



УДК 577.156.011

ПОЛУЧЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННОГО ТРИПСИНА И ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ АКТИВИРОВАНИЯ КАЛЛИКРЕИНОГЕНА ПЛАЗМЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА *

*Яровая Г. А., Гулянская Т. Н., Доценко В. Л.,
Бессмертная Л. Я., Козлов Л. В., Антонов В. К.*

Институт усовершенствования врачей,

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Получен препарат иммобилизованного трипсина путем сорбции на DEAE-сефадексе А-50 трипсина, модифицированного сополимером малеинового ангидрида и акриловой кислоты. Основным достоинством этой формы иммобилизованного трипсина является его высокая активность в отношении как пептидомолекулярных, так и высокомолекулярных субстратов. Данный препарат трипсина использован для активирования калликреиногена ($M \sim 90\ 000$).

В плазме крови человека в норме калликреин присутствует, по-видимому, только в виде своего предшественника — калликреиногена или в связанном с ингибиторами состоянии. Активная форма фермента появляется при ряде патологических состояний: воспаления и шоки различной этиологии, карционид, демпинг-синдром, некоторые наследственные и другие заболевания [1, 2]. Активация профермента может быть осуществлена трипсином [3, 4]. Об образовании калликреина судят по его кининогеназной и эстеразной активностям. Однако в связи с тем, что трипсин и калликреин обладают близкой субстратной специфичностью, определение активности калликреина требует удаления трипсина из инкубационной смеси или подавления его активности специфическими ингибиторами [5]. Поэтому мы решили использовать для активирования калликреиногена нерастворимую форму трипсина. Преимущество активирования калликреиногена нерастворимым трипсином заключается в том, что активатор может быть легко отделен от активированного им фермента.

Нам не удалось активировать калликреиноген коммерческим препаратом — сефазимом трипсина фирмы «Pharmacia Fine Chemicals» (Швеция). По-видимому, вследствие низкой активности этой формы фермента в отношении высокомолекулярных субстратов.

Ранее нами были изучены препараты α -химотрипсина, модифицированного сополимером малеиновой и акриловой кислот, и обнаружена высокая активность модифицированного фермента при гидролизе высокомолекулярных белковых субстратов [6]. Этот метод модификации с последующей сорбцией растворимого модифицированного трипсина на анионитах

* Сокращения: БАЭЭ — этиловый эфир *N*-бензоил-*L*-аргинина; БАНА — *n*-нитроанилид *N*-бензоил-*L*-аргинина.

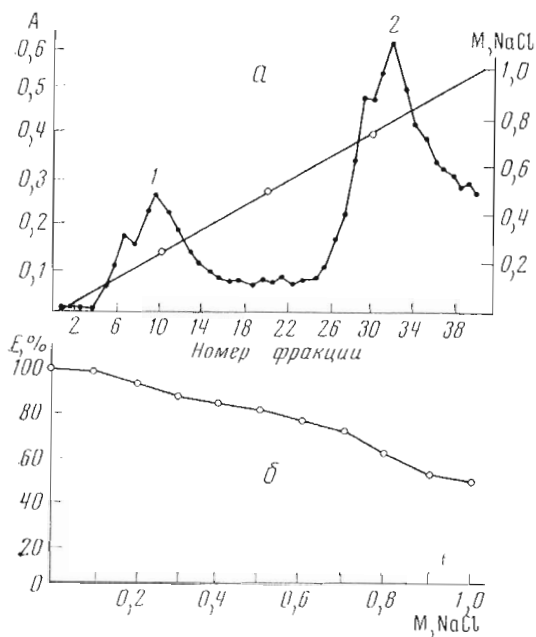


Рис. 1

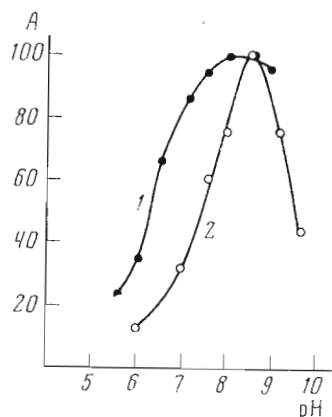


Рис. 2

Рис. 1. Элюирование растворимого модифицированного трипсина с DEAE-сефадекса А-50 градиентом концентрации. *a*: *A* — эстеразная активность в мкМ БАЭЭ/мин на 1 мл фракции; *b*: *E* — количество связанного фермента в % от исходного. Объем колонки 1 мл; объем фракций 0,5 мл, скорость элюции 5 мл/ч

Рис. 2. pH-зависимость эстеразной активности нативного (1) и иммобилизованного (2) трипсина (*A*, % от максимальной)

был нами применен для получения нерастворимого препарата трипсина. Мы исследовали также способность такого иммобилизованного трипсина активировать калликреиноген.

