

Архив журнала

Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1985

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 meditsinskoi khimii

ISSN 0042-8809

1985

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>

ТОМ XXXI

ВЫПУСК 5

СЕНТЯБРЬ — ОКТЯБРЬ

Двухмесячный научно-теоретический журнал

Основан в 1955 г.

ВОПРОСЫ
МЕДИЦИНСКОЙ
ХИМИИ



МОСКВА. МЕДИЦИНА. 1985



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор С. С. ДЕБОВ

В. И. МАЗУРОВ (зам. главного редактора), Т. Т. БЕРЕЗОВ, Е. Н. ГЕРАСИ-
МОВА, В. З. ГОРКИН, И. Б. ЗБАРСКИЙ, А. Н. КЛИМОВ, Б. Ф. КОРОВКИН,
Л. А. ЛОКШИНА, В. Н. ОРЕХОВИЧ, Л. Ф. ПАНЧЕНКО, М. Ш. ПРОМЫСЛОВ,
Е. Л. РОЗЕНФЕЛЬД, Ю. А. РОМАКОВ (ответственный секретарь), В. А. САКС,
С. Е. СЕВЕРИН, В. Б. СПИРИЧЕВ

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

БАЕВ А. А. (Москва)
БЕЛИЦЕР В. А. (Киев)
БЫЧКОВ С. М. (Москва)
КОНСТАНТИНОВ А. А. (Хабаровск)
КУДРЯШОВ Б. А. (Москва)
ЛЯХОВИЧ В. В. (Новосибирск)
ПАСХИНА Т. С. (Москва)

ТРОИЦКИЙ Г. В. (Симферополь)
ТАРАКУЛОВ Я. Х. (Ташкент)
ТЯХЕПЫЛЬД Л. Я. (Тарту)
УТЕВСКИЙ А. М. (Харьков)
ШАПОТ В. С. (Москва)
ЯКОВЛЕВ Н. Н. (Ленинград)
ЯСАЙТИС А. А. (Вильнюс)

Адрес редакции журнала:

Москва, Солянка, 14

АМН СССР

Тел. 297-16-44

Зав. редакцией Л. А. Фирсова

1983

В. Н. Кулаков, В. Б. Қориунов, Н. К. Трифоненкова, Т. Л. Баженова,
В. П. Сорокин, В. В. Седов

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ХИМОТРИПСИНА И ТРИПСИНА, МЕЧЕННЫХ РАДИОИЗОТОПАМИ ЙОДА

Институт биофизики Минздрава СССР, НИИ по биологическим испытаниям химических соединений Министерства медицинской промышленности СССР

Ферментные препараты, содержащие протенназы и, в частности химотрипсин и трипсин, широко применяют в медицинской практике для лечения различных заболеваний [1].

Для эффективного использования ферментных препаратов необходимо знание особенностей их фармакокинетики при различных способах введения. Наиболее ценную информацию можно получить с помощью ферментов, меченных радиоизотопом — γ -излучателем. Для белков такими радиоактивными маркерами являются радионуклиды ^{125}I и ^{131}I . Однако процесс введения радиоизотопов йода в белки, в том числе и в ферменты, сопровождается часто побочными реакциями, что выражается в изменении специфических биологических свойств йодируемых биополимеров [6].

Ранее [8—10] была отмечена существенная инактивация химотрипсина и трипсина после введения в них радиоизотопов йода химическим йодированием с использованием в качестве окислителей монохлористого йода или хлорамина Т. Применение более слабых окислителей, например молекулярного йода [10], приводит к меньшей инактивации химотрипсина.

Поскольку в кровяном русле указанные ферменты образуют специфические комплексы с ингибиторами [5], инактивация фермента после его йодирования существенно изменяет его фармакокинетику. Поэтому получение меченных радиоизотопами йода ферментов без их существенной инактивации является важным этапом на пути изучения фармакокинетики ферментных лекарственных средств. Настоящая работа посвящена получению и сравнительному изучению трипсина и химотрипсина, меченных радиоизотопами йода, реакцией йодирования с помощью монохлористого йода [12] и электрохимически в потенциостатическом режиме [6].

