

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ ПЕНТОЗАНПОЛИСУЛЬФАТА И ГЕПАРИНА С БЕЛКАМИ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ

НИИ Физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск

Гепарин используется в клинической практике более 50 лет и является одним из наиболее широко применяемых лекарственных средств. Антикоагулянтное действие гепарина реализуется главным образом через два механизма, обусловленных взаимодействием с ингибитором сериновых протеиназ (серпином) плазмы крови антитромбином III (АТIII). Первый механизм включает связывание АТIII со специфической последовательностью пентасахарида молекулы гепарина. При этом центральная реактивная петля серпина располагается в более экспонированной ориентации в результате закрытия А-слоя, удлинения спирали D и реориентации остатка P1 Arg, который становится доступным для атаки протеиназой FXa. Образующийся в результате гидролиза пептидной связи остаток P1' серпина ацилирует остаток Ser активного центра протеиназы FXa, после чего реактивная петля с ковалентно связанной протеиназой включается в центр β-слоя А серпина [1 – 5]. Согласно второму механизму, тромбин (F IIa) связывается с гепарином по участку, проксимальному к пентасахаридному связывающему участку для АТIII. Образование тройного комплекса между АТIII, тромбином и гепарином приводит к инактивации тромбина. В отличие от анти-FXa активности, для которой достаточно пентасахаридного связывающего участка, анти-FIIa активность гепарина обусловлена по меньшей мере 18 сахарными остатками для эффективного образования тройного комплекса [6]. Наряду с высокой эффективностью гепарина при различных клинических ситуациях, имеются также данные о его побочных эффектах, среди которых наиболее выражена гепарин-индуцированная тромбоцитопения [7, 8]. Гетерогенность выделяемых препаратов гепарина, модификация химической структуры в процессе выделения, наличие побочных эффектов стимулировали разработку многочисленных аналогов гепарина. Одним из таких препаратов, в частности, является полусинтетический гепариноид — пентозанполисульфат (ППС), представляющий собой высокосульфатированную поликислоту, статистически содержащую на каждой десятой единице одну глюкуроновую группу [9].

В настоящей работе использовано сочетание методов гель-проникающей жидкостной хроматографии высокого давления, аффинной хроматографии на колонке с гепарин-сефарозой и гель-электрофореза для сравнительного изучения сродства гепарина и ППС к нативной, латентной и полимерной формам АТIII, а также к ряду щелочных белков. Корректная и экспрессная оценка содержания различных форм АТIII важна также в связи с обнаружением антиангиогенных и противоопухолевых свойств модифицированных форм этого серпина [10]. Цель работы заключалась в уста-

новлении аффинных и неспецифических взаимодействий сульфатированных полисахаридов с различными конформерами АТIII и белками различной природы.

Материалы и методы

В работе были использованы: лиофилизированный препарат “Antithrombin III — Alpha”, содержащий по спецификации выпуска препарата в 1996 г. не менее 500 МЕ антитромбина III (“Alpha Therapeutic”, Германия); пентозанполисульфат, натриевая соль 100 мг/мл (“Vene-Arzneimittel”, Германия); гепарин (АО “Белмедпрепараты”, Беларусь); цитохром с из сердца лошади, лизоцим (“Serva”, Германия). Цитохром P450scs и химоотрипсиноген получали как описано ранее [11, 12]. АТIII из плазмы доноров выделяли путем последовательной очистки с использованием процедур высаживания полиэтиленгликолем 6000, аффинной хроматографии (гепарин-сефароза), анионообменной хроматографии (DEAE-целлюлоза) и гель-хроматографии (сефадекс G-150). Полученный белок был гомогенизирован по данным гель-электрофореза в денатурирующих условиях и свободным от примесей полимерных форм, протеолитически расщепленного белка и низкоаффинной к гепарину латентной формы.

Иммобилизацию гепарина на сефарозе 4В проводили по методу восстановительного аминирования концевой формильной группы гепарина аминопроизводными агарозы в присутствии цианоборгидрида натрия [13]. Полученный сорбент содержал 0,9 – 1,2 мг иммобилизованного лиганда на 1 мл осажденного геля.