Полученный растворимый препарат трипсина, модифицированный сополимером малеинового ангидрида и акриловой кислоты, по данным аминокислотного анализа, содержал 600 мг белка на 1 г препарата, причем доля активного в отношении БАЭЭ фермента в препарате составляла 50% (300 мг активного трипсина на 1 г препарата).

Нерастворимая форма трипсина была получена сорбцией модифицированного фермента на DEAE-сефадексе А-50. Растворимый модифицированный трипсин при нейтральных pH имеет высокий суммарный отрицательный заряд благодаря карбоксильным группам сополимера, в связи с чем он хорошо сорбируется на анионитах, образуя нерастворимое производное трипсина.

Важное значение для характеристики данного нерастворимого препарата трипсина имеет решение вопроса о прочности связывания модифицированного трипсина с ионообменником. Прочность связывания определяли с помощью градиентного элюирования фермента с колонки, содержащей DEAE-сефадекс А-50, максимально насыщенный этим препаратом в 0,01 М фосфатном буфере (pH 7,0). За выходом фермента с колонки следяли по БАЭЭ-эстеразной активности фракций, которую измеряли спектрофотометрическим методом. Результаты элюирования приведены на рис. 1. На рис. 1, *a* показан выход с колонки фермента при повышении концентрации NaCl; на рис. 1, *b* — данные о количестве связанного с анионом фермента при различных концентрациях NaCl. График элюирования (рис. 1, *a*) показывает, что элюируемый трипсин выходит в двух пиках:

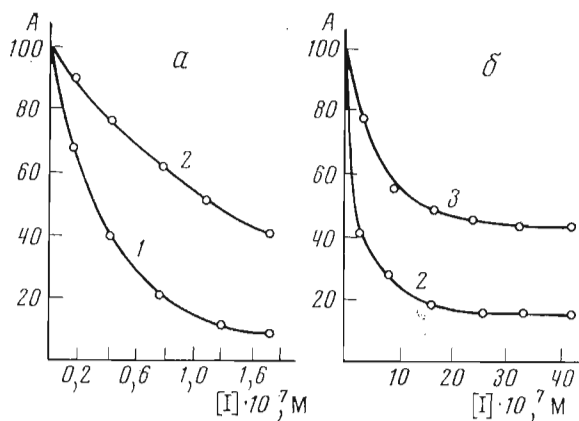


Рис. 3

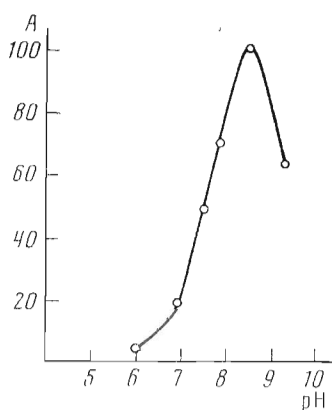


Рис. 4

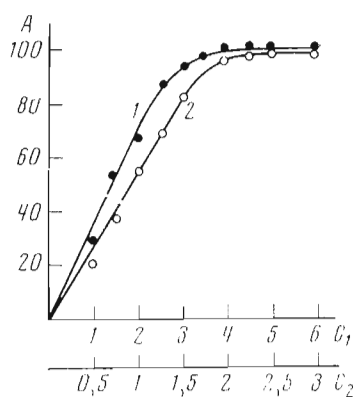


Рис. 5

Рис. 3. Торможение эстеразной активности препаратов трипсина ингибитором из бобов сои: 1 — нативный трипсин; 2 — растворимый модифицированный трипсин; 3 — иммобилизованный трипсин (A , % от исходной)

Рис. 4. pH-зависимость активирования калликреиногена нерастворимым трипсином (25° , 5 мин, A — эстеразная активность калликреина в % от максимальной)

Рис. 5. Активирование калликреиногена нативным (1) и иммобилизованным (2) трипсином (A — эстеразная активность калликреина в % от максимальной; C_1 — количество нативного трипсина в мкг/мг калликреиногена; C_2 — количество иммобилизованного трипсина в мкг/мг калликреиногена)

1-й — при концентрации NaCl 0,2—0,3; 2-й — при 0,8 М. Из рис. 1, б видно, что при повышении концентрации NaCl до 1 М с колонки удаляется половина первоначально связанного модифицированного фермента.

