

Архив журнала

## Вопросы медицинской химии

*ISSN 0042-8809*

1992

Том 38 выпуск 3

**Внимание!** Распознавание текста проведено в автоматическом режиме для облегчения работы поисковых систем. Будьте внимательны при копировании, возможны ошибки и неточности. Используйте сканированный графический вариант.

Archive of journal

## Voprosy meditsinskoj khimii

*ISSN 0042-8809*

1992

Volume 38 issue 3

**Attention!** OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible. Use scanned picture as standard.

<http://pbmc.ibmc.msk.ru>

С. А. Цыманович, В. Н. Никандров, Р. А. Максимова, Т. С. Шаркова, Г. В. Андреевко, Т. Н. Серебрякова

## ФИЗИКО - ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТРОМБОЛИТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ЛОНГОЛИТИНА

Московский университет им. М. В. Ломоносова

Арсенал препаратов, оказывающих тромболитическое действие при тромбоемболических осложнениях, может быть расширен за счет соединений, получаемых не только из культуры клеток человека и животных, но и из микроорганизмов [1]. В частности, известен комплекс протеаз — трихолизин или триаза, образуемый несовершенным сапрофитным грибом *Trichothecium roseum*, который обладает высокой фибринолитической, активаторной и антикоагулянтной активностью [2]. Аналогичными свойствами обладает продукт, выделенный из культурального фильтрата несовершенного гриба *Arthrotrys longa* [3]. Представляет интерес получение очищенного препарата из этого источника и изучение его физико-химических свойств. В данной работе представлены результаты этих исследований.

**Методика.** В работе использован штамм хищного гриба *A. longa* Mecht № 1. Культивирование проводили в колбах на качалке при 240 об/мин в течение 120 ч при температуре 25—26 °С на среде, содержащей (в граммах на 1 л)  $K_2HPO_4$  — 4,4,  $NaNO_3$  — 19,  $KNO_3$  — 2,5, сахарозу — 40. Использовали материал, выросший в аналогичных условиях в течение 48 ч, на среде, обедненной по содержанию компонентов в 2 раза. Выделение ферментов из культурального фильтрата проводили путем осаждения 2-кратным объемом охлажденного до 20 °С ацетона. Осадок фильтровали, сырец (препарат 1) сушили в вакуум-экссикаторе над концентрированной  $H_2SO_4$  при 4 °С.

При изучении свойств фермента использовали следующие методы: определение содержания белка (по Лоури и спектрофотометрически при 280 нм), определение фибринолитической (ФА), активаторной (АА), эстеразной (ЭА), казеинолитической (КА) активности [4]. Удельную ФА, АА, КА, ЭА рассчитывали на 1 мг белка. При фракционировании препарат 1 растворяли в воде, диализовали против 0,06 М фосфатного буфера рН 7,4, наносили на колонку (2,0×80 см) с сефадексом G-100. Элюцию проводили 0,06 М фосфатным буфером рН 7,4 со скоростью 12 мл/ч. Полученную активную фракцию (препарат 2) использовали для изучения ряда физико-химических параметров.

Диск-электрофорез проводили в 10 % полиакриламидном геле при рН 8,3 в трис-глициновом буфере. Изоэлектрофокусирование проводили в столбиках 7 % полиакриламидного геля в градиенте рН 3,0—10,0 и 3,0—5,0, используя 2 % амфолины. Белки окрашивали амидо черным 10Б или кумасси R-250. Для определения изоэлектрической точки гель после электрофокусирования разрезали на сегменты по 3 мм и элюировали  $H_2O$  или 0,01 М KCl в течение 18 ч. Затем в пробах определяли рН и ФА. Мол. массу определяли методом гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-100 (1,5×80 см), уравновешенной 0,06 М фосфатным буфером рН 7,4. В качестве белков-маркеров использовали бычий сывороточный альбумин (68 000), стрептокиназу (54 000), пероксидазу из хрена (40 000), ингибитор трипсина из соевых бобов (22 000), лизоцим (14 000).

Для изучения термоинактивации раствор фермента прогревали в водяной бане при 37, 50, 60 70 °С в течение 4 ч, а затем определяли ФА. рН-оптимум действия определяли при растворении препарата в ацетатном, фосфатном, боратном и бикарбонатном буферах рН 3,0—11,0 с последующим нанесением на фибриновые пластины.

