

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ
СОЕДИНЕНИЯ

Том (A) XXIII

1981

№ 8

УДК 541(64+183.12) : 547.458.81

ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ РАСТВОРИМЫХ
КАРБОКСИМЕТИЛОВЫХ ЭФИРОВ ПОЛИСАХАРИДОВ
С БЕЛКАМИ

Ларионова Н. И., Униксова Л. Е., Миронов В. А.,
Сахаров И. Ю., Газанская Н. Ф., Березин И. В.

Исследованы закономерности образования растворимых полиэлектролитных комплексов на основе карбоксиметиловых эфиров целлюлозы и декстрана и основных белков. Изучено влияние степени полимеризации и степени замещения полисахаридов на содержание белкового ингибитора протеаз в полиэлектролитных комплексах. Отмечается существенное влияние белок-белкового взаимодействия в полиэлектролитном комплексе на свойства ингибитора протеаз. Найдено, что взаимодействие с полианионами значительно стабилизирует макромолекулу белка.

В последние годы большой интерес вызывают исследования водорасстворимых полимерных комплексов между белками и полиэлектролитами [1–4]. Возможные методы изучения и применения полиэлектролитных комплексов (ПЭК), включающих ферменты и гормоны, нашли отражение в обзоре Самсонова [4]. Водорастворимые полимерные производные белков, так же как и иммобилизованные на нерастворимых матрицах, часто обладают повышенной стабильностью по отношению к денатурирующим воздействиям [5–8] и поэтому могут использоваться в различных областях тонкой химической технологии, в медицине и биологии.

Настоящая работа посвящена исследованию закономерностей образования растворимых ПЭК на основе слабых полиэлектролитов: карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), карбоксиметилового эфира декстрана (КМД) и основных белков, обладающих способностью ингибировать различные протеолитические ферменты (трипсин, химотрипсин, калликреин и т. д.).

На-соль КМЦ (Na^+ -форма) — растворимые препараты Наманганского химического завода, характеризующиеся следующими степенями замещения и степенями полимеризации: 0,69 и 500; 0,85 и 500; 0,85 и 730 соответственно. КМД (Na^+) получали в максимально концентрированных водных растворах при комнатной температуре. К 40%-ному водному раствору декстрана (препараты Минского завода медпрепаратов) при перемешивании добавляли насыщенный растворmonoхлората натрия и медленно подщелачивали смесь раствором едкого натра ($[\text{NaOH}] = 6 \text{ моль/л}$). После 30 мин перемешивания раствор оставляли на 10 сут, нейтрализовали 1 M HCl, дважды переосаждали этанолом, диализовали и высушивали. Описанный выше способ, в отличие от методов карбоксиметилирования в водной среде при повышенных температурах (50–100°) [9] и в суспензионной среде [10], как нами специально показано, приводит к уменьшению степени гидролиза monoхлората натрия и к получению недеструктурированного продукта с линейной структурой (табл. 1). Наличие карбоксиметильных групп в полученных образцах доказано появлением полос поглощения при 1570 и 1610–1650 см^{-1} [11]. Использовали следующие белковые препараты: «гордокс» — фирмы «Gedeon Richter» (Венгрия); «пантрипин», трипсин — завода медицинских препаратов Ленинградского мясокомбината им. С. М. Кирова.

Ингибирующую активность препаратов определяли по относительной эстеразной активности трипсина, остающегося свободным после инкубации с соответствующим препаратом ПЭК при рН 7,8 и 25° в течение 15 мин. Эстеразную активность трипсина

Таблица 1

Характеристики синтезированных образцов КМД

| Исходный декстран | Мольное соотношение реагентов ангидро-D-глюкопираноза : мо- нохлорасетат натрия : едкий натр | Степень замещения | $[\eta]$, дл/г |
|---|--|----------------------|-----------------|
| Реополиглюкин ($M_v=4 \cdot 10^4$) | — | — | 0,21 |
| | 1,0 : 1,2 : 1,2 | 0,41 | 0,22 |
| | 1,0 : 1,6 : 1,6 | 0,53 | 0,25 |
| Полиглюкин ($M_v=6 \cdot 10^4$) | 1,0 : 2,4 : 2,4 | 0,69 | 0,28 |
| | — | — | 0,25 |
| | 1,0 : 1,2 : 1,2 | 0,40 | 0,26 |
| | 1,0 : 1,6 : 1,6 | 0,51 | 0,26 |
| | 1,0 : 2,4 : 2,4 | 0,59 | 0,27 |

