

УДК 612.015.1. 616.8—085.83

ФИЗИОЛОГИЯ

Л. А. Матинян, Г. К. Маркосян, Л. С. Маркосян

Сравнительная оценка электрофоретической подвижности
нативного и иммобилизованного трипсина

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР О. Г. Баклаваджяном 8/IV 1980)

В последние годы большой интерес исследователей-экспериментаторов вызывают иммобилизованные ферменты. Ряд авторов отмечает их большие преимущества по сравнению с нативными ферментами—так, иммобилизованные ферменты обладают высокой термостабильностью, низкой токсичностью, не вызывают иммунологических реакций, еще более существенны их пролонгированное действие и медленное выделение из организма (¹⁻³) и более высокая, сравнительно с нативными ферментами, терапевтическая активность (⁴⁻⁶), показанная в эксперименте.

В настоящее время намечаются пути к применению иммобилизованных ферментов в клинической практике. Наряду с другими аспектами этой проблемы представляет интерес также разработка способов введения иммобилизованных ферментов в организм. Одним из этих способов является электрофоретическое введение ферментов. В нашей предыдущей работе мы изучали форез нативного трипсина, целью данной работы были доказательство возможности электрофоретического введения иммобилизованного трипсина и сравнительная оценка электрофоретической подвижности нативного и иммобилизованного трипсина.

Для изучения электрофоретической подвижности трипсина нами были проведены физико-химические исследования согласно методическим указаниям В. С. Улашика (⁸⁻¹²).

Исследования проводились в трехкамерной электролитической ячейке Бойцова—Улашика, обеспечивающей условия, близкие к физиологическому электрофорезу. В качестве объекта исследования мы использовали нативный кристаллический трипсин фирмы «Спофа» (ЧССР) и иммобилизованный трипсин, полученный путем иммобилизации указанного препарата на растворимом сополимере винилпирролидона с акролеином. Раствор трипсина приготовили ex tempore из расчета 10 мг на 15 мл. В качестве растворителя использовали боратный буферный раствор с pH 8,9—9,0.

Определение протеолитической активности нативного и иммобили-

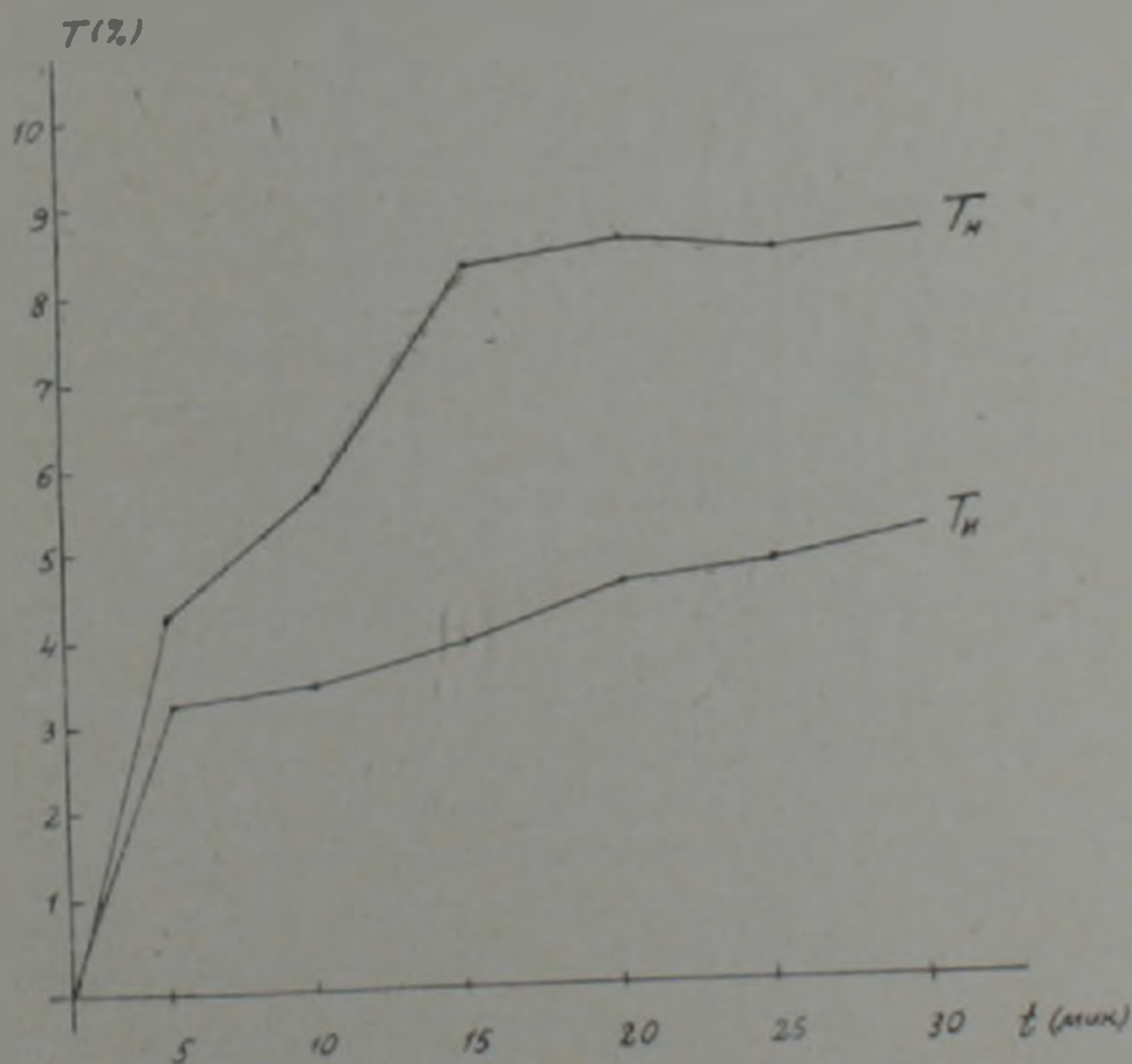
зованного трипсина проводили по методике Эрлангера в модификации Шатерникова (³). Трипсин определяли в исходном растворе при каждом его приготовлении и в растворах всех трех камер после проведения форе́за.