Методика

В работе использованы следующие препараты: трипсин и химотрипсин [3], ингибитор протенназ тразилол (ФРГ), денатурированный гемоглобин лошади («Reanal», ВНР). Оптические измерения проводили с помощью спектрофотометра Ray Unicam SP-1800 (Англия) в кюветах толщиной 10 мм. Все реактивы имели квалификацию х. ч. или ч. д. а. Для йодирования использовали потенциостат П-5247 М, pH растворов измеряли потенциометрически с точностью $\pm 0,02$. Электрофорез на бумаге FN-4 проводили с помощью прибора ПВЭФ-1 в боратном буферном растворе pH 8,5 при 250 В в течение 45 мин. Газожидкостную хроматографию осуществляли на хроматографе Ray-204 (Англия); носитель — хромосорб S с 3% карбоанового каучука. Температура 170 °С, скорость тока геля 65 мл/мин.

П-нитрофенилацетат — т. пл. 78,5—79,5 °С (из хлороформа). % С — 52,65; % Н — 3,85; % N — 8,39, $\text{C}_8\text{H}_7\text{ON}$ Rf 0,74 на силуфол; подвижная фаза — хлороформ — гексан 2:1; молекулярная экстинкция при 420 нм — 17 000. Время выхода пика при газожидкостном хроматографировании — 4 мин 25 с.

Гель-фильтрация. Химотрипсин, трипсин и тразилол, использованные в работе, были гомогенны, по данным гель-фильтрации на сефадексе G-50 (глициновый буфер pH 3,0 для трипсина и фосфатный буфер pH 6,9 для химотрипсина и тразилола). Образцы фер-

Условия йодирования и характеристики химотрипсина и трипсина, меченных ^{125}I

Фермент	Способ йодирования	Соотношение йод белок	Выход, % ($\pm 3\%$)	Чистота, % ($\pm 2\%$)	Удельная радиоактивность, Бк · мг ⁻¹ · 10 ⁷
Химотрипсин	ICI	2:1	51	98	2,3
	Электрохимический		82	97	3,7
	ICI	4:1	37	96	1,6
	Электрохимический		65	97	2,7
	ICI	8:1	35	97	1,6
	Электрохимический		60	98	2,8
Трипсин	ICI	16:1	30	96	1,3
	ICI	2:1	27	97	1,2
	Электрохимический		90	98	4,0
	ICI	4:1	32	96	1,3
	Электрохимический		77	97	3,7
	ICI	8:1	38	96	1,7
	Электрохимический		62	98	1,5
	ICI	16:1	25	97	1,1

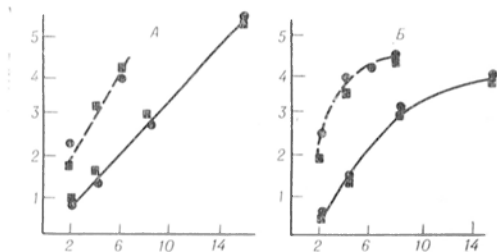


Рис. 1. Сопоставление результатов определения радиохимического выхода йодированных ферментов химотрипсина (А) и трипсина (В) спектрофотометрическим (кружочки) и радиохимическим (квадратики) методами.

Пунктирная линия — электрохимическое йодирование, сплошная — действие монохлористого йода. Здесь и на рис. 2 по оси абсцисс — количество йодирующего агента в реакционной смеси (в молях на 1 моль фермента). По оси ординат — число г-атомов йода, связанного с молекулой фермента.

ментов и ингибиторов содержали не более 5—7% низкомолекулярных примесей.

Йодирование химотрипсина и трипсина. Йодирование препаратов проводили с помощью монохлористого йода [12] и в электрохимической ячейке [6] при различных соотношениях йод/белок. Для одного йодирования использовали $18,5 \pm 3,7$ МБк радионуклидов ^{125}I или ^{131}I . Радиохимический выход определяли методом электрофореза на бумаге [4], химический — спектрофотометрически по результатам определения моно- и дийодтирозинов (МИТ и ДИТ) в йодированных ферментах [2]. Очистку от побочных форм йода, не связанных с белком, осуществляли методом гель-фильтрации на сефадексе G-15. Результаты представлены в таблице и на рис. 1 и 2.

