

УДК 677.494-614:577.15

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНАЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМ НА ДИАЛЬДЕГИДЦЕЛЛЮЛОЗЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИМ КОМПЛЕКСОМ ИЗ ГЕПАТОПАНКРЕАСА КРАБА

А.А. Белов, Л.А. Белова, В.Н. Филатов, Е.Н. Белова, Г.Н. Донских, М.Н. Горбунова

(НИИ текстильных материалов РИА, Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ, РХТУ им. Д.И. Менделеева)

Изучено взаимодействие протеолитического комплекса из гепатопанкреаса краба (ПК), целлюлозы, диальдегидцеллюлозы (ДАЦ) и иммобилизованного на ДАЦ ПК, используемых в медицинской и косметологической практике, с основными ингибиторами протеиназ плазмы крови. Показано защитное действие текстильного носителя на иммобилизованные ферменты по отношению к внешней среде.

В настоящее время разрабатываются материалы с иммобилизованными на тканевой основе различными ферментными препаратами (лизозим, коллитин, протеолитический комплекс из гепатопанкреаса краба (ПК) и др.) и физиологически активными веществами (мексидол, диметилсульфоксид, мочевины и др.)*. Данные композиции используют для лечения гнойно-некротических ран различной этиологии, а также в косметологии [1, 2]. Повышенное внимание к полиферментным препаратам объясняется их доступностью, простотой выделения и относительно небольшой стоимостью (обычно их цена в десятки, а то и сотни раз ниже, чем стоимость индивидуальных ферментов, получаемых из различных источников). ПК представляет собой набор эндопротеиназ и экзопептидаз и применяется в медицине в виде растворов и различных мазей [3]. При использовании этих препаратов в качестве раневых покрытий (перевязочных средств), необходимо учитывать взаимодействие иммобилизованных веществ и носителей с белками плазмы крови.

В плазме крови человека, наряду с иммуноглобулинами и альбуминами, имеется большое количество защитных белков – ингибиторов протеолиза (около 10% от общего содержания функционально активных белков). Ингибиторный потенциал крови представлен по крайней мере 8 белками: среди них особое значение для клиники имеют α_1 -протеиназный ингибитор (α_1 ПИ), α_2 -макроглобулин (α_2 -М), антитромбин III, α_2 -антиплазмин и С1-инактиватор [4]. Ингибитор α_1 ПИ (ранее называемый α_1 -антитрипсином) отвечает за 90% антитриптической активности плазмы крови [5]. Когда выяснилось, что физиологическое значение имеет торможение этим ингибитором протеиназ лейкоцитов, а не

трипсина, он был переименован. Этот гликопротеид ($M_r = 54000$ Да), имеющий самую высокую концентрацию, изучен более других ингибиторов плазмы [6]. Взаимодействие α_1 ПИ с протеиназами гранулоцитов происходит мгновенно, и комплекс очень трудно диссоциирует ($K_{инг}$ для таких комплексов составляет $10^{-9} - 10^{-11}$ М) [7]. В активном центре α_1 ПИ содержится метионин, который легко окисляется, вследствие чего ингибитор теряет активность [8]. Белок α_2 М – самый большой из всех белков-ингибиторов ($M_r = 725000$ Да) – несколько отличается по механизму антипротеолитического действия от остальных ингибиторов плазмы крови и представляет собой ловушку для протеиназ. В отличие от классического механизма ингибирования протеиназа, находясь в комплексе с α_2 М, сохраняет свойство гидролизовать низкомолекулярные субстраты, а кроме того, может взаимодействовать с ингибиторами не очень большого размера (6500–20000 Да), т.е. ее активный центр экранирован, но не блокирован ингибитором [7]. В силу особенностей своего антипротеолитического действия α_2 М отличается широкой специфичностью и тормозит активность протеиназ всех классов: сериновых, тиоловых, металло- и карбоксильных [6–9]. Порозное время полужизни протеиназы и α_2 М в кровотоке составляет ~1 сут, а его комплексы имеют период полужизни 1–2 мин [8, 9]. Причем соотношение ингибитор : фермент может составлять 1:1, 1:2 и 1:3 [9].

По данным литературы [8, 10–12], α_1 -протеиназный ингибитор α_1 ПИ), (α -1-антихимотрипсин (α_1 АХТ), α -2-макроглобулина (α_2 М) и интер- α -ингибитор трипсина (И α И) контролируют развитие инфекции и воспалительных процессов. Причем некоторые из этих ингибиторов являются белками острой фазы и могут быть

*Научно-исследовательский институт текстильных материалов выпускает иммобилизованные на текстильных носителях биологически активные вещества, в том числе трипсин, имеющий торговое название Дальтекс-трипсин (ФС 42-3008-99).

