

ОДЕРЖАННЯ БАРВНИК-ЛІГАНДНИХ АФІННИХ СОРБЕНТІВ, ПРИДАТНИХ ДЛЯ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ФАКТОРІВ ЗГОРТАННЯ КРОВІ

Т. В. Даниш

Інститут патології крові та трансфузійної медицини АМН України

Синтезовані сорбенти на основі макропористих кремнеземних носіїв та лігандів — активних барвників тріазинової групи, придатні для виділення протеїназ трипсинового типу з плазми крові.

Синтезовані сорбенти на основі макропористих кремнеземів, які містять в якості лігандів, в активні тріазинові барвники. Вивчені фізико-хімічні властивості одержаних сорбентів, які свідчать про їх високу стабільність, легкість регенерації, стійкість до дії мікроорганізмів, хімічних речовин та стерилізації. Досліджені сорбційно-десорбційні властивості синтезованих сорбентів щодо протромбіну, тромбіну, альбуміну, факторів згортання крові VIII та IX, які продемонстрували їх придатність для виділення та очищення цих білків. Синтезовані сорбенти відрізняються за специфічністю сорбції різноманітних білків. Ця специфічність зумовлена присутністю різноманітних за властивостями замісників у барвників-лігандів і здійснюється, очевидно, за змішаним типом за участі каталітичного активного центру фермента та центрів зв'язування субстратів (інгібіторів), гідрофобної та іонної взаємодії. З використанням біоспецифічної хроматографії на синтезованих кремнеземних сорбентах створені технологічні схеми виділення та очищення досліджуваних білків з утильних фракцій переробки донорської плазми крові.

Ключові слова: ПЛАЗМА КРОВІ, СЕРИНОВІ ПРОТЕЇНАЗИ, ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ, ТРІАЗИНОВІ БАРВНИКИ, КРЕМНЕЗЕМНІ СОРБЕНТИ.

Проблема переробки донорської плазми крові та інших біологічних рідин з метою створення ефективних лікарських та діагностичних білкових препаратів є актуальною. На сьогодні в літературі опубліковано значну кількість методів фракціонування плазми крові, виділення та очищення її компонентів, зокрема, факторів згортання крові та фібринолізу. Особливо привабливими з точки зору ефективності є методи з використанням біоспецифічної хроматографії. Зокрема, застосування макропористих кремнеземів у якості матриць для виділення та очищення білкових факторів плазми крові [1–3]. На практиці продемонстровано можливість прив'язки до таких матриць різного роду лігандів з метою створення біоафінних сорбентів, придатних для вибіркової сорбції білків різного походження та специфічності дії.

Особливу групою лігандів для афінної хроматографії є активні тріазинові барвники. Це найдешевші із всіх відомих лігандів, оскільки вони використовуються, в основному, в якості текстильних барвників і промислове виробництво їх вимірюється тонами. Проте, на фоні великої кількості робіт з вивчення придатності цих барвників для очищення альбуміну та нуклеотидзалежних ферментів, досліджень, присвячених виділенню протеїназ трипсинового типу, зокрема з плазми крові, з використанням цих лігандів, недостатньо.

Метою нашого дослідження було синтезувати групу сорбентів на основі макропористих кремнеземів з різноманітними лігандами-барвниками тріазинової групи,

вивчити їх сорбційно-десорбційні властивості, та експериментально обґрунтувати їх придатність для виділення серинових протеїназ трипсинового типу з плазми крові.

Матеріали і методи

У роботі використовували тріс-(гідроксиметил)амінометан, додецилсульфат натрію, N,N,N',N'-тетраметилетилендіамін, поліетиленгліколь ПЕГ-6000, каолін («Acros Organics», Бельгія), мертіолат — препарат «Тімеросал», кумасі діамантовий голубий G-250 та R-250, N,N'-метилен-бісакриламід, акриламід, амонію персульфат («Merck», Німеччина), кефалін («Ренам», «Технология-Стандарт», Росія). Застосовувались наступні барвники: Cibacron Brilliant Yellow 3G-P, Procion blue HB («Acros Organics», Бельгія), Procion blue MX-R, Procion yellow H-E3G («Fluka», Швейцарія), Procion gelb M-4R («Serva», Німеччина), Procion Red MX5B, Reactive brown 10, Reactive red 120, Reactive green 5, Reactive green 19 («Sigma-Aldrich», США), Активний яскраво-оранжевий КХ, Активний фіолетовий 4К, Активний яскраво-голубий КХ, Активний яскраво-червоний 5СХ, Активний бордо 4 СГ, Активний червоний 4ЖТ, поліетиленгліколь ПЕГ-115 («Барва», Івано-Франківськ).