Влияние ряда соединений на ФА и АА определяли при совместном нанесении раствора фермента и исследуемого ве-

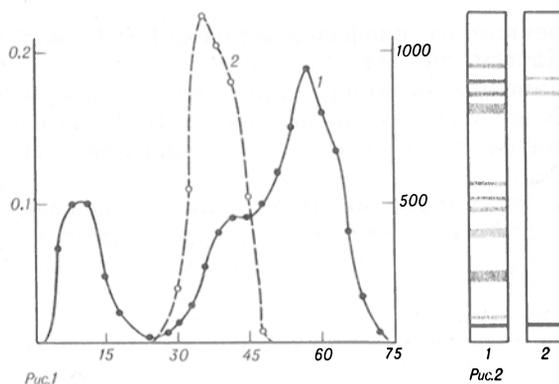


Рис. 1. Гель-хроматография лонголитина.

По оси абсцисс — объем элюата, мл; по осм ординат: слева — оптическая плотность при 280 нм, справа — ФА, мм<sup>2</sup>. 1 — величина абсорбции при 280 нм; 2 — ФА.

Рис. 2. Диск-электрофорез лонголитина до (1) и после (2) очистки на колонке с сефадексом G-100.

щества на фибриновые пластины. В работе использовали амфолины (LKB, Швеция), сефадекс G-100 («Pharmacia», Швеция), АТФ, ЭДТА, ингибитор трипсина из соевых бобов, лизоцим, пероксидазу из хрена («Reanal», Венгрия), п-хлор-меркурибензоат (п-ХМБ) («Chemapol», Чехословакия), контрикал («Germed», Германия), остальные реактивы — отечественного производства.

**Результаты и обсуждение.** При фракционировании препарата 1 на сефадексе G-100 получено 3 белковых пика (рис. 1). Компонент, обладающий ФА, концентрируется во втором пике.

Фракционирование на колонке с сефадексом G-100 приводило к увеличению удельной ФА, как правило, в 7—10 раз (табл. 1).

Судя по данным диск-электрофореза, при фракционировании на сефадексе G-100 достигается существенное освобождение от балластных белков; ФА сосредоточена в наиболее подвижной фракции белка (рис. 2). В исходном материале выявлено наличие 7—8 белков, обладающих различной электрофоретической подвижностью. При изоэлектрофокусировании в лонголитине выявлено 6 белковых фракций с изоэлектрическими точками при рН 3,0, 3,68—3,74, 4,9, 6,2, 7,0, 8,4; только одна фракция фибринолитически активна и имеет изоэлектрическую точку 3,68—3,74.

Мол. масса этой фракции равнялась  $28,6 \pm 1,1$  кДа (рис. 3). Фермент активен при рН 6,0—9,0. За пределами этого диапазона рН ФА резко снижается; при рН меньше 4,0 отмечена полная инактивация (рис. 4).

ФА лонголитина сохраняется в течение 9 сут при 4 и 25 °С; при более высокой температуре отмечена инактивация. Так, прогревание при 37, 50 и 60 °С в течение 4 ч вызывало падение активности на

Таблица 1

### Очистка лонголитина методом гель-фильтрации

Препарат	Содержание белка, мг/мл	Удельная ФА	АА, %	Удельная КА	Удельная ЭА
Культуральная жидкость	0,35	1 869	23	19,0	7,24
До гель-фильтрации	0,2	2 812	50,1	17,4	100
После гель-фильтрации	0,02	30 945	72,6	163	135

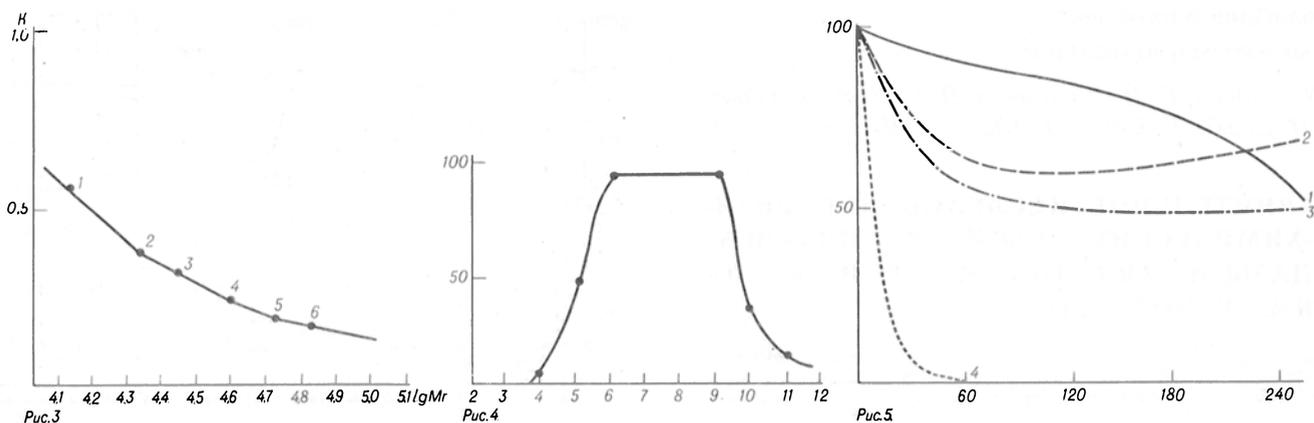


Рис. 3. Определение молекулярной массы лонголитина методом гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-100.

