит из 65 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 12000. Основная биологическая функция гирудина заключается в предотвращении свертывания крови за счет нейтрализации свертывающей активности тромбина при образовании комплекса тромбин–гирудин [12, 13]. Гирудин является антикоагулянтом прямого действия. В отличие от гепарина он не вступает в реакцию с другими факторами системы свертывания крови и оказывает свое ингибирующее действие на тромбин без участия каких-либо находящихся в крови компонентов. В связи с этим в последние годы этот пептид получил широкое распространение при лечении заболеваний или состояний, при которых гепаринотерапия оказывается недостаточно эффективной, например, в остром периоде инфаркта миокарда, при нестабильной стенокардии и т.д.

Таблица 1. Свойства гемосорбентов

Параметр	Исходное значение	Гепарин, % масс.			Гирудин, % масс.		
		0.08	0.10	0.15	0.08	0.10	0.15
Время свертывания крови, мин	5–6	15–16	19–20	23–24	17–18	20–21	25–26
Емкость, мг фермента/мг овомукоида	1.82 ± 0.06	1.60 ± 0.04	1.45 ± 0.06	1.27 ± 0.07	1.95 ± 0.09	1.88 ± 0.08	1.90 ± 0.09

Таблица 2. Параметры крови до и после контакта с гемосорбентом

Проба	Время свертывания крови, мин ± 1.0	Тромбоциты, тыс ± 10	Лейкоциты, тыс ± 0.3	Эритроциты, млн ± 0.4
Исходн. значение	7	220	9.5	4.5
На выходе из колонки	28	190	8.9	3.9
Из бедренной артерии после окончания операции	6	210	9.3	4.5

Имобилизация этих антикоагулянтов в объеме гемосорбента на стадии его получения, как и ожидалось, приводила к существенному увеличению времени свертывания крови при ее контакте с ним. При этом, чем выше содержание гепарина или гирудина, тем больше время свертывания крови (табл. 1).

В проявлении полимером тромборезистентных свойств важная, если не определяющая, роль принадлежит степени изменения нативной конформации белков крови в результате их контакта с поверхностью полимера. В настоящее время индикатором конформационных изменений белков принято считать систему комплемента [14]. У человека она состоит из 21 белка глобулиновой природы. Компоненты этой системы свободно циркулируют в крови в форме неактивных предшественников, которые активируются, в том числе и в результате взаимодействия с чужеродным материалом, и приобретают свойства ферментов. Ферментативную активность оценивали, измеряя время полулизиса эритроцитов барана человеческой сывороткой до и после ее контакта с гемосорбентом в течение 60 мин при 37°C. Было обнаружено, что контакт сыворотки с исходным и модифицированными гемосорбентами не приводил к заметному изменению ее ферментативной активности, которая находилась на уровне активности сыворотки после ее контакта с контролем, в качестве которого использовали поверхность гемосовместимой гидратцеллюлозной мембраны для гемодиализа — Купрофан [14]. Это свидетельствовало о том, что контакт сыворотки со всеми образцами гемосорбента не сопровождался изменением нативной конформации содержащихся в ней белков, а наблюдаемое повышение тромборезистентности в результате модификации гемо-

сорбентов антикоагулянтами, в основном, обусловлено инактивацией тромбина. Для ответа на вопрос, как быстро организм восстанавливает свертывающую способность крови, был поставлен следующий эксперимент. Кровь из бедренной артерии собаки вводили в нижнюю часть колонки, содержащей 50 мл модифицированного гемосорбента, а затем из ее верхней части кровь вливали в бедренную вену собаки. Скорость гемоперфузии составляла 100 мл/мин, а общий объем крови — 1840 мл. Операцию проводили в течение 30 мин. Результаты приведены в табл. 2.

Видно, что организм достаточно быстро нейтрализовал изменения не только в свертывающей системе крови, но и восстанавливал незначительное понижение количества форменных элементов крови. Следует отметить, что на гемосорбентах на основе активированных углей количество лейкоцитов после операции может снижаться на 50–60%. [1].

Таким образом, модификация гемосорбента антикоагулянтами крови действительно приводила к существенному увеличению его тромборезистентности, причем изменения в крови носили локальный характер и быстро нейтрализовались в живом организме.

