

© М.А. Ковинька, К.С. Десятниченко, О.Л. Гребнева, 1997

Протеолитическая активность во фракциях неколлагеновых белков, получаемых при диссоциативном экстрагировании костной ткани

М.А. Ковинька, К.С. Десятниченко, О.Л. Гребнева

Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. академика Г. А. Илизарова, г. Курган
(Генеральный директор — академик РАМТН, д.м.н., профессор, заслуженный деятель наук РФ В.И. Шевцов)

Исследована протеолитическая активность в растворах, получаемых на промежуточных этапах очистки и выделения костных неколлагеновых белков. Обнаружено три группы протеаз, проявляющих активность в указанных растворах, обладающих оптимумами действия при pH 3,6 и 8,0, молекулярной массой 20, 30, 60 кД, высаливаемыми при 30 и 50% насыщении сульфатом аммония. Показана возможность ингибирования данных протеаз различными ингибиторами.

Ключевые слова: протеолитическая активность, костные неколлагеновые белки, этапы выделения.

Proteolytic activity is studied in the solutions, obtained at the intermediate stages of purification and extraction of bone non-collagenous proteins. Three groups of proteases are found, which are active in the mentioned solutions, produce an optimal effect at pH 3,6 and 8,0, have molecular mass of 20, 30, 60 kD, salt out at 30- and 50%-saturation with ammonium sulfate. The possibility for inhibition of these proteases with different inhibitors is shown.

Keywords: proteolytic activity, bone non-collagenous proteins, stages of extraction.

Есть сведения о том, что зрелая костная ткань содержит протеолитические ферменты, принадлежащие нескольким классам протеаз, которые принимают участие в регуляции метаболизма компонентов костной ткани, а также лимитируют возможность выделения полипептидных рострегулирующих факторов из этой

ткани [5,6]. Поэтому изучение условий для проявления активности и чувствительности костных протеаз к различным ингибиторам является актуальным в связи с возможностью получения фармпрепаратов из костной ткани, а также при разработке способов коррекции осложнений, вызывающих остеопороз.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Определение активности костных протеаз проводили на основных ранее нами описанных этапах выделения костных рострегулирующих факторов: деминерализации, диссоциативного экстрагирования раствором 8 М мочевины, фракционирования неколлагеновых белков посредством диализа, высаливания при различных концентрациях сульфата аммония, гель-проникающей хроматографии (ГПХ) на колонке с носителем Toyopearl HW-55 [2]. Измерение активности протеолитических ферментов после

диализа растворов костных белков проводили при следующих значениях pH: 3,6, 5,0, 7,2 и 8,0. Каждое определение выполняли в параллелях по три пробы. С этой целью использована методика Ансона - Мирского [3] в нашей модификации [4]. Было исследовано влияние на активность костных протеаз трех ингибиторов: йодацетамида, гордокса и соевого ингибитора трипсина, вносимых в эквимольных концентрациях к содержанию общего белка, измеряемого микро-биуретовым методом [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований не было обнаружено высокой протеолитической активности в растворе белков, полученном после деминерализации костной ткани - первого этапа выделения неколлагеновых белков [2], в диапазоне pH от 3,6 до 8,0. Диссоциативное экстрагирование, напротив, способствовало солиubilизации протеаз. После однократной экстракции белков раствором 8 М мочевины

суммарная активность протеаз резко возрастает в кислой (pH 3,6) и щелочной (pH 8,0) области. Подобная картина наблюдается и в растворе, полученном после второй экстракции. Таким образом, на этапе диссоциативного экстрагирования в белковом экстракте нами обнаружено две группы протеолитических ферментов, экстрагирующихся вместе с другими неколлагеновыми белками из костной ткани.

В супернатанте после высаливания диссоциативного экстракта, при 30%-ом насыщении сульфатом аммония (I СА) активность костных протеаз сохраняется только в щелочной области, а с последующим осаждением фракций при 50%-ом насыщении сульфатом аммония (II СА) исчезает из раствора и она. Щелочная протеолитическая активность оказалась большей частью локализованной в осадке II СА. Раствор белков, осаждающихся при 30% насыщении, проявлял высокую протеолитическую активность в кислой области.

Отмечено существенное изменение спектра активности протеолиза после разделения осадков по относительной молекулярной массе (Мг). Для рабочей индексации полученных фракций после обозначения диапазона высаливаемости - I и II СА - использовали аппроксимированные значения Мг в кД. Высокая активность кислых протеаз (рН 3,6) в осадке I СА сохранилась во всех фракциях, полученных после ГПХ. Возможно, кислые протеазы обладают способностью сорбироваться на субстратах с различной Мг, и благодаря этому разделение их с помощью гелепроникающей хроматографии затруднительно.

Исследования белков осадка II СА показали, что максимальная протеолитическая активность наблюдалась при рН 3,6 во фракциях II,30-40, II,60, и II,70, тогда как до разделения на колонке активность протеаз в этом диапазоне была на порядок ниже. Значительно возростала активность при рН 8,0 во фракции II,20, превышая значения, зафиксированные до разделения на колонке.

Суммарная активность протеаз после ГПХ повышалось в сравнении с величинами, зарегистрированными в осадках как I СА, так и II СА.

Возможно, это связано с тем, что в процессе ГПХ произошло отделение протеаз от ингибиторов.