По оси абсцисс — логарифм мол. массы; по оси ординат — константа распределения. 1 — лизосим; 2 — ингибитор трипсина из соевых бобов; 3 — лонголитин; 4 — пероксидаза из хрена; 5 — стрептокиназа; 6 — бычий сывороточный альбумин.

Рис. 4. pH-зависимость активности лонголитина.

По оси абсцисс — pH; по оси ординат — ФЛ, %. За 100 % принята активность при pH 7,2.

Рис. 5. Кинетика инактивации лонголитина в 0,06 М фосфатном буфере pH 7,4, при 37 °C (1), 50 °C (2), 60 °C (3), 70 °C (4).

По оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — ФЛ, %.

50 %, а прогревание при 70 °C — полную утрату активности уже через 30 мин (рис. 5).

ФА лонголитина полностью подавляется фенилметилсульфонилфторидом и частично п-ХМБ (пара-хлормеркурибензоат). Можно предположить, что лонголитин является протеиназой серинового типа, однако реализация его функций зависит от присутствия тиоловых групп. ФА умеренно подавляется добавками комплексонов ЭДТА, о-фенантролином. Добавки солей двухвалентных катионов металлов оказали эффект, зависящий от характера катионов. Отмечено существенное подавление ФА под влиянием  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ . Менее выраженное влияние оказал ион кобальта. Катионы  $Fe^{2+}$  и  $Mn^{2+}$  не оказывали влияния на ФА. ФА заметно повышалась при частичной замене воды растворителем апротонного характера диметилформамидом. Добавки АТФ вызвали резкое снижение ФА. Изучение влияния белковых ингибиторов протеиназ на ФА лонголитина показало, что препарат малочувствителен к ингибитору трипсина из соевых бобов, но активность полностью подавляется при добавке контрикала (табл. 2).

Таким образом, получен и охарактеризован фибринолитически активный препарат из культуры хищного гриба *Arthrobotrys longa* Mecht. Показано, что он обладает способностью активировать

плазминоген, имеет КА и ЭА. После гель-фильтрации через сефадекс G-100 выделен индивидуальный белок с мол. массой 28 600 кДа с изоточкой при 3,68—3,74 с pH-оптимум действия при pH 6,0—9,0. Максимальная ФА проявляется при температуре 37 °C. По действию ингибиторов можно предварительно отнести его к протеиназам серинового типа, однако реализация его функций зависит от присутствия тиоловых групп.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Андреевко Г. В. Фибринолиз. — М., 1979.
2. Андреевко Г. В., Серебрякова Т. Н., Максимова Р. А. Способ активации плазминогена: А. с. 564334 СССР.
3. Максимова Р. А., Шаркова Т. С., Андреевко Г. В. и др. Штамм *Arthrobotrys longa* Mecht — продуцент фибринолитических ферментов с активаторными свойствами: А. с. 2638407/13 СССР 1980.
4. Методы исследования фибринолитической системы крови / Под ред. Г. В. Андреевко. — М., 1981.

Поступила 19.06.90

#### PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF THE THROMBOLYTIC PREPARATION LONGOLYTIN

S. A. Tsymanovich, V. N. Nikandrov, R. A. Maximova, T. S. Sharkova, G. V. Andreenko, T. N. Serebryakova

M. V. Lomonosov State University, Moscow.

A preparation exhibiting high fibrinolytic activity and ability to activate plasminogen was isolated from cultivation medium of *Arthrobotrys longa*. Homogenous protein, obtained after gel filtration on Sephadex G-100, had molecular mass 28,600, pI-3.68-3.74, optimum activity at pH 6.0-9.0 and temperature optimum at 37°. The enzyme proved to be serine proteinase as shown by analysis using inhibitors; it required thiol groups.

Таблица 2

Влияние различных соединений на ФА и АА лонголитина (в % к контролю, принятому за 100 %)

Исследуемые соединения	ФА	АА
Фенилметилсульфонилфторид, $5 \cdot 10^{-2}$ М	0	0
Ингибитор трипсина бобов сои, 4 мг/мл	77	100
Контрикал 5000 АТРЕ	0	0
ЭДТА, $2 \cdot 10^2$ М	65	180
о-Фенантролин, $10^2$ М	60	125
п-ХМБ, $2 \cdot 10^2$ М	52	—
Диметилформамид, 50 %	172	146
АТФ:		
$10^{-4}$ М	100	100
$10^{-2}$ М	25	90