Хроматографию низкого давления проводили с использованием автоматической системы “GradiFrac” по заданным программам градиентного элюирования (“Pharmacia Biotech”, Швеция). Для концентрирования белковых растворов применяли ультрафильтрационные центрифужные пробирки с разделяющей границей по молекулярной массе 30 кДа (“Centricon 30”, “Amicon”).

Гель-электрофорез в денатурирующих условиях проводили по методу [14], вариант нативного гель-электрофореза в модификации [15].

Спектрофотометрические измерения проводились на спектрофотометре Shimadzu UV-1202 (Япония) с использованием программы регистрации спектров поглощения. Для расчета концентрации антитромбина III использовалось значение коэффициента поглощения 1 % раствора $A_{280\text{ нм}}^{1\%} = 6,5$.

Высокоэффективную жидкостную хроматографию высокого давления (ВЭЖХ) проводили на жидкостном хроматографе LC-10AL (Shimadzu, Япония). Для регистрации использовали фотодиодный детектор

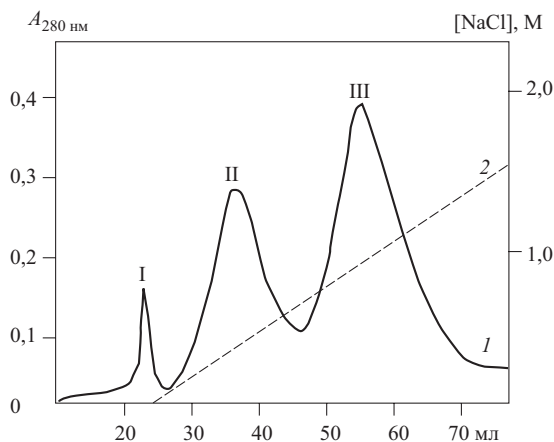


Рис. 1. Аффинная хроматография коммерческого препарата АТШ на колонке с гепарин-сефарозой: 1 – поглощение при 280 нм; 2 – линейный градиент NaCl; I – III – объединенные фракции

SPD-M10A. Применяли колонку для гель-проникающей хроматографии (300 × 7,5 мм, TSK 3000 SW, Beckman). В качестве хроматографической системы использовали 0,1 М калий-фосфатный буфер (рН 7,0), содержащий 0,3 М KCl. Скорость протока элюента — 1 мл/мин.

Определение функциональной активности АТШ проводили по остаточной активности тромбина в присутствии избытка гепарина и хромогенного субстрата S-2238 [16].

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 представлена типичная хроматограмма разделения коммерческого препарата АТШ (Antithrombin III-Alpha) на колонке с гепарин-сефарозой, характеризующаяся наличием трех выраженных белковых пиков. После концентрирования с помощью ультрафильтрационных центрифужных пробирок каждая из фракций, соответствующая пикам I – III, была подвергнута анализу методами гель-проникающей высокоэффективной жидкостной хроматографии и гель-электрофореза в неденатурирующих условиях (рис. 2).

Установлено, что фракция I представляла собой полимерные формы белка (Mг более 400 000) в смеси с удаляемыми стабилизаторами (цитратом натрия и маннитолом), фракция II являлась смесью полимерных форм (30 %) и низкоаффинного к гепарину латентного АТШ (70 %), а фракция III состояла преимущественно из высокоаффинного к гепарину нативного АТШ (98 %), а минорной примесью являлись полимерные формы. Таким образом, полимерная форма не образует комплексов с гепарином, хотя имеются ее промежуточные формы, которые элюируются в смеси с латентной формой. Латентная и нативная формы АТШ не отличались по молекулярной массе при проведении ВЭЖХ и гель-электрофореза в денатурирующих условиях (Mг 65000), а их разделение достигалось только аффинной хроматографией на колонке с гепарин-сефарозой. Наличие цитрата натрия, хотя и предотвращало в существенной степени образование полимеров (3 % от общего белка в препарате), но эта процедура в целом не препятствовала заметному обра-