Таблица 2

Условия образования и свойства ПЭК на основе карбоксиметиловых эфиров полисахаридов и «пантрипина»

| Полисахарид (степень замещения/степень полимеризации) | Концентрация карбоксиметилового эфира полисахарида, г/л | Концентрация «пантрипина», г/л | pH | Ионная сила | Ингибирующая активность ПЭК, вес. % | Сохранение активности связанного белка, % |
|---|---|--------------------------------|-----|-------------|-------------------------------------|---|
| Na^+ -форма КМЦ (0,85/500) | 1,7 | 8,3 | 9,0 | 0,2 | 4,9 | — |
| | 1,7 | 13,3 | 9,0 | 0,2 | 7,7 | — |
| Na^+ -форма КМЦ (0,69/500) | 1,7 | 8,3 | 9,0 | 0,2 | 15,0 | — |
| H^+ -форма КМД (0,59/300) | 16 | 36,0 | 5,7 | 0,1 | 4,4 | 54,5 |
| | 36 | 36,0 | 5,7 | 0,1 | 4,4 | 19,5 |
| Na^+ -форма КМД (0,59/300) | 16 | 36,0 | 5,7 | 0,1 | 10 | — |

определяли по начальной скорости гидролиза этилового эфира N-бензоил-L-аргинина методом потенциометрического титрования на pH-стабе («Radiometer», Дания). Объем раствора $4 \cdot 10^{-3}$ л; $[\text{S}]_{\text{пп}} = 1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, 25° ; ионная сила 0,1, при которой диссоциации ПЭК не происходит.

ПЭК кислых полисахаридов с белками получали при добавлении лиофильно высушенных обессоленных препаратов «гордокс» или «пантрипин» к растворам КМЦ и КМД с различной ионной силой и различными значениями pH (рис. 1, табл. 2). Смесь выдерживали 16 ч при 25° . Отделение ПЭК от белков проводили методами ультрафильтрации с использованием фильтра РМ10 «Amicor» (Голландия) или гель-хроматографией на сефарозе 6B (25×700 мм), уравновешенной растворами NaCl различной концентрации. За хроматографическим разделением белковых препаратов следили по изменению оптической плотности при 280 нм и после проведения реакции на полисахариды по Дюбуа [12] при 485 нм. Обессоленные препараты лиофильно высушивали.

Изоэлектрофокусирование различных препаратов, содержащих белки, проводили в колонке фирмы LKB (Швеция) объемом 0,11 л при 25° , используя смесь амфолинов, дающую градиент pH от 3 до 10 в градиенте сахарозы 40–0%. После проведения изоэлектрофокусирования в течение 36 ч при напряжении 800 В колонку опорожняли, собирая фракцию по 2 мл и записывая изменение оптической плотности при 280 нм. Определяли pH каждой фракции на pH-метре РНМ-26 «Radiometer» (Дания).

Тепловую необратимую денатурацию белковых препаратов проводили при pH 8,0 в 0,1 M NaCl при 97° . Пробы инкубируемого раствора, отобранные в различные моменты времени, охлаждали до 25° и определяли остаточную ингибирующую активность.

Используемые в данной работе в качестве полианионов растворимые карбоксиметиловые эфиры целлюлозы со степенью замещения выше 0,7 представляют собой макромолекулы диаметром 1,0–1,2 и длиной

$0,515P$ нм (P – степень полимеризации) [13]. Состав используемых белковых препаратов изучен методом изоэлектрического фокусирования. Препарат «пантрипин» является сложной смесью белков с рI от 4,5 до 10,5 (рис. 2), причем биологической активностью – способностью ингибировать протеазы – обладает наиболее основной белок, содержание которого в препарате составляет 8,6 %. Белок препарата «гордокс» имеет рI=10,5 и проявляет 100%-ную ингибирующую активность.

