

УДК 677.494-614:577.15

ИЗМЕНЕНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ТРИПСИНА ИММОБИЛИЗОВАННОГО НА АЛЬДЕГИДСОДЕРЖАЩИЕ ТЕКСТИЛЬНЫЕ НОСИТЕЛИ В ПРОЦЕССЕ ИММОБИЛИЗАЦИИ И ХРАНЕНИЯ

А.А. Белов*, Н.Ф. Казанская, В.Н. Филатов*, Е.Н. Белова*

(кафедра химической энзимологии; e-mail: ABelov2004@yandex.ru)

Изучено изменение в процессе хранения протеолитической активности иммобилизованного панкреатического трипсина на модифицированных текстильных носителях на основе целлюлозы и поликапроамида. Показано наличие двух фракций, лабильной и стабильной, в иммобилизованных образцах. Установлено, что максимальное падение протеолитической активности полученных материалов происходит в процессе высушивания.

Использование ферментов в медицине имеет многолетнюю историю. Особое внимание привлекли протеазы — ферменты, гидролизующие белки. Началом научно обоснованного применения энзимов как терапевтических средств в различных областях медицины следует считать 50-е годы XX в. [1]. Доказано, что ферментным системам принадлежит основная роль в очищении ран от гноя и нежизнеспособных тканей. Лечение гнойных ран, несмотря на значительные успехи медицинской науки, в силу ряда причин остается одной из основных проблем хирургии. Гнойные заболевания и осложнения встречаются у 30–35% всех хирургических больных [2]. При получении раневых покрытий необходимо принимать во внимание то, что в отличие от материалов с биологической активностью иного назначения раневые покрытия — это одноразовые средства с небольшим сроком эксплуатации (до 72 ч), поэтому их биологическая активность должна максимально реализоваться при наложении на рану [3]. Современным направлением в разработке перевязочных материалов является отказ от универсальных средств, применяемых в течение всего периода раневого процесса, и переход к повязкам, предназначенным специально для использования в той или иной его фазе в соответствии с конкретной клинической ситуацией.

В настоящее время имеются возможности создания волокнистых материалов, обладающих биологической активностью [2–5]. Для этого могут быть использованы три способа:

1) получение полимеров с той или иной биологической активностью путем статической полимери-

зации или поликонденсации с последующим формированием волокон;

2) введение определенных добавок, ответственных за биологическую активность, в прядильные растворы или расплавы полимеров на стадии формирования волокон;

3) модификация готовых волокон с помощью веществ, обуславливающих биологическую активность.

При модификации волокон с целью придания им биологической активности связь между полимерной матрицей и биологически активным веществом может быть ковалентной, координационной и (или) ионной. Выбор каждого из названных типов связи определяется практическим назначением создаваемых материалов [4, 5].

Экспериментальная часть

В работе использовали казеин по Гаммерстену (Россия), трипсин (“*Spofa*”, Чехия), все остальные реактивы отечественного производства квалификации не ниже “х.ч.”.

Количество альдегидных групп определяли либо конденсацией в кислой спиртовой среде с гидроксиламином, либо окислением йодом в слабощелочных условиях [6] с учетом влажности носителя. Содержание белка на носителе определяли по методу Лоури–Гартри [7]. Протеолитическую активность (ПА) определяли методом Кунитца (гидролиз 1%-го раствора казеина по Гаммерстену в 1/15 М фосфатном буфере, рН 8,0) [8]. На рис. 1 приведены использованные схемы модификации текстильных носителей.

*ФГУП НИИ текстильных материалов.

Синтезированы производные трипсина на ДАЦ, поликапроамиде, активированном глутаровым альдегидом (ПКА–ГА) и ПКА с собственными альдегидными группами (ПКА–А) [9, 10]. Для полученных производных было исследовано изменение ПА в процессе иммобилизации, высушивания и хранения. Найдены оптимальные условия, метод модификации и степень модификации текстильного носителя для иммобилизации [9, 10], при которых практически не происходит инактивации Тр в процессе иммобилизации. Для создания оптимальных условий (рН, температура, состав раствора для иммобилизации и тому подобное) выбирали такие параметры, чтобы в процессе иммобилизации относительное значение ПА достигало максимальной величины и не изменялось до начала высушивания образцов, а падение ПА в процессе хранения оказывалось минимальным. Снижение ПА при иммобилизации в мокрых образцах может происходить вследствие автолиза в слабо кислых, нейтральных или щелочных значениях рН. Как отмечалось ранее [11, 12], модификация (связывание с альдегидами) ε-аминогруппы трипсина не ведет к значительному падению ферментативной активности последнего. На рис. 2 и 3 представлены зависимости изменения протеолитической активности иммобилизованных препаратов Тр в процессе иммобилизации и хранения (при комнатной температуре, в темноте). Необходимо отметить, что графики приведены для образцов, полученных в оптимальных условиях.