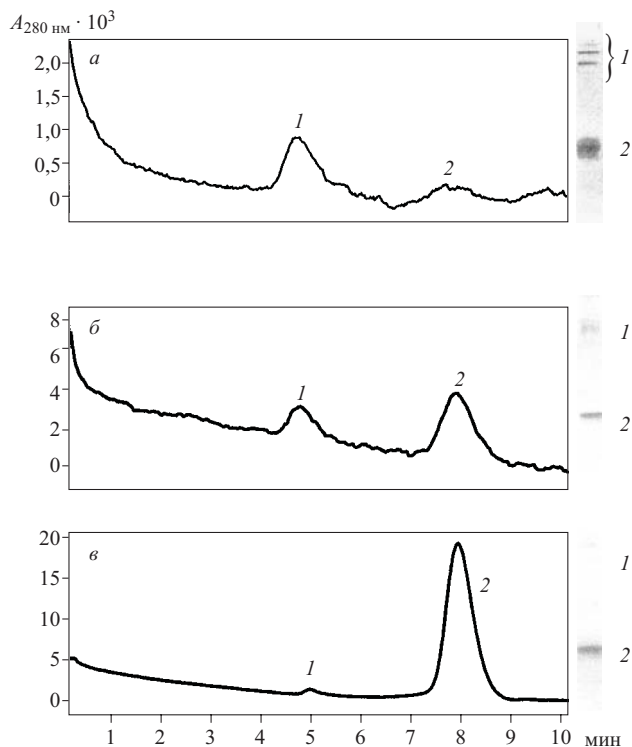


Рис. 2. Анализ фракций АТШ после аффинной хроматографии на гепарин-сефарозе методами гель-проникающей ВЭЖХ и гель-электрофореза: а – фракция I, б – фракция II, в – фракция III; 1 – полимерные формы АТШ, 2 – смесь латентной и нативной форм АТШ

зованию латентной формы АТ(27 %), которая обладала пониженным сродством к гепарину при аффинной хроматографии (рис. 1). Эти результаты вполне объяснимы, поскольку коммерческий препарат получен после стадии пастеризации (требования вирусной безопасности) при температуре 65° С в течение 24 ч в присутствии цитрата натрия и хранился в лиофилизированном состоянии с 1996 г. Латентный АТШ был обнаружен также в других коммерческих препаратах после длительного хранения и температурной обработки [15, 17]. Очевидно, по этим причинам при производстве АТШ из плазмы человека после стадии пастеризации при 65° С в присутствии цитрата натрия в последнее время используют дополнительную стадию аффинной хроматографии на гепарин-сефарозе [18]. Исходя из полученных результатов анализа коммерческого препарата, мы в дальнейшей работе использовали АТШ, выделенный из плазмы доноров, который хранили в растворе 20 % глицерина при – 18° С не более двух недель. В процедуре выделения и очистки были исключены стадии лиофильного высушивания и термической обработки, способствующие образованию полимерных и латентной форм. Этот препарат АТШ был использован для сравнительного изучения взаимодействия с гепарином и ППС.

На рис. 3 приведены профили элюирования при гель-проникающей ВЭЖХ для образцов АТШ, подвергнутых температурной обработке в течение 22 ч при 60° С. В образце, подвергнутому только температурному воздействию, содержание полимерных форм достигало 35 %, в то время как в присутствии гепарина и ППС в 10-кратных молярных избытках содержание