Появление двух пиков активности при градиентной элюции и наличие недесорбируемого с колонки фермента, по-видимому, можно объяснить образованием (при получении модифицированного трипсина) препаратов с различным соотношением фермента и полимера. Для дальнейших исследований использовали препарат иммобилизованного фермента, предварительно промытого на колонке 0,4 М раствором NaCl для удаления слабо связанного с ионитом модифицированного препарата трипсина (1-й пик).

Оптимум рН иммобилизованного трипсина, определенный по гидролизу БАЭЭ (рис. 2), находится при рН 8,5, т. е. несколько смещен в щелочную сторону по сравнению с оптимумом рН нативного трипсина.

Получены сравнительные данные по торможению эстеразной активности нативного трипсина, растворимого модифицированного трипсина и нерастворимого препарата фермента ингибитором трипсина из бобов сои (рис. 3). Эти данные представляют интерес с точки зрения взаимодействия препаратов трипсина с белком, в данном случае с белковым ингибитором. Следует отметить, что ингибирование различных препаратов трипсина протекает по-разному: активность нативного трипсина угнетается практически полностью, в то время как модифицированный растворимый трипсин сохраняет $\sim 20\%$, а иммобилизованный трипсин $\sim 50\%$ исходной активности при значительном избытке ингибитора.

Величины I_{50} , определенные по ингибированию гидролиза БАЭЭ, составляли: для нативного трипсина — $3,06 \cdot 10^{-8}$ М, для модифицированного растворимого трипсина — $8,45 \cdot 10^{-8}$ М и для иммобилизованного фермента — $46 \cdot 10^{-8}$ М. При расчете I_{50} за 100% принимали ингибируемую часть активности препаратов.

Полученный нерастворимый препарат трипсина был использован для активирования частично очищенного калликреиногена из сыворотки крови человека.

Исследование зависимости скорости активирования калликреиногена от рН, результаты которого приведены на рис. 4, показало, что оптимум этой реакции наблюдается при рН 8,5, т. е. совпадает с оптимумом рН эстеразного действия этого препарата.

Определены количественные соотношения иммобилизованного трипсина и калликреиногена, требующиеся для превращения последнего в калликреин. На рис. 5 приведены сравнительные данные по активированию калликреиногена нативным и нерастворимым трипсином.

В случае активирования нативным трипсином активность последнего после инкубирования с проферментом подавляли овомукоидом. Показано, что в данных условиях для полного активирования 1 мг калликреиногена требуется 4 мкг нативного трипсина или 2 мг нерастворимого препарата трипсина (каждый миллиграмм последнего содержит 11,6 мкг активного трипсина), т. е. для активирования одного и того же количества калликреиногена требуется активного трипсина, содержащегося в нерастворимом препарате трипсина, в 6 раз больше, чем нативного фермента. Таким образом, нерастворимый препарат трипсина имеет более низкую относительную активность по белковому субстрату, чем нативный трипсин, что согласуется с результатами, приведенными выше по сравнительному изучению действия ингибитора белковой природы на нативный и нерастворимый трипсин.

Фермент, активированный иммобилизованным трипсином, был идентифицирован по специфическому для калликреина кининогеназному действию. Казеинолитическая, фибринолитическая и амидазная активности, свойственные трипсину, отсутствовали в пробе после удаления из нее нерастворимого фермента.

Таким образом, полученная нерастворимая форма трипсина вполне пригодна для активирования калликреиногена и, по-видимому, может быть использована при определении содержания последнего в сыворотке крови человека, а также для активирования калликреиногена при препаративном получении активного калликреина.