Титрование активных центров протеиназ. Титрование проводили спектрофотометрически с помощью п-нитрофенилацетата по описанной ранее методике [1]. Результаты представлены на рис. 3.

Протеолитическая активность ферментов. Этот показатель определяли по методу Анфинсена [7], используя в качестве субстрата денатурированный гемоглобин лошади. Результаты представлены на рис. 4.

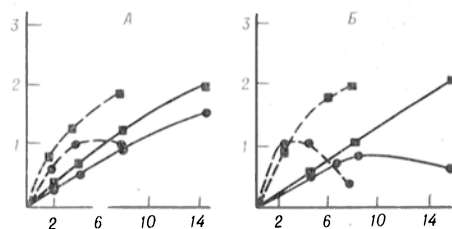


Рис. 2. Накопление МИТ (кружочки) и ДИТ (квадратики) в процессе йодирования ферментов химотрипсина (А) и трипсина (В) электрохимическим (пунктирная линия) и химическим (сплошная линия) способами.

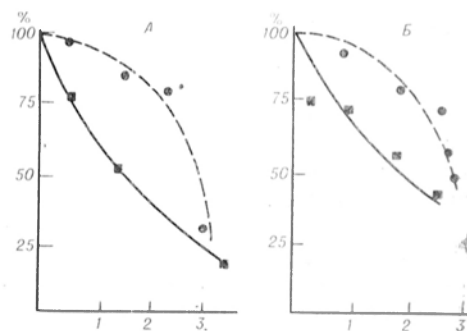


Рис. 3. Результаты титрования активных центров йодирования ферментов — химотрипсина (А), трипсина (В), п-нитрофенилацетатом. Ферменты получены электрохимическим йодированием (пунктирная линия) и действием монохлористого йода (сплошная линия). По оси абсцисс — суммарное содержание моно- и дийодтирозинов (в молях на 1 моль фермента), по оси ординат — число титруемых активных центров ферментов (в % к числу активных центров intactного фермента).

Результаты и обсуждение

Как видно из данных, представленных в таблице и на рис. 1 и 2, электрохимическое йодирование приводило к более высоким радиохимическим выходам. Хорошее совпадение результатов определения радиохимического выхода радиохимическим и спектрофотометрическим методами (см. рис. 1) свидетельствует о том, что йод связывался исключительно с остатками тирозина. Однако более низкие величины радиохимического выхода при действии монохлористого йода указывают на возможность расходования этого соединения на окисление белковой молекулы. Подтверждением этому могут служить обнаруженные различия в

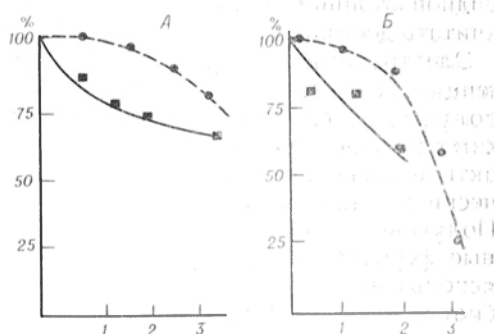


Рис. 4. Зависимость протеолитической активности йодированных ферментов: химотрипсина (А) и трипсина (В) от количества йодированных остатков тирозина в ферменте при электрохимическом (пунктирная линия) и химическом (сплошная линия) йодировании. По оси абсцисс — МИТ и ДИТ в йодированном ферменте (в молях на 1 моль), по оси ординат — протеолитическая активность йодированных ферментов (в % от таковой intactного фермента).

накоплениях МИТ и ДИТ в процессе йодирования (см. рис. 2). При электрохимическом йодировании преимущественно йодировались два тирозиновых остатка; при этом увеличению содержания ДИТ соответствовало пропорциональное уменьшение содержания МИТ, а при химическом йодировании количества МИТ и ДИТ увеличивались пропорционально возрастанию концентрации монохлористого йода.