полимерных форм составляло 9 и 13 % соответственно. На электрофореграммах образцов АТШ также отмечены полосы различной интенсивности, соответствующие полимерным формам и смеси нативной и латентной форм. Следует отметить, что полимерные формы были представлены при ВЭЖХ контрольного образца димерами, тримерами, тетрамерами и агрегатами более высокой кратности (M_r от 130000 до более 400000) (рис. 3, а). Принципиально значимым являлось определение соотношения низкоаффинного к гепарину латентного и нативного АТШ. Это было достигнуто путем повторной аффинной хроматографии образцов АТШ в условиях их разведения, когда концентрация свободных лигандов (гепарина или ППС) была много меньше концентрации иммобилизованного гепарина. Данные о количественном содержании различных форм АТШ представлены в табл. 1. Содержание различных форм коррелировало с падением активности АТШ в отношении ингибирования протеолитической активности тромбина исходя из допущения, что латентная и димерная формы имели пониженную, а полимеры вообще не обладали ингибиторной активностью. Механизм полимеризации АТШ окончательно не выяснен, можно предположить, что он схож с механизмом димеризации [15]: центральная реактивная петля одной молекулы АТШ входит в другую молекулу, та в свою очередь отдает свою центральную реактивную петлю в последующую молекулу и т.д. с образованием неактивных агрегатов. Димерные формы АТШ давали примерно 10 % уменьшения ингибиторной активности и легко диссоциировали [15], тогда как об активности полимеров данные в литературе отсутствовали. Полученные нами результаты (рис. 3, табл. 1) свидетельствовали о том, что процесс образования полимерных форм вносил определяющий вклад в уменьшение ингибиторной активности. ППС менее эффективен чем гепарин в стабилизации АТШ, что связано со структурными и пространственными отличиями молекул полисахаридов. Вместе с тем оба полисахарида, очевидно, блокировали конформационные изменения молекул АТШ, приводящие к возможности их слияния в полимерные агрегаты.

С помощью аффинной хроматографии на колонке с гепарин-сефарозой определено относительное сродство сульфатированных полисахаридов к белкам различной природы с использованием элюирования сорбированных белков NaCl или аффинного элюирования растворимыми гепарином или ППС (табл. 2). Градиентное элюирование щелочных белков (цитохром *c*, химотрипсиноген и лизоцим) хлористым натрием осуществлялось в соответствии со значениями изоэлектрических точек этих белков и разрушение комплексов белков с иммобилизованным гепарином наблюдалось в диапазоне 0,28 – 0,40 М. Эти взаимодействия можно отнести к неселективным ионным взаимодействиям, так как выше было показано, что латентная форма или полимеры АТШ обладают пониженным сродством к гепарину или вовсе не взаимодействуют с иммобилизованным лигандом. Это подтверждается последовательным элюированием химотрипсиногена, цитохрома *c* и лизоцима при катионообменной ВЭЖХ на сильном катионообменнике NUCLEOSIL SCX

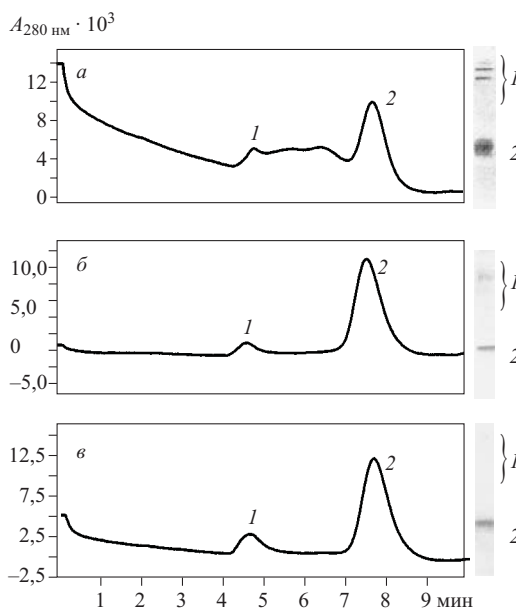


Рис. 3. Образование полимерных форм (1), латентной и остаточной нативной форм (2) АТШ, контролируемое ВЭЖХ и гель-электрофорезом при инкубации (60 °С, 22 ч) без добавок (а) в присутствии гепарина (б) или пентозанполисульфата (в)

(“Macherey-Nagel”), представляющем собой носитель с привитыми остатками сульфоновой кислоты [13]. Для этих же белков установлено, что эффективные концентрации гепарина, и ППС, необходимые для десорбирования с носителя, составляли 0,05 – 0,065 мМ и 0,2 – 0,3 мМ соответственно (с принятием кажущихся молекулярных масс для гепарина 17 кДа и для ППС 6 кДа), т.е. гепарин в 4 – 5 раз более эффективен. Были исследованы функциональные изменения белков в условиях установленного их комплексобразования с сульфатированными полисахаридами. Установлено, что как гепарин, так и ППС снижают на 20 – 30 % протеолитическую активность α -химотрипсина при 100 – 1000-кратных молярных избытках полисахаридов. Отсутствие стехиометрических закономерностей ингибирования свидетельствовало о том, что комплексобразование протеазы и полисахаридов не затрагивало принципиально структуру активного центра фермента, а снижение функциональной активности, скорее всего, связано со стерическими ограничениями при взаимодействии белкового субстрата казеина с активным центром α -химотрипсина, находящегося в комплексе с полисахаридами. Ранее было показано, что гепарин ингибирует электронный транспорт от восстановленного цитохрома *c* к цитохром *c* оксидазе и дестабилизирует молекулу гемопротеида, снижая