Матрицею для синтезу хроматографічних сорбентів був Діасорб амінопропіловий 800/70, фракція 0,25–0,50 (ЗАТ «БиоХимМак Ст.», Росія). Синтез здійснювали за методикою «з включенням солі» [4].

Вихідною сировиною для одержання препаратів були фракції I, II+III або III плазми крові за Коном, які зберігали при температурі -30°C до 1 року.

Концентрат протромбінового комплексу одержували з вихідної II+III чи III фракцій плазми крові згідно з роботою Даниш Т. В. [5]. Процедуру вірусінактивзації здійснювали сольвент-детергентним методом відповідно до Магеровський Ю. В. та ін. [6].

Для аналізу чистоти одержаних препаратів проводили вертикальний електрофорез у тонкому шарі поліакриламідного гелю ($T=10$ або $5-15\%$, $C=3,5\%$) у присутності $0,1\%$ розчину додецилсульфату натрію на приладах АВГЕ виробництва «Хийу Калур» (Естонія) чи VE-10 фірми Хеликон (Росія) у системі Леммлі [7] при напрузі $150-200\text{ В}$ протягом 3 годин. Білкові зони фарбували $0,2\%$ розчином кумасі діамантового голубого R-250 в 40% метанолі з 10% оцтовою кислотою, після попередньої фіксації трихлороцтовою кислотою. Незв'язаний барвник вимивали 10% розчином етанолу в 10% оцтовій кислоті. В якості білкових маркерів застосовувався набір PageRuler™ Unstained Protein Ladder виробництва Fermentas (Литва) (діапазон молекулярних мас від 10 до 200 кД).

Результати й обговорення

Основною перевагою кремнеземних сорбентів над органічними є висока стабільність, легкість регенерації, стійкість до дії мікроорганізмів, хімічних речовин та стерилізації. У літературі достатньо широко висвітлені дані про застосування активних тріазинових барвників у якості лігандів для хроматографічного виділення та очищення біомолекул. Ємність сорбентів з барвниками в $10-100$ разів вища, ніж у афінних сорбентів з імобілізованими нуклеотидами, а зв'язок тріазинів з сефарозою міцніший, ніж зв'язок лігандів після активації сефарози бромціаном. Все це разом і дешевизна визначає популярність сорбентів з тріазиновими барвниками.

Для визначення можливої специфічності лігандів-барвників та досліджуваних білків у модельному експерименті досліджували спектри поглинання у діапазоні довжин хвиль $190-700\text{ нм}$ розчинів вільних барвників, а також барвників у присутності очищеного тромбіну чи альбуміну. Зсув пікового поглинання при певній довжині хвилі для того чи іншого барвника в присутності білка може свідчити про їхню біоспецифічність (наявність взаємодії білок-

барвник). Так, серед досліджуваних барвників зсув максимуму поглинання спостерігався в межах від 5 до 25 нм (в основному, в бік з більшою довжиною хвилі).

Дослідження інгібуючого впливу вільних барвників на активність очищеного препарату тромбіну проводили шляхом визначення гальмування активності тромбіну в реакції фібриноутворення. Застосування природного субстрату тромбіну (фібриногену), а не синтетичних пептидних аналогів, мало для нас особливе значення. Відомо, що нативний тромбін у ході зберігання втрачає внаслідок автолізу каталітичні протеолітичні властивості стосовно фібриногену. Одночасно його естеразна активність зберігається. Це обумовлено тим, що тромбін має, крім активного центру, додаткові центри зв'язування субстратів. Для здійснення тромбіном реакції обмеженого протеолізу фібриногену, на відміну від гідролізу низькомолекулярних пептидних похідних, є необхідною участь більшої кількості взаємодій між ферментом та субстратом. Саме тому, дослідження впливу барвників на активність тромбіну відносно до фібриногену має суттєве значення, оскільки в цьому випадку визначається не тільки можливий інгібіторний ефект на активний центр ферменту, але й на центри зв'язування з субстратом.