Потеря ПА в процессе высушивания иммобилизованных препаратов – факт, хорошо известный из литературных источников [11, 13]. Молекула белка в водном растворе окружена гидратной оболочкой, обра-

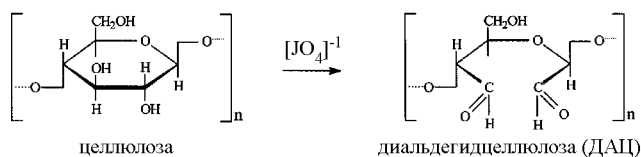
зованной молекулами воды, связанными с поверхностью белка водородными связями [14]. Эта водная оболочка (или, по крайней мере, некоторая ее часть) является неотъемлемой составной частью белка и необходима для поддержания его структуры и нормального функционирования. Удаление связанных молекул воды в процессе высушивания (под действием органических растворителей, нагревания) приводит к значительным изменениям. Причем, как выяснилось, нахождение влажного препарата (остаточная влажность 60–70%) в течение трех суток при температуре $5 \pm 2^\circ\text{C}$ не ведет к изменению ПА. Высушивание растворов ферментов при комнатной температуре обычно вызывает полную инактивацию последних [13, ч. 1, с. 29], поэтому получить активный препарат фермента удается только при высушивании в условиях глубокого вакуума при низкой температуре. Полученный таким способом немодифицированный фермент можно хранить при комнатной температуре без значительной потери ферментативной активности. Тем не менее при хранении нативных ферментов в виде субстанций и лекарственных форм следует учитывать их недостаточную стабильность. Необходимо содержание их при низких температурах в защищенном от прямого света месте, причем в большинстве случаев срок годности препаратов даже при таком режиме не превышает одного года. Нестабильность ферментов ограничивает возможности создания мягких лекарственных форм в виде аэрозолей (особенно это касается протеолитических ферментов). Недостаточная стабильность растворов ферментов создает определенные сложности с их использованием. Таким образом, иммобилизация ферментов должна приводить к увеличению стабильности субстанции и растворов ферментов, что позволит стандартизовать их. Особое внимание следует обратить на условия хранения иммобилизованных препаратов. Стабильность лекарственных форм и фармацевтических препаратов в процессе хранения определяется “сроком годности”, в течение которого уровень качественных и количественных изменений характеристик лекарственной формы достигает предела, определяемого требованием действующей Государственной Фармакопеи или иной НТД на данное медицинское изделие [15]. Важность проблемы стабильности определяется двумя важнейшими требованиями:

1) активный ингредиент лекарственной формы не должен быстро изменяться при хранении;

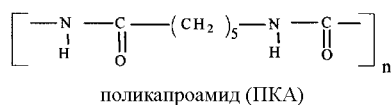
2) фармацевтическая промышленность должна гарантировать содержание терапевтической дозы активного ингредиента лекарственной формы в течение определенного срока.

В подавляющем большинстве случаев активность ферментов при иммобилизации снижается. Причины

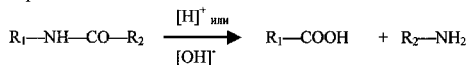
Получение диальдегидцеллолозы



Получение активированного поликапроамида



1. Гидролиз ПКА



2. Активация ПКА

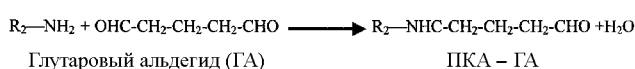


Рис. 1. Схемы получения модифицированных текстильных носителей

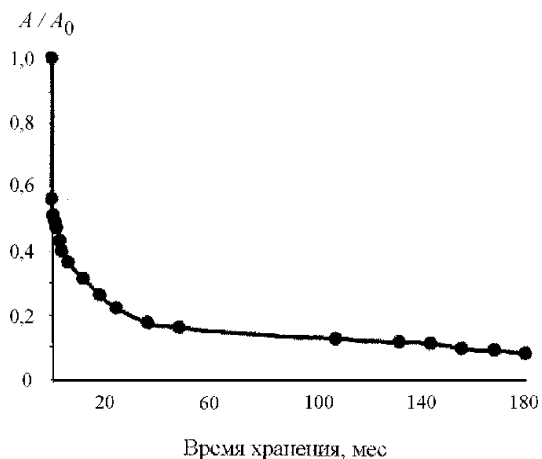


Рис. 2. Изменение при хранении ПА трипсина, иммобилизованного на модифицированные текстильные носители