Таблица 1
Содержание различных полимерных форм АТШ в процессе температурной обработки в присутствии добавок сульфатированных полисахаридов

Образец	Полимерные формы, %	Нативная форма, %	Латентная форма, %	Активность, %
АТШ при 60 °С в течение 22 ч	35	25	40	30
То же + ППС	13	70	17	65
То же + гепарин	9	80	11	80

Таблица 2
Значения концентраций NaCl и сульфатированных полисахаридов, при которых осуществляется десорбция белков с колонки (0,5 × 5 см), наполненной гепарин-сефарозой

Белок	[NaCl], мМ	[Гепарин], мМ	[Пентозанполисульфат], мМ
Химотрипсиноген	280	0,064	0,25
Цитохром С	350	0,05	0,3
Лизоцим	400	0,06	0,2
Цитохром Р-450 _{scc}	820	0,065	0,27
АТШ	950	0,05	0,3

температуру разворачивания этого белка [19, 20]. $K_{\text{дис}}$ комплекса ППС с цитохромом *c* составляла 10^{-5} М [21]. Кислый белок АТШ (pI 4,9) и мембранный гидрофобный белок цитохром Р-450_{scc}, катализирующий в митохондриях коры надпочечников превращение холестерина в прегненолон (pI в районе 6,6 – 6,8 в присутствии твина 80 для дезагрегации полимерных форм гемопротейда [11]), характеризовались более прочными комплексами с гепарин-сефарозой: десорбция с носителя наблюдалась при 0,8 – 0,9 М NaCl (табл. 2). Если для АТШ хорошо документировано, что в образовании комплекса гепарина и белка принимают участие многочисленные контакты “канонического” пентасахарида и ряда аминокислотных остатков белка (общее число связей, стабилизирующих комплекс, достигает 17 [2]), то взаимодействие гепарина и цитохрома Р450_{scc} можно интерпретировать по аналогии со взаимодействием с молекулярным партнером – кислым (pI 4,9), небольшим по размеру (Mr 12 500) аденодоксином [22]. В случае Р-450_{scc} нами обнаружены при спектрофотометрическом титровании белка гепарином спектральные изменения типа I, в общем виде свидетельствующие о смещении спинового равновесия окисленного железа гема из низкоспинового состояния в высокоспиновое. Представление данных в координатах: обратная концентрация свободного гепарина к обратным спектральным изменениям разностных спектров поглощения типа I (Δ 389 нм минус 422 нм) позволила определить значение кажущейся $K_{\text{дис}}$ комплекса в пределах 20 – 30 мкМ. Эти величины более чем на 2 порядка уступают значениям констант взаимодействия Р-450_{scc} с аденодоксином [22], или селективности взаимодействия АТШ с гепарином [23], т.е. этот комплекс, как и комплекс ППС с цитохромом *c* [21] можно отнести к низкоаффинным.

Таким образом показано, что как нефракционированный гепарин, так и химически более однородный ППС способны к комплексообразованию с белками различной природы. Ряд образующихся комплексов (с цитохромом *c*, химотрипсиногеном, лизоцимом, латентной формой АТШ) имеют низкоаффинный характер и могут практически ликвидироваться уже при ионной силе крови — 0,15 М. Избирательность действия сульфатированных полисахаридов, как лекарственных средств, очевидно, определяется выбором химически наиболее комплементарных молекул-“мишеней”. Такого рода поиск из множества разнообразных молекул, способных к взаимодействию с сульфатиро-

