

УДК 541.64:543.544

ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИЯ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ ТРОМБОПЛАСТИНА

**Фадеева И. В., Староверов С. М., Лисичкин Г. В., Гайда А. В.,
Магеровский Ю. В., Монастырский В. А.**

Описана гель-хроматография липопротеидного комплекса тканевого тромбопластина (фактор III свертывания крови) на кремнеземных сорбентах с различной пористой структурой, модифицированных γ -глицидооксипропилтриэтилоксисилианом. Показано, что наилучшая степень очистки тромбопластина достигается при использовании химически модифицированных кремнеземных сорбентов с диаметром пор 44–65 нм. Применение кремнеземных сорбентов позволяет повысить эффективность очистки по сравнению с органополимерными носителями типа Сефадекс.

Тканевый тромбопластин (фактор III свертывания крови) представляет собой высокомолекулярный липопротеидный комплекс с $M=3 \cdot 10^5$ [1]. Он является инициатором внешнего пути свертывания крови, активируя совместно с фактором VIIa тромбокиназу (фактор X), которая в свою очередь активирует протромбин, превращая его в активный тромбин.

Описаны методы очистки липопротеидного комплекса тромбопластина с использованием хроматографии на Сефарозе или Сефадексе G-200 [2, 3]. Однако применение этих сорбентов не позволяет получить препараты достаточно высокой очистки, необходимой при проведении различных экспериментов *in vivo*. Кроме того, органополимерные носители набухают, они подвержены микробиологическому разрушению, дают низкую стабильность колонки, а значит и плохую воспроизводимость очистки.

В связи с этим возникла необходимость разработки сорбента на основе минеральных носителей, не способного к специальному взаимодействию с тромбопластином.

С целью подбора оптимальных условий хроматографирования тромбопластина синтезировали ряд модифицированных гликогруппами кремнеземных сорбентов [4] с различной пористой структурой. Для сравнения использовали сорбенты Сефадекс G-200 («Фармация Файн Кэмиклз», Швеция), ультрогель АсА 34 («ЛКБ», Франция), Акрилекс Р-300 («Реал», ВНР) и Тойоцерл HW-55F («Тойо сода», Япония).

Исходными носителями служили отечественные кремнеземы, характеристики которых приведены в табл. 1. Структурные характеристики носителей определяли методом ртутной порометрии. Измерения проводили последовательно на поромерах

Таблица 1

Характеристики модифицированных сорбентов

Кремнезем	$d_{\text{пор}}$, нм	$V_{\text{пор}}$, см ³ /г	$S_{\text{уд}}$, м ² /г	Содержание углерода, %	Плотность прививки, групп/нм ²
CX-2	110	1,72	54	1,3	2,1
CX-3	65	2,03	125	3,2	2,8
C-80	44	1,28	116	2,8	2,6
KCK-1	24	0,99	170	3,9	2,6
KCK-2	14	0,60	270	5,9	2,7
KCC-3	7	0,80	490	6,4	1,6

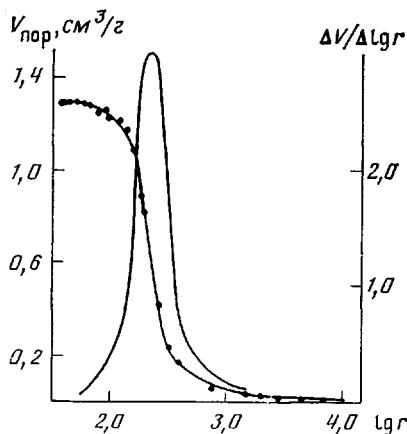


Рис. 1

Рис. 2. Профили элюции тромбопластина с использованием КСК-1 (а), С-80 (б), CX-2 (в) и CX-3 (г). 1 — содержание белка, 2 — мутность растворов, 3 — специфическая активность. N — номер фракции