При взаимодействии КМЦ и КМД с «гордоксом» и «пантрипином» образуются ПЭК, которые могут быть отделены от несвязанного белка хроматографически (рис. 3). Однако при хроматографическом разделении потери белка и полисахарида довольно значительны. Поэтому для препа-

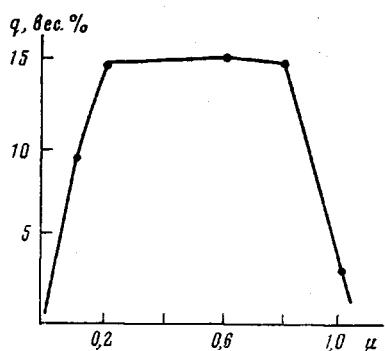


Рис. 1

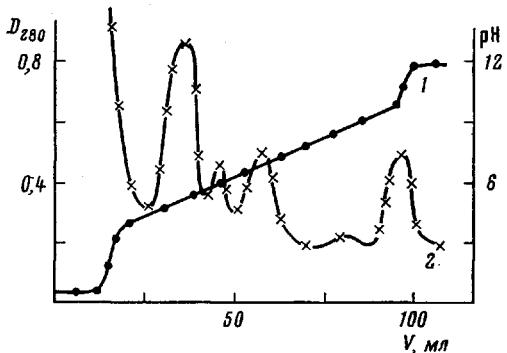


Рис. 2

Рис. 1. Влияние ионной силы раствора на содержание активного ингибитора q в ПЭК. Условия получения ПЭК: КМЦ со степенью полимеризации 500 и степенью замещения 0,69. Концентрация КМЦ 1,7, «пантрипин» 8,3 г/л; рН 8,7; 16 ч; 25°

Рис. 2. Изоэлектрофокусирование «пантрипина» (40 мг белка, 25°): 1 – градиент рН, 2 – D_{280}

ративных целей метод ультрафильтрации, позволяющий проводить хорошее разделение высоко- и низкомолекулярной форм белка с минимальными потерями, более предпочтителен. Для выявления взаимосвязи физико-химических особенностей образования ПЭК и активности белка в комплексе на примере КМЦ и «гордокса» исследовано влияние степени полимеризации и степени замещения, а также соотношения концентраций полиэлектролитов на свойства полученных препаратов. Данные рис. 4 показывают, что связывание «гордокса» на КМЦ характеризуется лэнгмюровской изотермой адсорбции, что свидетельствует о статистическом взаимодействии макромолекул. Увеличение степени замещения, т. е. плотности заряда (при постоянной степени полимеризации 500), приводит к увеличению содержания активного ингибитора в препарате. Увеличение степени полимеризации от 500 до 730 (при постоянной степени замещения 0,85) сопровождается, по-видимому, из-за стерических препятствий, более медленным достижением предельного содержания ингибитора на 1 г препарата, одинакового для КМЦ с одной степенью замещения. Некоторые представления о строении ПЭК между «гордоксом», КМЦ и КМД могут быть получены на основе данных о взаимодействии глобулярных белков с жесткими, сильно асимметричными полианионами. В указанных системах наблюдается образование ионных комплексов состава A_mB_n , где А – полианион, Б – белок, $m=1$, $n \geq 1$. Комплексы, содержащие несколько макромолекул полианиона, не зафиксированы [14]. В системе «гордокс» – КМД методом гель-хроматографии также не обнаружены ПЭК, в составе которых имеется более одной молекулы полианиона. При изменении соотношений концентраций белка и карбоксиметилового эфира

полисахарида образуются ионные комплексы с различным содержанием белка (табл. 2).

Свойства белка в ПЭК в значительной степени изменяются по сравнению со свойствами нативного белка. Биологическая активность белка в полимерном комплексе, оцениваемая по реакции его ассоциации с трипсином, зависит от общего количества белка. Сближение молекул белка, наблюдавшееся при образовании полимерных комплексов, где n достаточно велико, создает серьезные стерические затруднения для взаимодействия их реакционных центров с трипсином, поэтому ингибирующая активность таких ПЭК значительно снижена (табл. 3).