использованы в диагностических и прогностических целях. Наибольший интерес, на наш взгляд, представляют α_1 ПИ и α_2 М, так как α_1 ПИ – главный антипротеолитический фактор плазмы крови, а α_2 М является “чистильщиком” крови.

Целью настоящей работы являлось изучение взаимодействия ПК, целлюлозы, диальдегидцеллюлозы (ДАЦ) и иммобилизованного на ДАЦ ПК, используемых в медицинской и косметологической практике, с основными ингибиторами протеиназ плазмы крови.

Экспериментальная часть

В работе использовали протеолитический комплекс (ПК) из гепатопанкреаса краба (НПО “Биопродесс” МО г. Щелково, Россия), этиловый эфир N-бензоил-D,L-аргинина (BzArgOEt), трис(оксиметил)-аминометан (“Sigma”, США), казеин по Гаммерстену (Россия), трипсин (“Spofa”, Чехия), ингибитор трипсина из бобов сои (“Reanal”, Венгрия).

В качестве носителя в настоящей работе использовали ДАЦ, полученную в результате периодатного окисления целлюлозных тканых полотен. Степень окисления 1% означает, что из 100 звеньев целлюлозы окислено одно с образованием 2 альдегидных групп. Количество альдегидных групп на ДАЦ определяли либо конденсацией в кислой спиртовой среде с гидроксиламином, либо окислением йодом в слабощелочных условиях [13]. Для иммобилизации использовали ДАЦ со степенью окисления $5,2 \pm 0,8\%$.

Иммобилизацию ПК проводили в оптимальных условиях, сохранение протеолитической активности ПК после иммобилизации (до высушивания иммобилизованного препарата) составило 100%.

Содержание белка на носителе определяли по методу Лоури–Гартли [14]. В качестве контрольного использовали носитель, обработанный теми же растворами, что и опытные образцы, но без фермента. Для построения калибровочной кривой использовали водный раствор фермента. Содержание белка на носителе составило для образцов, содержащих три фракции, $5,2 \pm 2,0$ мг/г (в таблицах данный образец обозначен как ДАЦ–ПК), для образцов, отмытых от сорбированного белка водой и $0,1$ М NaCl – $2,5 \pm 1,2$ мг/г (в таблицах данный образец обозначен как ДАЦ–ПК+ $0,1$ М NaCl).

Протеолитическую активность иммобилизованного ПК определяли методом Кунитца (гидролиз 1%-го раствора казеина по Гаммерстену в $1/15$ М фосфатном буфере, pH 8,0 [15]). Она составила 700 ± 80 ; $0,63 \pm 0,07$ и $0,12 \pm 0,07$ ПЕ/г для немодифицированного ПК, для образцов ДАЦ–ПК и ДАЦ–ПК+ $0,1$ М NaCl соответственно.

Эстеразная активность немодифицированного ПК по BzArgOEt составила $3,8$ мкмоль/мг мин, а по BzTyrOEt – $1,0$ мкмоль/мг мин [5].

Для изучения взаимодействия текстильных материа-

Таблица 1

Взаимодействие ингибиторов плазмы крови с раствором ПК в зависимости от времени совместной инкубации и концентрации ПК в растворе

Ингибитор	Время совместной инкубации ПК и плазмы крови, ч	Ингибирующая активность при объеме ПК, мкл		
		0	25	50
α_2 М	0,25	$6,1 \pm 0,2$	$4,3 \pm 0,4$	$3,6 \pm 0,5$
	1,0	$6,3 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,5$	$3,6 \pm 0,6$
	24,0	$6,0 \pm 0,3$	$4,0 \pm 0,3$	$2,6 \pm 0,4$
α_1 ПИ	0,25	$28,0 \pm 3,5$	$19,4 \pm 2,5$	$13,3 \pm 2,0$
	1,0	$28,0 \pm 3,5$	$22,7 \pm 3,0$	$13,9 \pm 1,5$
	24,0	$25,6 \pm 3,5$	$22,8 \pm 3,0$	$13,7 \pm 2,0$