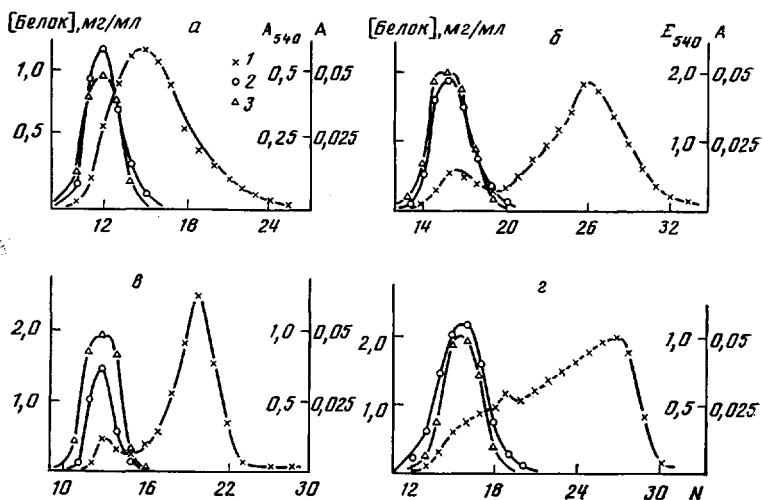


Рис. 2

низкого и высокого давления. На поромере низкого давления поры предварительно вакуумированного образца заполняли ртутью при давлениях от 10^{-3} мм рт. ст. до 1 атм, а на поромере высокого давления ртуть вдавливали в поры, создавая давление от 1 до 2500 атм. Эквивалентный радиус пор для ряда давлений находили по формуле $r_e = -2\sigma \cos \theta/p$, где σ — поверхностное натяжение ртути, θ — угол смачивания ртутью поверхности кремнезема, p — давление.

Объем вдавленной ртути определяли дилатометром и рассчитывали соответствующий объем пор образца. Далее находили распределение пор по радиусам и удельную поверхность. Типичная программа приведена на рис. 1.

Модифицирование кремнеземов γ -глицидооксипропильными группами проводили по следующей методике.

Сорбенты с эпоксигруппами. В трехгорлую колбу на 500 мл с термометром, мешалкой и обратным холодильником помещали 20 г носителя и заливали буферным раствором с pH 5,5–5,7 (0,1 м. Na-ацетат). Нагревали на водяной бане до 90° и добавляли модификатор ЭС-1 (гаммаглицидооксипропилтриэтоксисилан) из расчета 5 групп/нм². Реакционную смесь нагревали в течение 1 ч, затем промывали на фильтре водой, ацетоном, эфиrom.

Сорбенты с гликолевыми группами получали гидролизом эпоксигрупп. 20 г сорбента с эпоксигруппами помещали в колбу с мешалкой и обратным холодильником, заливали водой и с помощью серной кислоты доводили pH до 1,0–1,5. Затем нагревали на водяной бане в течение 1–2 ч, промывали на фильтре водой до нейтральной среды, затем ацетоном и эфиrom.

В синтезированных образцах определяли содержание органического вещества с помощью элементного анализа, который проводили по классической схеме сжигания навески в токе кислорода и последующего количественного определения продуктов разложения.

Реактивы и установку подготавливали в соответствии с рекомендациями [5]. Скорость тока кислорода составляла 30 мл/мин, время сжигания навески (0,03 г) 1 ч.

Навеску модифицированного сорбента помещали в пробирку, термически разлагали в токе кислорода и определяли количество образовавшихся двуокиси углерода

Таблица 2

Результаты очистки липопротеидного комплекса тромбопластина

Сорбент	[Белок], мг/мл	E_{540}	$\frac{E_{540}}{[белок]}$	Кратность очистки	Выход, %
CX-2 (110 нм)	0,32	0,56	1,75	3,3	79
CX-3 (65 нм)	0,27	0,73	2,70	5,4	85
C-80	0,23	0,62	2,70	5,4	83
KCK-1	0,49	0,52	1,10	2,2	75
KCK-2	1,10	0,65	0,60	1,2	80
KCC-3	1,23	0,63	0,52	1,0	77
Сефадекс G-200	0,62	1,45	2,30	4,6	80
Ультрогель AcA 34	0,42	0,86	2,00	4,0	78
Акрилекс Р-300	0,70	1,70	2,40	4,8	83
Тойоперл HW-55	0,55	1,32	2,50	5,0	84
Экстракт	7,90	4,00	0,50	1	100

и воды по привесу поглотителей. На основании этих данных рассчитывали количество органического вещества.