Исследование межмолекулярного взаимодействия КМЦ и КМД со сложной белковой смесью («пантрипином») позволяет выявить роль спе-

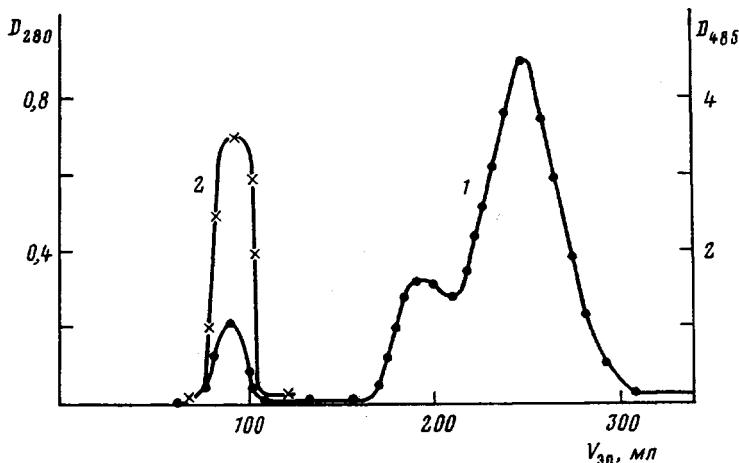


Рис. 3. Выделение ПЭК «пантрипина» с КМД методом гель-фильтрации на сепарозе 6B (25×700 мм): 1 — оптическая плотность фракции при 280 нм; 2 — оптическая плотность при 485 нм после проведения реакции на полисахариды по Дюбуа [42]

цифического комплексообразования в системах с растворимыми полиэлектролитами. Данные табл. 2 показывают, что комплексообразование белков «пантрипина» с КМЦ с высокой степенью замещения происходит статистически и количество активного ингибитора в препарате возрастает прямо пропорционально общему количеству белка, взятому в реакцию. При понижении степени замещения до 0,69 наблюдается конкуренция между белками с различными изоионными точками за комплексообразование с КМЦ, причем предпочтительнее связываются более основные

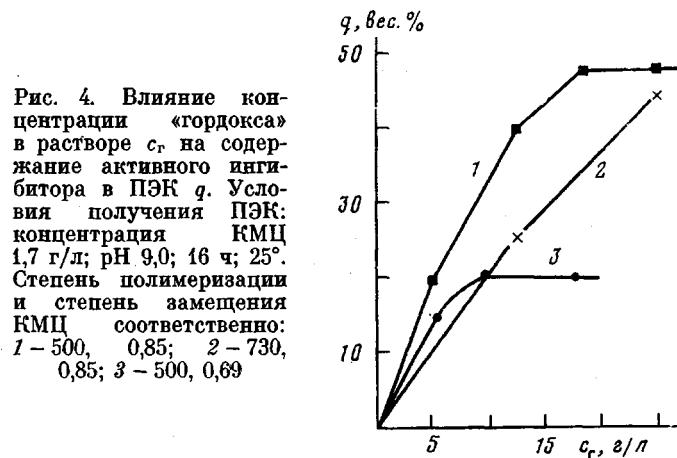
Таблица 3

Влияние условий реакции комплексообразования КМД с «гордоксом» на состав и свойства полученных ПЭК

| Условия реакции * | | Количество связанных белка, мг/г комплекса | n | Сохранение ингибирующей активности, % |
|-----------------------------|-----------------------|--|-----|---------------------------------------|
| концентрация «гордока», г/л | концентрация КМД, г/л | | | |
| 2,4 | 20 | 147 | 1,6 | 100 |
| 8,0 | 20 | 670 | 18 | 53 |

* pH 5,7, $[NaCl] = 0,1$ моль/л.

белки, в связи с чем макромолекулярный комплекс обогащается ингибитором. Аналогичный эффект прослеживается при изменении соотношения концентраций КМД (H^+ -форма) : «пантрицин», сопровождающееся увеличением ингибирующей активности связанного белка. Для проверки свойств белка, связанного в комплексе с КМД, было проведено его изоэлектрофокусирование после разрушения комплекса в 1 M NaCl . Данные рис. 5 показывают значительное уменьшение содержания белков с $\text{pI} < 7,2$ и увеличение содержания компонента с $\text{pI} \sim 10,5$.