этих явлений достаточно хорошо изучены [11, 12]. Можно условно выделить три основные стадии изменения ПА в процессе иммобилизации. За 100% принимается значение ПА во влажном состоянии (до высушивания) — максимальное значение ПА иммобилизованного препарата, и относительно этого значения рассматриваются все дальнейшие изменения ПА. После высушивания иммобилизованных образцов значение ПА составляет от 30 до 60% от первоначального (в зависимости от условий иммобилизации, использованных белков или носителей). Данное явление не связано с попаданием молекул белка в поры матрицы, поскольку имеет место, как в случае целлюлозных, так и в случае ПКА-носителей (несмотря на отсутствие пор у последних). Процесс высушивания иммобилизованного препарата — стадия “сверхбыстрого” снижения ПА, связанного, скорее всего, с потерей воды (изменение микроокружения фермента). Этот процесс необратим, и никакими известными нам методами невозможно восстановить значение ПА иммобилизованных препаратов на 100%. Уменьшение ПА связано в основном с переходом фермента из состояния с влажностью 100% в состояние с влажностью 4–6%. Как известно, дегидратация белка даже в процессе лиофилизации может приводить к его частичной денатурации.

Функции белка, также как и его стабильность, определяются аминокислотной последовательностью, которая в свою очередь обуславливает коллективные взаимодействия, приводящие к формированию специфической конформации [17]. Химическая модификация приводит к структурным изменениям белка (иногда очень небольшим), что вызывает значительные изменения его стабильности. Модификация ε-аминогрупп в молекуле Тр приводит к разрыву ряда чувствительных (нековалентных) связей и из-

менению свойств иммобилизованного препарата. Происходящая дегидратация фермента при высушивании иммобилизованных препаратов Тр может приводить к изменению структуры белка. Даже при хранении в сухом состоянии может происходить инактивация белка из-за разных нежелательных процессов, например агрегации или окисления [18]. Для второй стадии инактивации, характеризующей лабильную фракцию образца, также характерна относительно быстрая потеря ПА иммобилизованного Тр. В случае наших образцов эта стадия продолжалась в течение 2–6 мес хранения в вышеприведенных условиях. В течение последующего времени наблюдения происходит третья, медленная, стадия инактивации.

Полученные данные могут быть объяснены не только наличием “лабильной” и “стабильной” фракций иммобилизованного фермента, хорошо известных для ферментов, иммобилизованных на производных целлюлозы [19, 20]. Поскольку гигроскопичность носителя достаточно высока (влажность исследуемых целлюлозных препаратов составляет 5%, а полиамидных — 2%), а азотиновая связь неустойчива, инактивация иммобилизованных препаратов в процессе хранения может быть вызвана теми же причинами, что и в растворе фермента, но процесс протекает с меньшей скоростью. На рис. 3 приведены кинетические данные, представленные в полулогарифмических координатах, об изменении ПА иммобилизованного на модифицированных текстильных носителях Тр. Кинетика инактивации иммобилизованных ферментов в процессе хранения описывается характерной для гидрогеназ сложной экспоненциальной зависимостью [19, 20]

$$(A_t/A_0 = a_1 \times e^{-k_1 t} + a_2 \times e^{-k_2 t}).$$

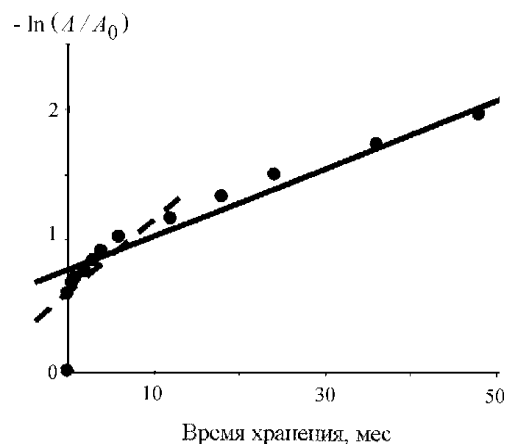


Рис. 3. Кинетика изменения при хранении ПА трипсина, иммобилизованного на модифицированные текстильные носители

Значение эффективной константы инактивации ($k_{ин}$) для лабильной фракции составляет $0,20 \text{ мес}^{-1}$, а для стабильной — $0,071 \text{ мес}^{-1}$. В полулогарифмических координатах установленные зависимости имеют вид ломаной линии, каждая из которых описывается уравнением первого порядка. Двухфазная кинетика инактивации иммобилизованных форм протеиназ — факт известный [11, 12, 19, 21]. Кинетические закономерности такого рода могут быть объяс-