Плотность прививки определяли исходя из исправленной величины удельной поверхности с учетом содержания органического вещества в навеске. Данные по элементному анализу и плотности прививки представлены в табл. 1.

Синтезированные сорбенты и взятые для сравнения сорбенты Сефадекс G=200, Ультрогель AcA 34, Акрилекс Р-300 и Тойоперл HW-55F набивали в колонки (20×0,8 см) и уравновешивали буферным раствором, в котором проводили экстракцию тромбопластина.

Экстракт липопротеидного комплекса тромбопластина готовили следующим образом. 5 г лиофильно высущенного кадаверного мозга человека гомогенизировали в фарфоровой ступе с 50 мл 0,05 м. Na-fosфатного буфера с pH 7,5, содержащего 0,15 м. NaCl, и центрифугировали при 6000 об/мин в течение 20 мин. Осадок отбрасывали, а супернатант подвергали хроматографической очистке.

Скорость элюирования составляла 0,08–0,4 мл/см² мин, объем фракций – 0,85 мл. Во всех фракциях определяли мутность (поглощение света при 540 нм) E_{540} , содержание белка при помощи кумасси G-250 и специфическую активность A. Для оценки чистоты препарата тромбопластина использовали соотношение мутности к содержанию белка в растворе.

Результаты очистки липопротеидного комплекса тромбопластина с использованием различных носителей приведены в табл. 2. Оказалось, что наилучшая степень очистки достигается при использовании кремнеземных сорбентов с привитыми гликогруппами с диаметром пор 44–65 нм. Кроме того, при хроматографии на кремнеземных сорбентах удается достичь минимального разбавления (отношение объема раствора очищенного тромбопластина к объему экстракта) при максимальной скорости процесса. Выход тромбопластина при этом составляет 75–85 %.

Результаты, приведенные в табл. 2, хорошо согласуются с профилями элюции липопротеидных ВМС, представленными на рис. 2. Действительно, наилучшее отделение белка, обладающего тромбопластической активностью, от примесных белков достигается при использовании сорбентов с диаметром пор 44–65 нм (силохром C-80 и CX-3).

ЛИТЕРАТУРА

1. Gardiner J. E., Howell R. M. // Biochem. Soc. Trans. 1980. V. 8. P. 133.
2. Wijngaards G., Hemker H. C., van Deenen L. L. M. // Haemostasis. 1977. V. 6. P. 269.
3. Gontmori H., Takeda Y. // Thromb. Haemostasis. 1976. V. 36. P. 90.
4. Модифицированные кремнеземы в сорбции, катализе и хроматографии / Под ред. Лисичкина Г. В. М., 1986.
5. Климова В. А. Основные микрометоды анализа органических соединений. М., 1975.

Московский государственный
университет им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию
25.III.1986

Львовский научно-исследовательский институт
гематологии и переливания крови

**GEL CHROMATOGRAPHY OF HIGH-MOLECULAR COMPLEXES
OF TROMBOPLASTINE**

**Fadeeva I. V., Staroverov S. M., Lisichkin G. V., Gaida A. V.,
Magerovskii Yu. V., Monastyrskii V. A.**

S u m m a r y

Gel chromatography of the lipoproteide complex of tissue thromboplastine (factor III of blood coagulation) on silica sorbents having various porous structure and modified with γ -glycidooxypropyltriethoxysilane is described. The best degree of purification of thromboplastine is shown to be attained when using the chemically modified silica sorbents having the pores of the 44-65 nm diameter. Application of silica sorbents permits to enhance the purification efficiency comparing with organopolymer carriers of Sefadex type.