лов и ингибиторов плазмы крови образцы носителей инкубировали с плазмой крови (соотношение носитель (вес):плазма (объем) = 1:6,1:10,1:18,1:20) при комнатной температуре. Аликвоты плазмы отбирали через 15 мин, 1 и 24 ч, разбавляли их в 10 раз физиологическим раствором и определяли активность ингибиторов. В специально проведенных опытах было установлено, что изучаемые ингибиторы плазмы крови не подвергаются значительному (в пределах погрешности измерений) расщеплению (с потерей ингибиторной активности) самим ПК. С этой целью раствор плазмы инкубировали при комнатной температуре с раствором ПК (концентрация ПК в физиологическом растворе составляла 5 мг/мл) и через разные интервалы времени определяли остаточную ингибирующую активность, используя в качестве контроля ингибирующую активность раствора плазмы крови без ПК. Полученные данные приведены в табл. 1. Активность α -2-макроглобулина (α_2 М) определяли по остаточной активности трипсина, по гидролизу этилового эфира N-бензоил-L-аргинина после обработки пробы ингибитором трипсина из сои [5]. Активность α -1-протеиназного ингибитора измеряли по остаточной активности трипсина [5], отбирая для пробы 100 мкл разбавленной в 50 раз плазмы и 10 мкг трипсина.

Результаты и обсуждение

Было изучено взаимодействие ПК, целлюлозы, ДАЦ и иммобилизованного на ДАЦ ПК, используемых в медицинской и косметологической практике, с двумя основными ингибиторами протеиназ плазмы крови: α_2 М и α_1 ПИ.

Как было установлено в работе [16], ПК содержит в своем составе помимо истинной коллагеназы, различные протеазы, что и объясняет его широкую субстратную специфичность и уникальные терапевтические свойства.

При изучении взаимодействия иммобилизованного фермента с белками плазмы крови необходимо учиты-

вать, что фермент, содержащийся на носителе после иммобилизации, можно условно разделить на три составляющие: 1) механически включенный, 2) сорбированный, 3) ковалентно связанный.

Механически включенный фермент образуется за счет пропиточного раствора после удаления влаги с носителя. Эта часть фермента образует “ударную дозу” и выходит с носителя в первую очередь. Большая часть этого фермента взаимодействует с тканевыми ингибиторами протеиназ, а оставшаяся свободной (не образовавшая комплекс с ингибиторами) часть начинает процесс протеолиза гнойного отделяемого. В зависимости от условий иммобилизации количество этой фракции может достигать 15%.

Сорбированный фермент, связанный с носителем за счет ионных, водородных, ван-дер-ваальсовых связей и за счет неспецифической сорбции (как молекулами ДАЦ, так и самой немодифицированной целлюлозы). Это самая большая фракция, она обеспечивает депо-свойства наших препаратов.

Ковалентно связанный фермент – это фермент, связанный азометиновой связью аминокетонами белка, не входящими в активный центр, с альдегидными группами ДАЦ. Причем следует иметь в виду, что часть ковалентно связанного фермента может переходить в раствор вследствие гидролитической деструкции носителя в виде растворимых и нерастворимых высокомолеку-

Т а б л и ц а 2

Взаимодействие α_1 ПИ и α_2 М с целлюлозными носителями, не содержащими ПК

Носитель	Время взаимодействия, ч	Соотношение носитель (вес): плазма (объем)	Сорбция, %	
			α_1 ПИ	α_2 М
Целлюлоза	0,25	1:10	5±5	0
		1:20	6±4	0
ДАЦ		1:6	35±10	25±5
		1:10	12±7	7±3
		1:18	7±7	10±5
Целлюлоза	1	1:10	5±5	8±3
		1:20	8±3	0
ДАЦ		1:6	48±5	42±8
		1:10	18±7	11±5
		1:18	25±6	10±8
Целлюлоза	24	1:10	0	9±6
		1:20	–	–
ДАЦ		1:6	–	–
		1:10	20±8	37±7
		1:18	–	–

Т а б л и ц а 3

Взаимодействие иммобилизованного ПК с α_1 ПИ и α_2 М в плазме крови (соотношение матрица (вес): плазма крови (объем) = 1:10)

Носитель	Время контакта, ч	Сорбция, %	
		α_1 ПИ	α_2 М
ДАЦ	1	17,5±5,0	11±5
	24	20±5	37±5
ДАЦ-ПК	1	28±5	15±5
	24	60±6	72±8
ДАЦ-ПК + 0,1 М NaCl	1	15±10	11±5
	24	35±8	49±5

лярных фрагментов. Чем выше степень окисления ДАЦ и чем более щелочное значение pH среды, тем легче и быстрее идет процесс гидролитической деструкции. Также следует иметь в виду, что в процессе хранения целлюлозный носитель деструктурирует.