В качестве мембраны использовали хроматографическую бумагу типа «Фильтрак» FN-1 (ЧССР).

Для проведения электрофореза применялся отечественный аппарат АГП. Полученные результаты подвергались статистической обработке.

Всего было поставлено 360 опытов. В 90 опытах изучался электрофорез нативного трипсина, в 90 же опытах—иммобилизованного. Параллельно—для контроля—изучалась диффузия нативного и иммобилизованного трипсина—по 90 опытов соответственно. Параметры времени были 5, 10, 15, 20, 25 и 30 мин. по каждому параметру было поставлено по 15 опытов.

Результаты опытов полностью приведены в таблице в виде процентов от исходной активности раствора трипсина, подвергаемого электрофорезу. Заслуживает внимания тот факт, что определяемая по методике Эрлангера в модификации Шатерникова активность нативного и иммобилизованного трипсина была примерно одинакова и составляла в среднем 160—180 единиц.



Изменение форетической подвижности нативного и иммобилизованного трипсина с увеличением длительности воздействия

Электрофоретическая подвижность нативного и иммобилизованного трипсина

t, мин	Нативный трипсин						Иммобилизованный трипсин					
	Электрофорез			Диффузия			Электрофорез			Диффузия		
	анодная камера	средняя камера	катодная камера	правая камера	средняя камера	левая камера	анодная камера	средняя камера	катодная камера	правая камера	средняя камера	левая камера
5	—	90±5.6	4.2±0.35	1.7±0.27	95±2.8	1.6±0.22	—	94±3.6	3.2±0.48	1.6±0.31	87±5.4	1.6±0.40
10	—	99±6.9	5.6±0.46	2.0±0.16	96±2.0	2.0±0.10	—	98±6.4	3.3±0.31	1.8±0.27	88±7.4	1.6±0.28
15	—	97±5.4	8.2±1.05	2.7±0.17	93±2.1	2.7±0.16	—	81±10.0	3.7±0.33	1.9±0.23	74±8.8	1.9±0.18
20	—	98±6.5	8.4±0.98	2.7±0.34	91±2.4	2.7±0.61	—	73±6.5	4.4±0.45	1.8±0.51	88±5.5	1.9±0.40
25	—	100±8.6	8.2±0.69	2.9±0.71	89±3.5	2.7±0.61	—	95±4.5	4.5±0.75	2.0±0.35	93±2.6	2.0±0.37
30	—	104±5.9	8.4±0.35	2.9±0.46	91±2.4	2.9±0.47	—	96±2.3	4.7±0.55	2.0±0.34	92±3.5	2.1±0.27

Для большей наглядности сравнения отдельно на графике приведены кривые изменений проникновения нативного и иммобилизованного трипсина через полупроницаемую мембрану с увеличением длительности воздействия.

В первую очередь необходимо отметить меньший процент проникновения для иммобилизованного трипсина сравнительно с нативным. Максимум проникновения для нативного трипсина (8,4%) в 1,8 раза превышает максимум проникновения для иммобилизованного (4,7%). Такую разницу можно объяснить разницей в величине молекулы — очевидно, увеличение и так достаточно крупной молекулы фермента за счет носителя затрудняет его проникновение через поры фильтра. Возможно, здесь играет роль и уменьшение заряда.