нены общим механизмом инактивации, включающим существование двух форм фермента, различающихся активностью и устойчивостью к денатурирующим воздействиям. Вне зависимости от конкретных деталей механизма и соотношения элементарных констант двухэкспоненциальный характер инактивации показывает, что ее механизм включает две различающиеся по активности или устойчивости формы фермента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Веремеенко К.Н.* Ферменты в оториноларингологии. Киев, 1980.
2. *Толстых П.И., Скобелкин О.К., Дербенев В.А., Эфендиев А.И.* Использование углекислотного лазера, низкочастотного ультразвука и иммобилизованных ферментов протеолиза на волокнистых материалах в гнойной хирургии. Баку, 1992.
3. *Юданова Т.Н.* Дис. ... докт. хим. наук. М., 2004.
4. *Вольф Л.А.* // 3-й симпозиум по физиологически активным синтетическим полимерам и макромолекулярным моделям биополимеров. Тез. докл. Рига, 1971.
5. *Белов А.А., Белова Л.А., Филатов В.Н. и др.* // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2003. **44**. С. 16.
6. *Белов А.А., Рыльцев В.В., Грищенко С.И.* // Сб. научн. тр. ВНИИТГП. М., 1990. С. 36.
7. *Белов А.А., Плеханова Н.Ю., Вирник Р.Б., Игнатюк Т.Е.* // Сб. научн. тр. ВНИИТГП. М., 1988. С. 25.
8. *Белов А.А., Рыльцев В.В., Игнатюк Т.Е.* // Химико-фармацевтический журнал. 1992. № 11–12. С. 101.
9. *Белов А.А., Игнатюк Т.Е., Рыльцев В.В., Филатов В.Н.* Способ получения целлюлозных материалов, содержащих иммобилизованный трипсин. Авт. св. от 24.11.89. № 1773067 (положительное решение от 01.07.1992 г.).
10. *Белов А.А., Рыльцев В.В., Грищенко С.И., Филатов В.Н.* Заявка 4855929/05/083643 от 31.07.90 г. (положительное решение от 26.06.91).
11. Иммобилизованные ферменты. Современное состояние и перспективы / Под ред. И.В. Березина, В.К. Антонова, К. Мартиненка. М., 1976. Т. 1.
12. *Торчилин В.П., Бобкова А.С., Смирнов В.Н. и др.* // Биоорганическая химия. 1976. **2**. № 1. С. 116.
13. *Диксон М., Уэбб Э.* Ферменты. М., 1983.
14. *Белова А.Б., Можжаев В.В., Левашиов А.В. и др.* // Биохимия. 1991. **56**. № 11. С. 1923.
15. а) Прогнозирование сроков годности лекарственных форм. М., 1977; б) Временная инструкция по проведению работ с целью определения сроков годности лекарственных средств на основе метода ускоренного старения при повышенной температуре И-42-2-82. М., 1983.
16. *Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я.* Физико-химические основы фотобиологических процессов. М., 1989.
17. *Тяги Р., Гупта М.Н.* // Биохимия. 1998. **63**. № 3. С. 395.
18. *Константино Г.Р., Швендеман С.Р., Лангер Р., Клибанов А.М.* // Биохимия. 1998. **63**. № 3. С. 422.
19. *Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г.* Биокинетика (практический курс). М., 1999. С. 230.
20. *Белов А.А., Рыльцев В.В., Игнатюк Т.Е., Филатов В.Н.* // Радиационная биология. Радиоэкология. 1994. **34**. № 2. С. 306.
21. *Хорунжиса С.И., Хохлова Б.А., Шамолина И.И., Вольф Л.А.* // ЖПХ. 1978. № 3. С. 651.

Поступила в редакцию 01.12.05

CHANGE IN PROTEOLYTIC ACTIVITY OF TRYPSIN IMMOBILIZED ON ALDEHYDE-CONTAINING TEXTILE CARRIERS IN THE COURSE OF IMMOBILIZATION AND STORAGE

A.A. Belov, N.F. Kazanskaya, V.N. Filatov, Ye.N. Belova

(Division of Chemical Enzymology)

Change in proteolytic activity of pancreatic trypsin immobilized on modified textile carriers on the basis of cellulose and polycapromide during storage of the enzyme was studied. Immobilized samples were shown to contain two fractions, labile and stable. It was found that maximal decrease in proteolytic activity of materials occurs during drying process.