В табл. 2, 3 приведены данные об изменении активности двух основных ингибиторов плазмы (за 100% принято содержание соответствующего ингибитора в образце плазмы) при взаимодействии с вышеперечисленными препаратами. При изучении взаимодействия эндогенных ингибиторов трипсина плазмы крови с ПК, иммобилизованным на ДАЦ, необходимо учитывать, что уменьшение активности ингибиторов плазмы крови может происходить в результате следующих процессов: 1) взаимодействие ферментов ПК с ингибиторами; 2) сорбция ингибиторов на ДАЦ и возможная модификация активных центров ингибиторов альдегидными группами носителя; 3) окисление метионина активного центра ингибитора (для α_1 ПИ) [8].

Как видно из данных табл. 2, сорбция ингибиторов на целлюлозных носителях зависит от соотношения плазмы и целлюлозного носителя. Немодифицированная целлюлоза в отличие от ДАЦ обладает незначительной неспецифической сорбцией белковых молекул, процесс взаимодействия эндогенных ингибиторов протеиназ плазмы крови с иммобилизованным ПК растянут во времени, что связано, по-видимому, с защитным действием текстильного носителя (табл. 3).

Как было установлено в работе [17], санитарно-гигиенические свойства (такие как водопоглощение, воздухопроницаемость и др.) как самих носителей, так и препаратов иммобилизованных на них биологически активных веществ после их модификации йодной кислотой и иммобилизации фермента, не отличаются от соответствующих показателей необработанной медицинской марли. А сорбционные и химические свойства модифицированной целлюлозы и медицинской марли различны. Причем чем больше степень окисления

целлюлозы [18], выше температура, более щелочное значение рН, тем легче протекает гидролитическая деструкция носителя, что способствует высвобождению фермента, находящегося в глубине пор целлюлозы. Диаметр пор хлопковой целлюлозы приблизительно равен среднему гидродинамическому диаметру молекул ферментов (трипсин, химо tripsин, рибонуклеаза и др.)

[19]. В процессе деструкции происходит выделение во внешнюю среду фермента, находящегося в порах после иммобилизации.

Таким образом, представленный материал позволяет сделать вывод о защитном действии текстильного носителя на иммобилизованные ферменты по отношению к внешней среде.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Машковский М.Д.* // Лекарственные средства. М., 1993. С. 58.
2. *Толстых П.И., Гостищев В.К., Арутюнян Б.Н.* и др. Протеолитические ферменты, иммобилизованные на волокнистых материалах, в хирургии. Ереван, 1990. С. 136.
3. *Лютлова Л.В., Карabasова М.А., Руденская Г.Н.* и др. // Вопр. мед. хим. 1998. Вып. 3. **44**. С. 292.
4. *Веремеенко К.Н.* // Врачебное дело. 1987. № 5. С. 45.
5. *Нартикова В.Ф., Пасхина Т.С.* // Вопр. мед. хим. 1979. **25**. С. 494.
6. *Werle E., Zickgraf-Rudel G.* //Z. klin. Chem. und klin Biochem. 1972. **10**. S. 139.
7. *Travis J., Salvesen G.S.* //Annu.Rev.Biochem. 1983. **52**. P. 655.
8. *Fuchs H.E., Shifman M.A., Pizzo S.V.* // Biochem. Biophys. Acta. 1982. **716**. P. 151.
9. *Дубровин С.М., Муромцев А.В., Новикова Л.И.* // Клин. лаб. Диагностика. 2000. №6. С. 3.
10. Клиническая оценка лабораторных тестов. М., 1986.
11. *Fritz H., Jochum M., Duswald K.N.* // Proteinases in inflammation and tumor invasion. Berlin–N.Y., 1986.
12. *Hachulla E., Laine A., Blaringham T. et al.* // Presse Med. 1996. **25**. P. 661.
13. *Белов А.А., Рьльцев В.В., Гриценко С.И.* // Сб. научн. тр. ВНИИТГП. М., 1990. С. 36.
14. *Белов А.А., Плеханова Н.Ю., Вирник Р.Б., Игнатюк Т.Е.* // Сб. научн. тр. ВНИИТГП. М., 1988. С. 25.
15. *Белов А.А., Рьльцев В.В., Игнатюк Т.Е.* // Химико-фармацевтический журнал. 1992. № 11–12. С. 101.
16. *Климова О.А., Чеботарев В.Ю.* // Бюлл. эксп. биологии и медицины. 1999. **128**. С. 308.
17. *Самойлова Т.И., Рьльцев В.В., Коварский А.В., Петрова Н.А.* // Сб. научн. тр. ВНИИТГП. М., 1988. С. 29.
18. *Рьльцев В.В., Вирник Р.Б.* // Антибиотики и химиотерапия. 1989. **34**. С. 202.
19. *Коликов В.М., Мчедлишвили Б.В.* Хроматография биополимеров на макропористых кремнеземах. Л., 1986. С. 63.

Поступила в редакцию 25.10.02