Второе, что обращает на себя внимание при рассмотрении графика, — тот факт, что максимальная скорость прохождения вещества наблюдается в начальных стадиях, что согласуется с исследованиями В. С. Улащика об общих закономерностях лекарственного электрофореза (¹⁰), дальше эта скорость уменьшается, а при увеличении длительности воздействия выше 15—20 мин дальнейший рост проникновения трипсина практически сводится к нулю. Основываясь на этом, можно, наверно, ограничить длительность электрофореза трипсина 15—20 мин вместо обычных 30 (сходные результаты наблюдали И. Д. Извекова и П. А. Леус (¹³), показавшие, что при электрофорезе нативного трипсина увеличение длительности воздействия с 15 мин до 20 существенной разницы в проникновении трипсина в ткань зуба не приносит)

Обращаясь к таблице, можно заметить, что иммобилизованный трипсин, как и нативный, обнаруживается у отрицательного полюса; это говорит о том, что присоединение молекулы носителя не приводит к изменению знака заряда трипсина, и иммобилизованный трипсин, как и нативный, имеет положительный заряд и должен вводиться с положительного полюса.

При рассмотрении данных, характеризующих среднюю камеру, видно, что если протеолитическая активность нативного трипсина под действием гальванического тока в среднем повышается (увеличение активности обнаруживается в 60—70% проб) — факт, обнаруженный впервые В. С. Улащиком и подтвержденный нами, то активность иммобилизованного трипсина такой тенденции не обнаруживает.

Наконец, диффузия как нативного, так и иммобилизованного трипсина также имеет максимальную скорость в начальные промежутки времени. При сравнении данных электрофореза и диффузии, как для нативного, так и для иммобилизованного трипсина, отмечается существенная разница для каждого параметра времени (P везде $< 0,001$).

Институт физиологии им. Л. А. Орбели
Академии наук Армянской ССР
Институт микробиологии
Академии наук Армянской ССР

Նատիվ և իմորիզիզացված տրիպսինի էնկտրաֆորետիկ շարժունակության
համեմատական զննասուումը

Ներկա աշխատանքում փորձնական պայմաններում ուսումնասիրվել է նատիվ և իմորիզիզացված տրիպսինի էնկտրաֆորետը: Հաստատվել է, որ իմորիզիզացված տրիպսինը, ինչպես և նատիվը զալվանական հոսանքի ազդեցության տակ թափանցում է կիսաթափանցիկ թաղանթով: Ինչպես իմորիզիզացված, նույնպես և նատիվ տրիպսինը ունեն զրական ընկո, սակայն իրեն ֆորետիկ շարժունակությամբ իմորիզիզացվածը զիճում է նատիվին:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ Э. Г. Африкан, Биологический журн. Армении, т. 31, № 1 (1978). ² И. В. Березин, В. К. Антонов, К. Мартинек, Имобилизованные ферменты, т. 2, «Наука», М., 1976. ³ В. А. Шатерникова, И. И. Князев, Вопросы медицинской химии, т. 12, вып. 1 (1966). ⁴ Н. С. Егоров, в кн.: II Всесоюзный симпозиум «Получение и применение иммобилизованных ферментов», Абовян, 1977. ⁵ Б. М. Куриненко, Л. И. Сабчук, И. И. Алексеева и др., в кн.: II Всесоюзный симпозиум «Получение и применение иммобилизованных ферментов», Абовян, 1977. ⁶ И. М. Терешин, Е. П. Чазов, И. Л. Рейзер и др., в кн.: II Всесоюзный симпозиум «Получение и применение иммобилизованных ферментов», Абовян, 1977. ⁷ И. М. Терешин, Б. В. Москвичев, в кн.: II Всесоюзный симпозиум «Получение и применение иммобилизованных ферментов», Абовян, 1977. ⁸ В. С. Улащик, в сб.: Актуальные вопросы невропатологии и нейрохирургии, вып. 4, Мн., 1971. ⁹ В. С. Улащик, Электрофорез лекарственных веществ. Автореф. канд. дис., М., 1974. ¹⁰ В. С. Улащик, Фармакологические основы электро- и фонофореза, Мн., 1975. ¹¹ В. С. Улащик, Теория и практика лекарственного электрофореза, Мн., 1976. ¹² В. С. Улащик, Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физкультуры, № 3, 1976. ¹³ Н. Д. Извекова, П. А. Леус, Стоматология, № 6, 1970. ¹⁴ G. Brown, Enzyme Ing., vol. 2, New-York-London, 1974.