Изучение влияния ионной силы раствора при комплексообразовании КМД и КМЦ с «пантрицином» на состав ПЭК позволяет найти область его устойчивого состояния, в которой конкуренция со стороны противоионов Na^+ и Cl^- не приводит к диссоциации комплекса с наиболее основными

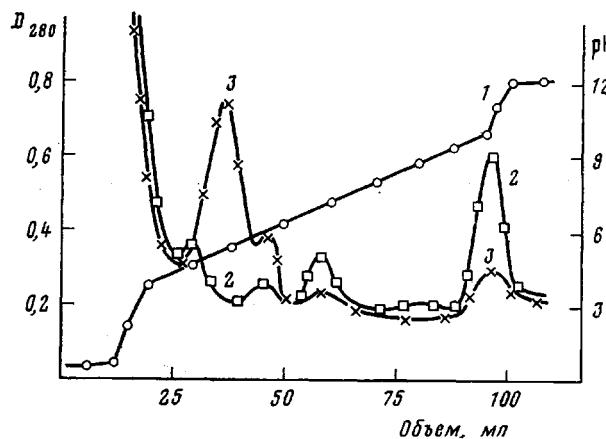


Рис. 5. Изоэлектрофокусирование белка, полученного после разрушения комплекса «пантрицина» с КМД (2), и «пантрицина», не связавшегося с КМД (3); 1 – градиент pH

белками (рис. 1). Сопоставление ингибирующей активности полимерных комплексов, образующихся при реакции «пантрицина» с Na^+ - и кислой формами КМД, указывает на то, что реакции обмена между слабой полимерной кислотой и белком при $\text{pH} < \text{pI}_{\text{белок}}$ осуществляется в значительно меньшей степени, чем реакция между полимерными слоями, практически полностью ионизированными в растворе. Это находится в соответствии с результатами исследований реакций обмена и нейтрализации с участием слабых синтетических полизелектролитов [15].

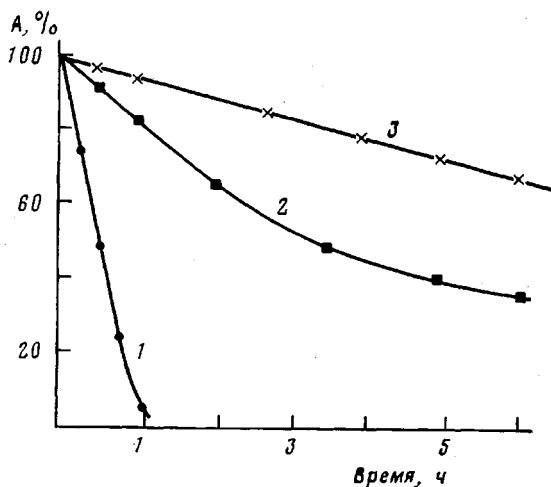


Рис. 6. Кинетические кривые термоинактивации «гордокса» в ПЭК (A – ингибирующая активность): 1 – исходный «гордокс»; 2, 3 – ПЭК с $n=1,6$ и 18 (табл. 3) соответственно

Реакции полиэлектролитов с физиологически активными веществами часто сопровождаются существенными конформационными изменениями различного характера [4]. При образовании полиэлектролитного комплекса между КМД (Na^+ -форма) и «гордоксом» возникает множество нековалентных связей, что делает структуру белка более упорядоченной и затрудняет разворачивание белковой глобулы. В результате этого белок в составе полиэлектролитного комплекса оказывается более термостабильным, чем нативный (рис. 6). Обращает на себя внимание тот факт, что константа скорости инактивации «гордокса», ионно связанного с КМД, зависит от соотношения компонентов в полимерном комплексе. По-видимому, белок-белковое взаимодействие в полиэлектролитном комплексе, отмеченное нами ранее, вносит дополнительный вклад в конформационную устойчивость «гордокса».