Экспериментальная часть

В работе были использованы следующие препараты: БАЭЭ — фирмы «Reanal» (Венгрия); БАНА — синтезирован в лаборатории органического синтеза Института биологической и медицинской химии АМН СССР;

брадикинин-триацетат — фирмы «Nutritional Biochemical Corporation» (США); трипсин кристаллический — фирмы «Spofa» (Чехословакия) с удельной активностью, определенной по расщеплению БАЭЭ, равной 18—20 Е; овомукоид (завод химреактивов г. Олайн, ЛатвССР); активность препарата, определенная по торможению БАЭЭ эстеразной активности трипсина, соответствовала 30 МЕ; казеин по Хаммарстену — фирмы «Reanal» (Венгрия); трис — фирмы «Sigma» (ФРГ); тромбин получен в НИИ эпидемиологии, микробиологии и гигиены (Каунас, ЛитССР). Ингибитор трипсина из бобов сои — фирмы «Reanal» (Венгрия).

Частично очищенный калликреиноген получали путем фильтрации 20 мл сыворотки крови, полученной через 2 ч после взятия крови, через колонку (0,9 × 80 см) с DEAE-сефадексом А-50, уравновешенную 0,01 М фосфатным буфером (рН 6,95). Сыворотку крови перед нанесением на колонку разбавляли в 2 раза тем же буфером. Калликреиноген не сорбируется на анионите [7]. Фракции с оптической плотностью более 1 при 280 нм использовали в качестве препарата калликреиногена.

Для активирования калликреиногена нативным трипсином к 0,5 мл неадсорбированной на DEAE-сефадексе фракции белков, содержащей калликреиноген, добавляли 0,1 мл 0,1 М трис-НСl буфера (рН 8,8) и 3,3 мг трипсина в 0,1 мл 0,002 М НСl; пробу инкубировали 15 мин при 25°, затем трипсин инактивировали овомукоидом (0,1 мг в 0,05 М трис-НСl буфере, рН 8,0); через 10 мин в пробе измеряли эстеразную активность калликреина.

Для активирования калликреиногена иммобилизованной формой трипсина к 1 мл фракции белков, не адсорбированных на DEAE-сефадексе, добавляли 0,2 мл 0,1 М трис-НСl буфера (рН 8,8), 2 мг нерастворимого препарата трипсина и инкубировали при 25° в течение 15 мин при постоянном перемешивании, раствор фильтровали и в фильтрате определяли эстеразную активность калликреина.

Эстеразную активность трипсина и калликреина [8] измеряли спектрофотометрически при 253 нм по скорости гидролиза БАЭЭ и выражали соответственно в микромолях и наномолях субстрата, расщепленного за минуту. Для измерения активности калликреина к 0,5 мл фракции, содержащей фермент, добавляли 1,5 мл 0,05 М трис-НСl буфера (рН 8,0) и 1 мл $1,5 \cdot 10^{-3}$ М раствора БАЭЭ. Для измерения активности трипсина к 0,2 мл фермента (6,6 мкг) добавляли 1,8 мл 0,05 М трис-НСl буфера (рН 8,0) и 1 мл $1,5 \cdot 10^{-3}$ М БАЭЭ.

Амидазную активность активированных трипсином фракций определяли по методу [9]; в качестве субстрата использовали БАНА.

Протеолитическую активность фракций определяли по методу Кунитца и Нортропа, используя в качестве субстрата казеин [10]. Фибринолитическую активность определяли по методу [11].

Биологическую активность активированного трипсином фермента измеряли по скорости кининогеназной реакции; субстратом для фермента служила прогретая при 61° в течение 2 ч плазма крови человека. Освободившиеся в результате реакции кинины определяли по сокращению изолированного рога матки крысы, используя в качестве стандарта синтетический брадикинин [12].

Ингибирование препаратов трипсина ингибитором из бобов сои проводили, определяя остаточную активность фермента по гидролизу БАЭЭ после предынкубации фермента с различными концентрациями ингибитора (см. рис. 3) в течение 10 мин в 0,05 М трис-НСl буфере (рН 8,0), 25°.

Сополимер малеинового ангидрида и акриловой кислоты с $M \sim 1\,000\,000$ получен по методу [13].