ванными полисахаридами, может осуществляться в результате перебора большого числа вариантов молекул-партнеров с образованием комплексов с максимальной аффинностью. Комплексообразование АТШ с гепарином по сравнению с таковым для ППС более эффективно предотвращало образование полимерных агрегатов и латентной формы серпина под действием температурной обработки. Сродство к иммобилизованному гепарину для исследованных белков по критерию градиентного элюирования NaCl составляло следующий ряд: АТШ (максимальное сродство) > цитохром Р-450_{scc} > лизоцим > цитохром *c* > химотрипсиноген. Эффективная концентрация гепарина, необходимая для разрушения комплексов исследованных белков с иммобилизованным гепарином при их градиентном элюировании растворимыми сульфатированными полисахаридами, в 4 – 5 раз ниже, чем аналогичный показатель для ППС. Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что гепарин образует более аффинные комплексы с АТШ, чем его полусинтетический аналог — пентозанполисульфат.

ЛИТЕРАТУРА

1. Z. Shriver, M. Sundaram, G. Venkataraman, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**(19), 10365 – 10370 (2000).
2. L. Jin, J. P. Abrahams, R. Skinner, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 14683 – 14688 (1997).
3. J. A. Huntington, A. McCoy, K. J. Belzar, et al., *J. Biol. Chem.*, **275**(20), 15377 – 15383 (2000).
4. R. Egelund, K. W. Rodenburg, P. A. Andreasen, et al., *Biochemistry*, **37**, 6375 – 6379 (1998).
5. E. Stratikos and P. G. W. Gettins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 4808 – 4813 (1999).
6. M. Petitou, J. P. Herault, A. Bernat, et al., *Nature (London)*, **398**, 417 – 422 (1999).
7. E. Young, P. Wells, S. Holloway, et al., *Thromb. Hemostasis*, **71**, 300 – 304 (1994).
8. M. C. Kappers-Klunne, D. M. S. Boon, W. C. J. Hop, et al., *Br. J. Haematol.*, **96**, 442 – 446 (1997).
9. M. F. Scully, M. Weerasinghe, V. Ellis, et al., *Thromb. Res.*, **31**, 87 – 97 (1984).
10. M. S. O'Reilly, S. Pirie-Shepherd, W. S. Lane, and J. Folkman, *Science*, **285**, 1926 – 1928 (1999).
11. V. L. Chashchin, V. I. Vasilevsky, V. M. Shkumatov, and A. A. Akhrem, *Biochem. Biophys. Acta*, **787**(1), 27 – 38 (1984).
12. С. Л. Овсянко, Е. А. Чернявский, Т. Л. Юрштович и др., *Хим.-фарм. журн.*, **35**(10), 47 – 50 (2001).
13. Ю. А. Лесникович, В. М. Шкуматов, *Вестник БГУ*, сер. 2, № 3, 31 – 38 (2000).
14. U. K. Laemmli, *Nature*, **227**, 680 – 685 (1970).
15. A. Zhou, J. A. Huntington, and R. W. Carrell, *Blood*, **94**(10), 3388 – 3396 (1999).
16. Antithrombin, Product Monograph 1995. Version 1.1/Chromogenix AB. Internet: www.chromogenix.se.
17. W. S. Chang, and P. L. Harper, *Thromb. Haemost.*, **77**, 323 – 326 (1997).
18. H. Bieskas, M. Gensana, J. Fernandez, et al., *Haematologica*, **83**, 305 – 311 (1998).
19. M. Antalik, M. Bona, Z. Gazova, and A. Kuchar, *Biochim. Biophys. Acta*, **1100**(2), 155 – 159 (1992).
20. J. Bagelova, M. Antalik, and M. Bona, *Biochem. J.*, **297**, 99 – 101 (1994).
21. В. М. Шкуматов, Ю. А. Лесникович, А. Л. Рудой, *Вестн. НАН Беларуси, Сер. хим. наук*, № 2, 86 – 91 (2000).
22. V. M. Shkumatov, G. Smettan, O. Ristau, et al., *Chem.-Biol. Interact.*, **68**, 71 – 83 (1988).
23. J. Dawes, *Anal. Biochem.*, **174**, 177 – 186 (1988).

Поступила 21.10.02