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о том, что полиэлектролитные комплексы между кислыми полисахаридами и основными белками наряду с сохранением высокой биологической активности обладают рядом свойств, существенно отличающихся от свойств исходных макромолекул (изоэлектрические точки, термостабильность, молекулярные размеры), что открывает новые возможности в поиске модифицированных форм белков с заданными свойствами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кабанов В. А., Евдаков В. П., Мустафаев М. И., Антипина А. Д. Ковалентное связывание сывороточного альбумина кватернизованными поли-4-винилипиридинами и структура образующихся комплексов.– Молек. биол., 1977, т. 11, № 3, с. 582.
2. Кабанов В. А., Мустафаев М. И., Белова В. В., Евдаков В. П. Растворимые комплексы бычьего сывороточного альбумина с амфотерными линейными полиэлектролитами.– Молек. биол., 1978, т. 12, № 6, с. 1264.
3. Стрельцова З. А., Швадас В.-Ю. К., Максименко А. В., Клесов А. А., Брауз Е. Е., Толстогузов В. Б., Березин И. В. Влияние полиэлектролитов на свойства пенициллинамидазы и щелочной фосфатазы.– Биоорганич. химия, 1975, т. 1, № 10, с. 1464.
4. Самсонов Г. В. Полимерные комплексы, включающие синтетические полиэлектролиты и физиологически активные компоненты.– Высокомолек. соед. А, 1979, т. 21, № 4, с. 723.
5. Marshall J. J., Rabinowitz M. L. Stabilization of catalase by covalent attachment to dextran.– Biotechnol. and Bioengng, 1976, v. 18, № 14, p. 1325.

6. Торчилин В. П., Рейзер И. Л., Смирнов В. Н., Чазов Е. И. Иммобилизация ферментов на биосовместимых носителях. III. Иммобилизация α -химотрипсина на растворимых носителях.— Биоорганич. химия, 1976, т. 2, № 9, с. 1251.
7. Ларионова Н. И., Казанская Н. Ф., Сахаров И. Ю. Растворимые высокомолекулярные производные панкреатического ингибитора трипсина. Влияние электростатического взаимодействия белка с носителем на процесс их ковалентного связывания и некоторые физико-химические характеристики модифицированных препаратов панкреатического ингибитора.— Биохимия, 1979, т. 44, № 11, с. 2033.
8. Диков М. М., Осипов А. П., Егоров А. М., Березин И. В., Кирш Ю. Э., Лебедева Т. С., Кабанов В. А. Повышение стабильности формиатдегидрогеназы при ковалентном присоединении к водорасторвимому сополимеру 4-винилпиридина и акролеина.— Биоорганич. химия, 1979, т. 5, № 1, с. 126.
9. Pat. 53844 (PNR). Preparation of pure water-soluble CM-dextran / Mioduszewski K.— Printed in Chem. Abstrs, 1968, v. 68, 70387.
10. Джариял Ч. Д., Жигач К. Ф., Малинина А. И., Тимохин И. М., Финкельштейн М. З. Изучение факторов, влияющих на эффективность процесса карбоксиметилирования целлюлозы.— Ж. прикл. химии, 1964, т. 37, № 5, с. 1099.
11. Вдовина Л. М., Коблова О. Е., Кохно Т. А. Физико-химическое исследование карбоксилатов натрия.— Химия и химич. технол., 1977, т. 20, № 1, с. 11.
12. Dubois M., Gilles K. S., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances.— Analyt. Chem., 1956, v. 28, № 2, p. 350.
13. Rinaudo M., Hudry-Clergeon G. A study of CM-cellulose with various degree of substitution.— J. Chim. Phys. et Phys.-chim. Biol., 1967, v. 64, № 11, p. 1746.
14. Nakagaki M., Sano Y. Light-scattering studies of the interaction of sodium chondroitin sulfate C with bovine serum albumin.— Bull. Chem. Soc. Japan, 1972, v. 45, № 4, p. 1011.
15. Зезин А. Б., Рогачева В. Б. Полиэлектролитные комплексы.— В сб.: Успехи химии и физики полимеров / Под ред. Роговина З. А. М.: Химия, 1973, с. 3.

Московский государственный
университет им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию
30.VII.1980

**STUDY OF THE COMPLEX FORMATION BETWEEN SOLUBLE
CARBOXYMETHYL ETHERS OF POLYSACCHARIDES
AND PROTEINS**

Larionova N. I., Unksova L. Ye, | Mironov V. A.,
Sakharov I. Yu., Kazanskaya N. F., Berezin I. V.

Summary

The regularities of the formation of soluble polyelectrolyte complexes between carboxymethyl ethers of cellulose and dextrane and basic proteins have been studied. The influence of the degree of polymerization and degree of substitution of polysaccharides on the content of protein proteases inhibitor in polyelectrolyte complexes was studied. The essential influence of protein-protein interaction in polyelectrolyte complex on the properties of proteases inhibitor was discussed. The stabilization of protein macromolecule as a result of the interaction with polyanions was found.