Продемонстровано, що виражене інгібування активності тромбіну характерне для барвників Активний яскраво-голубий К, Procion blue HB та Procion Gelb M-4R [k_i в межах (10–30) мкМ]. Дещо слабшим був інгібуючий ефект на активність тромбіну інших досліджуваних барвників.

Попередні дослідження стали основою для синтезу сорбентів, матрицею для яких служив Діасорб амінопропіловий, з лігандами — активними тріазиновими барвниками: Cibacron Brilliant Yellow 3G-P, Procion blue HB, Procion blue MX-R, Procion yellow H-E3G, Procion gelb M-4R, Procion Red MX5B, Reactive brown 10, Reactive red 120, Reactive green 5, Reactive green 19, Активний яскраво-оранжевий КХ, Активний фіолетовий 4К, Активний яскраво-голубий КХ, Активний яскраво-червоний 5СХ, Активний бордо 4 СГ, Активний червоний 4ЖТ. Одержані сорбенти відмивали від незв'язаних барвників розчинами в наступній послідовності: дистильованою водою, 4 М розчином КСl, 25 % розчином ізопропанолу, 6 М розчином сечовини, дистильованою водою. Одержані сорбенти зберігали в розчині 25 % ізопропанолу.

На наступному етапі проводили дослідження сорбційно-десорбційних властивостей синтезованих сорбентів відносно до протромбіну, тромбіну, альбуміну, факторів згортання крові VIII та IX. Зв'язування білків та їх елюцію з сорбентів здійснювали при різних значеннях рН, іонної сили розчинів, у присутності конкурентних інгібіторів протеїназ чи гідрофобних чинників.

Одержані результати з застосування кремнеземних сорбентів з барвниками-лігандами для зв'язування та десорбції тромбіну дозволили втілити в практичну площину їх використання для виділення інших серинових трипсиноподібних протеїназ (факторів згортання VII, IX, X, плазміногену, урокінази та ін.). Наступним ферментом, який вдалося одержати в аналітичних кількостях із застосуванням барвників-лігандів, прив'язаних до Діасорбу, став фактор згортання IX.

Синтез великого набору (бібліотеки) сорбентів дозволив нам підійти до впровадження в лабораторії так званого експрес-аналізу досліджуваних зразків на наявність у них різних білкових компонентів і можливість їх розділення. Для прикладу, нам вдалося за один етап у м'яких умовах очистити від білкових домішок фактор згортання VIII з препарату «Кріопреципітат» (заявка на винахід № а 200906990, Україна).

Створені технології виділення та очищення протромбіну, тромбіну, альбуміну, факторів згортання крові VIII та IX з використанням біоспецифічної хроматографії на барвник-кремнеземних сорбентах лягли в основу лабораторних регламентів їх виробництва. Ці технології є охороноздатними і можуть бути також адаптовані при одержанні рекомбінантних білкових факторів.

Висновки

Синтезовані сорбенти на основі макропористих кремнеземів, які містять в якості лігандів, активні тріазинові барвники (Активний яскраво-оранжевий КХ, Активний фіолетовий 4К, Активний яскраво-голубий КХ, Активний яскраво-червоний 5СХ, Procion blue НВ, Procion blue МХ-R, Procion Yellow Н-Е3G, Procion Gelb М-4R, Cibacron Brilliant Yellow 3G-P, Procion Red МХ5В, Reactive brown 10, Reactive red 120, Reactive green 5, Reactive green 19).

Вивчені фізико-хімічні властивості одержаних сорбентів, які характеризують їх високу стабільність, легкість регенерації, стійкість до дії мікроорганізмів, хімічних речовин та стерилізації. Висока механічна жорсткість кремнеземних матриць дозволяє проводити процедуру хроматографічного розділення при високих швидкостях процесу.

Досліджені сорбційно-десорбційні властивості синтезованих сорбентів щодо протромбіну, тромбіну, альбуміну, факторів згортання крові VIII та IX, які продемонстрували їх придатність для виділення та очищення цих білків.

Синтезовані сорбенти відрізняються за специфічністю сорбції різноманітних білків. Ця специфічність зумовлена присутністю різноманітних за властивостями замісників у барвників-лігандів і здійснюється, на нашу думку, за змішаним типом за участі каталітичного активного центру фермента та центрів зв'язування субстратів (інгібіторів), гідрофобної та іонної взаємодії.

З використанням біоспецифічної хроматографії на синтезованих кремнеземних сорбентах створені технологічні схеми виділення та очищення досліджуваних білків з утильних фракцій переробки донорської плазми крові.