Результаты определения ферментативной активности (см. рис. 3 и 4) свидетельствуют о преимуществе электрохимического метода йодирования по сравнению с химическим методом (монохлористый йод). Характерно, что йодирование первых двух тирозиновых остатков не изменяло существенно ферментативную активность ферментов. Резкое снижение активности наблюдалось при йодировании третьего и последующих тирозиновых остатков. Последние либо принимают непосредственное участие в формировании активных центров ферментов (например, тирозин-94 в молекуле химотрипсина), либо их йодирование сопровождалось конформационными изменениями всей белковой молекулы в результате увеличения отрицательного заряда ферментов (pK_a тирозина — 10,12; МИТ — 8,2; ДИТ — 6,8).

Таким образом, сравнительное изучение свойств химотрипсина и трипсина, меченных радиоизотопами йода, показывает, что химический метод йодирования не применим для получения меченых ферментов, а фармакокинетические исследования, выполненные с помощью таких радиоизотопных индикаторов, нельзя считать достоверными.

Электрохимическое йодирование в потенциостатических условиях позволяло получать меченные радиоизотопами йода химотрипсин и трипсин с ферментативной активностью, не отличающейся практически от таковой intactных ферментов. Полученные указанным способом меченые ферментные препараты могут быть использованы для различных медико-биологических исследований, в том числе при изучении фармакокинетики ферментных препаратов в условиях эксперимента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вольф М., Рансберсер К. Лечение ферментами. М., 1976.
2. Климова Т. П., Кулаков В. И., Станко В. И. и др. — *Stud. Biophys.*, 1973, vol. 38, p. 235—239.
3. Машковский Н. Д. Лекарственные средства. М., 1977, т. 2, с. 20—22.
4. Можайский А. М., Кулаков В. И., Станко В. И. — *Isotopenpraxis*, 7, 1971, S. 17—20.
5. Мосолов В. В., Протеолитические ферменты. М., 1971, с. 276—200.
6. Станко В. И., Кулаков В. И., Можайский А. М. — *Isotopenpraxis*, 9, 1973, S. 260.
7. Anfinsen C. B., Sela M., Trilch H. — *Arch. Biochem.*, 1956, vol. 65, p. 156—167.
8. Dube S. K., Roholt O. A., Pressman D. — *J. biol. Chem.*, 1964, vol. 239, p. 1809—1817.
9. Dube S. K., Roholt O. A., Pressman D. — *Ibid.*, 1966, vol. 241, p. 4665—4673.
10. Glasser A. M., Sager F. — *Biochem. J.*, 1956, vol. 62, p. 135—146.
11. Hartley B. S., Kilby B. A. — *Ibid.*, 1954, vol. 56, p. 288—295.
12. McFarlane A. S. — *Ibid.*, 1956, vol. 62, p. 135—146.
13. Steiner R. F. — *Ibid.*, 1966, p. 1964—1974.

Поступила 04.06.84

ISOLATION AND PROPERTIES OF CHYMOTRYPSIN AND TRYPSIN LABELLED WITH IODINE RADIOISOTOPES

V. N. Kulakov, V. B. Korshunov, N. K. Trifonenkova, T. L. Bazhenova, V. P. Sorokin, V. V. Sedov

Institute of Biophysics, Ministry of Public Health of the USSR, Institute for Biological Testing of Chemical Compounds, Ministry of Medical Industry of the USSR, Moscow

Comparative study of iodination of chymotrypsin and trypsin was carried out using either iodine monochloride or the electrochemical procedure under conditions of controlled anode potential. It was shown that a part of iodine monochloride was consumed for oxidation of protein molecules. As a result of this process specific activity of the enzymes was decreased down to 50-60% of the initial activity after introduction of 2 atoms of iodine per a molecule. The similar degree of iodination under mild conditions of electrolysis in potentiostatic experiments caused considerably lower decrease in the enzymatic activity, reaching 5-10% of the initial activity (after introduction of 1 atom of iodine per a molecule — 2-5%); labelling of trypsin and chymotrypsin by means of iodine radionuclides is promising for various medico-biological purposes.