Было исследовано отношение костных протеаз к трем ингибиторам: йодацетамиду, гордоксу и соевому ингибитору трипсина. Выяснилось, что йодацетамид ингибировал кислые протеазы из I СА и II СА в среднем на 60%, протеазы с оптимумом действия при рН 8,0 из II, 20 на 56%. Соевый ингибитор трипсина ингибировал щелочные протеазы на 50%, тогда как на кислые протеазы влиял незначительно. Гордокс ингибирует протеазы из фракции II, 20 на 92%, кислые протеазы из I СА ингибируются в среднем на 68%, из II СА - на 82%.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами была выявлено, по меньшей мере, три фракции неколлагеновых белков, которые обладают протеолитической активностью с разным оптимумом действия рН, отличаются по молекулярной массе, высаливаемости, отношению к различным ингибиторам. Наибольший интерес вызывает фракция из II СА с молекулярной массой 20 кД, по ряду признаков включающая в себя ряд биологически активных веществ. Найденные различия в свойствах костных протеаз будут иметь значение для разработки способов подавления костной резорбции (например, при лечении остеопороза), на разных этапах которой проявляют активность различные энзимы этого класса [5]. Кроме того, необходимо учитывать наличие активных костных протеаз в растворах неколлагеновых белков, при их экстрагировании из кости. В процессе диализа после диссоциативного экстрагирования и хроматографического разделения белков, следует применять ингибиторы протеаз и проводить работы на холоде.

Таблица

Активность протеаз и их чувствительность к ингибиторам во фракциях костных неколлагеновых белков, ммоль ароматических аминокислот/г белка.

Фракция	рН	Исходные величины активности	При действии ингибиторов					
			ммоль ароматических аминокислот/г белка			Процент от активности без ингибитора		
			I*	II*	III*	I*	II*	III*
I,10-30	3,6	0,679	0,479	0,222	0,337	29,46	67,31	50,96
I,40	3,6	1,581	1,091	0,556	0,922	30,99	64,83	41,68
I,50	3,6	2,989	1,543	0,406	0,437	48,38	86,42	85,38
I,60	3,6	2,196	1,021	0,644	1,098	53,92	70,67	50,02
II,10	8,0	0,881	0,634	0,239	0,437	28,04	72,87	50,69
II,20	8,0	5,693	2,752	0,489	2,483	51,66	91,41	56,39
II,30	3,6	3,453	2,502	2,043	1,415	27,54	40,83	59,02
II,40	3,6	6,125	4,092	-	2,147	33,19	-	64,95
II,50	3,6	0,901	0,714	0,228	0,328	20,76	74,70	63,59
II,60	3,6	3,262	1,534	0,477	0,747	57,97	85,38	77,10
II,70	3,6	6,887	6,472	0,537	4,433	6,03	92,20	35,47

* I - йодацетамид; II - гордокс; III - соевый ингибитор трипсина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бейли Дж. Методы химии белков. - М.: Мир. - 1965. - 266 с.
2. Выделение и биотестирование костных рострегулирующих факторов: Метод. рекомендации; / Сост.: К.С.Десятниченко, Ю.П. Балдин, А.Н. Дьячков и др. - Курган, 1990. - 24 с.
3. Лабораторные методы исследования в клинике / под ред. В.В. Меньшикова. - М.: Медицина, 1987. - С. 89.
4. Сравнение методов исследования протеазной активности в биологических жидкостях / М.А. Ковинька, К.С. Десятниченко, А.П. Кузнецов, Е.Ю. Шаламова // Материалы XXVIII юбил. обл. науч.-практич. конф., посвящ. 50-летию Курганской . обл. клин. больницы. - Курган, 1996. - С.133-135.
5. Щепеткин И.А. Остеокластическая резорбция кости // Успехи соврем. биологии. - 1996. - Т.116, N 4. - С. 474-492.
6. Urist M.R., Strates B.S. Bone morphogenetic protein // J.Dental Res. - 1971. - Vol. 50, N 6. - P.1. - P.1392-1406.

Рукопись поступила 05.12.97.

КАФЕДРА УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ВРАЧЕЙ

Кафедра усовершенствования врачей по чрескостному остеосинтезу в травматологии и ортопедии на базе Российского научного центра "Восстановительная травматология и ортопедия" им. академика Г.А. Илизарова проводит учебные циклы продолжительностью 2 недели:

- 1. Чрескостный остеосинтез в травматологии и ортопедии.**
- 2. Лечение больных с переломами костей конечностей.**
- 3. Лечение больных с ложными суставами и дефектами длинных трубчатых костей.**
- 4. Удлинение и устранение деформаций верхних и нижних конечностей.**
- 5. Метод Илизарова при ортопедической патологии у детей и взрослых.**
- 6. Чрескостный остеосинтез в лечении больных с патологией тазобедренного сустава.**

По согласованию с местными отделами здравоохранения и после подачи заявки в наш Центр могут быть проведены также и выездные циклы.

Информацию об условиях проведения циклов усовершенствования Вы можете получить по адресу:



640005 г. Курган, ул. М. Ульяновой , 6
РНЦ "ВТО" им. академика Г.А. Илизарова
Кафедра усовершенствования врачей
Зав. кафедрой – д.м.н., профессор
Швед Сергей Иванович



Телефоны:
(35222) 7-39-76
(35222) 3-17-54