Перспективи подальших досліджень. Одержані сорбенти можуть бути використані для препаративного виділення та очищення різноманітних білків. Набори біоспецифічних сорбентів мають перспективу застосування для експрес-аналізу протеоміксу та метаболізму складних біологічних рідин.

T. V. Danysh

SYNTHESIS OF DYE-LIGAND AFFINITY SORBENTS SUITABLE FOR OBTAIN AND PURIFICATION OF BLOOD CLOTTING FACTORS

S u m m a r y

On the basis of macroporous silicas and active triazine dyes sorbents suitable for purification of the trypsin-like proteinases from blood plasma were synthesized.

Synthesized sorbents are on the basis of macro porous silica, which contain as ligands active triazine dyes. Physical and chemical properties of the obtained sorbents testify about their high stability, easiness of regeneration, firmness to microorganisms, chemical substances and sterilization influence. The explored sorbtsiyno-desorbtsiyni properties of synthesized sorbentiv in relation to protrombinou, to trombinou, albumen, factors of rolling up of blood VIII and IX, which showed their fitness for the selection and cleaning of the given albumens. Synthesized sorbenti differ after specificity of sorbtsii of various albumens. This specificity is conditioned by the presence of various after properties deputies in barvniciv-ligandiv and carried out, obviously, after the mixed type at participation of catalytic active center of fermenta and centers of fastening of soubstrativ (ingibitoriv), gidrofobnoi and ionic co-operation. With the use of biospetsifichescoy

hromatografii on synthesized silica sorbentah the created technological charts of selection and cleaning of the explored albumens from scrap factions of processing of donor plasma of blood.

T. V. Danysh

**ПОЛУЧЕНИЕ КРАСИТЕЛЬ-ЛИГАНДНЫХ АФИННЫХ СОРБЕНТОВ,
ПРИГОДНЫХ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ФАКТОРОВ
СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ**

А н н о т а ц и я

Синтезированы сорбенты на основе макропористых кремнеземных матриц и лигандов — активных красителей триазиновой группы, пригодные для выделения протеиназ трисинового типа из плазмы крови.

1. *Гайда А. В.* Хроматография тромбина на модифицированных кремнеземах: роль матрицы, спейсера и величины рН / Гайда А. В., Монастырский В. А., Магеровский Ю. В. и др. // Биотехнология. — 1989. — Т. 5, N 4. — С. 449–454.

2. *Логінська З. В.* Хроматографія тромбіну та антитромбіну III на біоспецифічних силохромах / Логінська З. В., Орищенко Н. В., Вус М. М. та ін. // Укр. биохим. журн. — 1998. — 70, № 3. — С. 63–68.

3. *Magerovsky Yu.* Preparation of high-purity and viral safety plasminogen by affinity chromatography : Advances in Transfusion Safety—2001. Int. Symposium. Langen, Germany, 7–8 June 2001, p. 36. / Magerovsky Yu. V., Braginetz O. G., Danysh T. V.

4. *Даниш Т. В.* Синтез кремнеземних сорбентів із лігандами — активними барвниками триазинового ряду / Даниш Т. В., Вороняк М. І., Дульцева Н. А., Шурко Н. О. // Вісник Львівського університету. — 2008. — Вип. 47. — С. 63–69. — (Серія біологічна.)

5. *Даниш Т. В.* Одержання білкових препаратів крові: суміщення хроматографічних методів очищення з фракціонуванням за Коном : праці 3-го Західно-Українського симпозиуму з адсорбції та хроматографії / Даниш Т. В., Магеровський Ю. В., Брагінець О. Г. — Львів, 2003. — С. 173–174.

6. Патент № 24182 Україна на корисну модель, МПК7 C12N 9/96, A61K 38/02. Спосіб виділення та очищення тромбіну / Магеровський Ю. В., Брагінець О. Г., Шурко Н. О., та ін. ; заявник та патентовласник ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини АМНУ». — № 200700211 ; заявл. 09.01.2007 ; опубл. 25.06.2007, бюл. № 9. — 3 с.

7. *Laemmly U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / Laemmly U. K. / Nature. — 1970. — V. 227, No. 5259. — P. 680–685.

Рецензент: завідувач лабораторії фізіології та патології відтворення тварин, кандидат біологічних наук Шаран М. М.