Для получения модифицированного регулярным сополимером малеинового ангидрида и акриловой кислоты растворимого препарата трипсина к 90 мг сополимера, растворенного при 4° в 30 мл 0,1 М фосфатного

буфера (рН 7,5), добавляли при перемешивании охлажденный до 4° раствор 500 мг трипсина в 20 мл того же буфера. Смесь перемешивали при 4° в течение двух суток, и препарат выделяли подкислением 0,1 М НСl до рН 3,0, осадок отмывали 1 М NaCl в 1 мМ НСl, затем 1 мМ НСl до исчезновения ферментативной активности в надосадочной жидкости. Осадок растворяли в воде и лиофильно высушивали. Выход — 170 мг модифицированного трипсина. Активность образцов модифицированного трипсина определяли на рН-стате по скорости гидролиза $2 \cdot 10^{-3}$ М раствора БАЭЭ при рН 7,8. Содержание белка в этом препарате трипсина определяли аминокислотным анализом. Для получения иммобилизованного трипсина в колонку, содержащую 1 г ДЕАЕ-сефадекса А-50, уравновешенного 0,01 М фосфатным буфером (рН 7,0), вносили 50 мг модифицированного трипсина, растворенного в том же буфере, до полного насыщения колонки. В этих условиях на колонке сорбировалось 42 мг препарата трипсина. Для удаления относительно слабо сорбированного модифицированного трипсина через колонку пропускали 0,4 М раствор NaCl в фосфатном буфере (рН 7,0), в результате чего на колонке оставалось 38,7 мг фермента, затем промывали колонку 0,01 М фосфатным буфером и препарат лиофильно высушивали. Полученный нерастворимый препарат трипсина содержал 220 Е эстеразной активности на 1 г препарата, что соответствовало 11,6 мг активного трипсина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пасхина Т. С., Шрайбер М. И., Яровая Г. А., Морозова Н. А., Нартикова В. Ф., Трапезникова С. С., Доценко В. Л., Макарова О. В., Маслова Т. М. (1972) Вопросы мед. химии, **18**, 137—145.
2. Wilhelm D. L. (1971) *Annal. rev. med.*, **22**, 63—84.
3. Nagasawa Sh., Takahashi H., Koida M., Suzuki T., Schoenmakers J. G. (1968) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **32**, 644—649.
4. Werle E., Forell M., Maier L. (1955) *Arch. Exp. Path. Pharmacol.*, **225**, 369—380.
5. Feeney R. E., Means G. E., Bigles J. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 1957—1960.
6. Бессмертная Л. Я., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1974) *Биохимия*, **39**, 793—799.
7. Пасхина Т. С., Доценко В. Л., Блиникова Е. И. (1973) *Биохимия*, **38**, 420—423.
8. Trautshold I., Werle E. (1961) *Z. Physiol.* **325**, 49—53.
9. Erlanger B., Kokowsky N., Cohen W. (1961) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **95**, 271—278.
10. Нортроп Д., Кулиц М., Херриотт Р. (1950) *Кристаллические ферменты*, стр. 303, ИЛ, М.
11. Бышевский А. Ш., Вержиковская В. Г., Каптюх Р. Ф., Михайлова М. В., Мохнатова В. С. (1970) *Химические исследования в фармации*, стр. 76—78, «Здоровье», Киев.
12. Пасхина Т. С., Яровая Г. А. (1970) *Биохимия*, **35**, 1055—1058.
13. Эль Сайед А. А., Мирлина С. Я., Каргин В. А. (1969) *Высокомолек. соед.* **11A**, 282—293.

Поступила в редакцию
9.XII. 1974

PREPARATION OF IMMOBILIZED TRYPSIN AND ITS USE FOR ACTIVATION OF HUMAN PLASMA KALLIKREINOGEN

YAROVAYA G. A., GULYANSKAYA T. N., DOTSENKO V. L.,
BESSMERTNAYA L. Ya., KOZLOV L. V., ANTONOV V. K.

*Central Institute for Education of Postgraduate Physicans,
M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Trypsin, modified by copolymer of maleic anhydride and acrylic acid, was immobilized by sorption on DEAE-Sephadex A-50 and used for activation of kallikreinogen (molecular weight about 90 000). The principal advantage of this enzyme form resides in its sufficient activity both with high and low molecular weight substrates.