Было обнаружено, что модификация гирудином не сопровождалась снижением эффективности связывания протеиназ иммобилизованным овомукоидом, в то время как использование гепарина приводило к заметному (почти на 30%) ее снижению. Можно предположить, что вероятной причиной этого явления было появление отрицательного заряда на гемосорбенте при иммобилизации отрицательно заряженного гепарина. В результате этого локальное значение pH в объеме гемосорбента смешалось в кислую область. Это

изменяло условия гемосорбции, поскольку оптимальное значение pH взаимодействия овомукоида с сериновыми протеиназами равно 8.0 [15]. Если это так и происходило, то увеличение pH раствора должно приводить к повышению емкости гемосорбента. Действительно, увеличение pH модельного раствора с 7.4 до 8.2 повышало эффективность сорбции гемосорбентом, содержащим гепарин и от 1.60 ± 0.04 до 1.83 ± 0.06 мг фермента на 1 мг овомукоида.

Таким образом, полученные результаты свидетельствовали о том, что наиболее эффективным способом создания тромборезистентных антипротеиназных гемосорбентов являлась одновременная иммобилизация в объеме гидрогеля ингибитора протеиназ и незаряженного антикоагулянта крови прямого действия.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФАНО (тема 3, шифр научного направления 45, государственная регистрация АААА-А18-118011990207-1).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лопухин Ю.М., Молоденков М.Н. Гемосорбция. М.: Медицина, 1978. 311 с.
2. Шульгин М.Н., Валуева Т.А., Кестере А.Я., Мосолов В.В. // Биохимия. 1981. Т. 46. № 3. С. 473–480.
3. Plate N.A., Valuev L.I., Valueva T.A., Chupov V.V. // Biomaterials. 1993. V. 14. № 1. P. 51–56.
4. Kirkovsky V.V., Antiperovich O.F., Valueva T.A., Moin V.M., Lobacheva G.A., Berezkina O.G. // Biomaterials. 1994. V. 15. № 5. P. 334–337.
5. Plate N.A., Kirkovsky V.V., Antiperovich O.F., Nicolaichik V.V., Valueva T.A., Sinilo S.B., Moin V.M., Lobacheva G.A. // Biomaterials. 1994. V. 15. № 4. P. 285–288.
6. Carr J.A., Silverman N. // J. Cardiovasc. Surg. (Torino). 1999. V. 40. № 5. P. 659–666.
7. Ульянов А.М., Ляпина Л.А. Успехи современной биологии. 1977. Т. 83. № 1. С. 69–85.
8. Зубауров Д.М. Биохимия свертывания крови М.: Медицина, 1978. 259 с.
9. Henry B.L., Desai U.R. // Thromb Res. 2014. V. 134. № 5. P. 1123–1129.
10. Chan H.H., Leslie B.A., Stafford A.R., Roberts R.S., Al-Aswad N.N., Fredenburgh J.C., Weitz J.I. // Biochemistry. 2012. V. 51. № 40. P. 7964–7973.
11. Машковский А.Д. Лекарственные средства. М.: Медицина, 2002. Т. 2. 530 с.
12. Markwardt F. // Methods in Enzymol. 1970. V. 19. P. 924–932.
13. Kovach I.M., Kakalis L., Jordan F., Zhang D. // Biochemistry. 2013. V. 52. № 14. P. 2472–2481.
14. Биосовместимость / Ред. Севастьянов В.И. М.: ГУП “Информационный центр ВНИИгеосистем”, 1999. 367 с.
15. Мосолов В.В. Протеолитические ферменты. М.: Наука, 1971. 404 с.

Modified Antiproteinase Hemosorbent

I. L. Valuev^{a,*}, L. I. Valuev^a, L. V. Vanchugova^a, and I. V. Obydenнова^a

^aTopchiev's Institute of Petrochemical Synthesis, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: valuev@ips.ac.ru

Received March 15, 2018

Revised July 19, 2018

Accepted July 25, 2018

A method for increasing the thromboresistance of biospecific antiproteinase hemosorbent by simultaneous immobilization in the polyacrylamide hydrogel ovomucoid from duck eggs white and anticoagulant of blood — heparin or hirudin. It is shown that the modification of hemosorbent with hirudin leads to a significant increase in its compatibility with blood, while maintaining a high capacity in relation to serine proteinases.

Keywords: hemosorbent, duck ovomucoid, hirudin, heparin