

УДК: 514.183

**УДОСКОНАЛЕННЯ ТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА ЦИТОХРОМУ-С
З МЕТОЮ ПОКРАЩЕННЯ ЙОГО ОЧИСТКИ**

Дермельова М.В., Стрілець О.П., Стрельников Л.С.

Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна

Вступ. З даних літератури відомо, що цитохром-С може бути виділений з різноманітних видів природної сировини: дріжджів, рису, м'язів серця ссавців (коней, великої рогатої худоби, свиней, собак, кроликів, людини), птахів (голубів, пінгвінів), сердець лососевих або дріжджів. Відомі способи отримання цитохрому С, що включають виділення з м'язів серця ссавців, переважно великої рогатої худоби, шляхом екстракції і сорбційної очистки екстракту з використанням алюмосилікат магнію або карбоксильних катіонітів типу амберліт ХЕ-64 і КМДМ, а також з сердець морських ссавців і дріжджів *Pichia membranaefaciens* [1, 5]. Цитохроми-С у різних організмів відрізняються один від одного білковою частиною, числом гемів в молекулі, лігандами в п'ятому і шостому координаційних положеннях заліза в гемі, молекулярною масою, а також, за кількістю амінокислотних залишків. Білковий ланцюг цитохрому-С ссавців і людини складається з 104 амінокислотних залишків. Встановлено, що структура молекули цитохрому-С, виділеного з серцевого м'яза людини і деяких тварин (бики, коні, свині, і т.д.), практично ідентичні. Таким чином, використання сировини великої рогатої худоби найбільш прийнятне. Вибір сировини для виробництва ліофілізату цитохрому-С ґрунтується на кінцевому виході продукту. Слід зазначити, що відсотковий вихід цитохрому-С з сердець великої рогатої худоби вище, ніж з сердець морських ссавців, наприклад, ластоногих [1]. На підставі цього можна стверджувати, що дана сировина для отримання ліофілізату цитохрому-С є оптимальною.

Згідно вимог нормативних документів [2] для лікарських засобів біологічного походження необхідно надати докази заходів щодо запобігання передачі губчастої енцефалопатії – захворювання пріонних інфекцій.

Для мінімізації ризику передачі трансмісивних губчастих енцефалопатій тварин через лікарські засоби нами враховані 3 взаємодоповнюючі параметри:

- вихідні тварини та їх географічне походження;
- природа тваринного матеріалу, яка використовується у виробництві, і будь-які відповідні процедури для запобігання перехресного забруднення матеріалами з більш високим ризиком;
- виробничий процес, включаючи відповідні системи забезпечення якості, які гарантують постійність та простежуваність продукту. Також для запобігання передачі будь-яких захворювань приймають запобіжні заходи щодо відбору відповідного вихідного матеріалу і дезактивації потенційно патогенних агентів.

Мета дослідження. Метою даного дослідження було підібрати та науково обґрунтувати оптимальний тип сорбенту для сорбційної очистки екстракту з використанням карбоксильних катіонітів для проведення іонообмінної хроматографії.

Методи дослідження. Метод іонообмінної хроматографії, заснований на відмінностях в співвідношенні і розподілі заряджених груп на поверхні білка, належить до числа найбільш використовуваних. Іонообмінна хроматографія являє собою метод, що дозволяє розділяти іони і полярні молекули на основі їх заряду. Вона може бути використана для поділу практично будь-яких заряджених молекул. Взаємодія білка і сорбенту заснована на оборотній кулоновській взаємодії. Сорбент має на поверхні іонні функціональні групи, які взаємодіють з іонами аналіту протилежного заряду. Застосування колонної хроматографії дозволяє отримати найбільший ступінь очищення білка. При виборі виду іонообмінної хроматографії керуються ізоелектричною точкою білка. При значенні рН вище ізоелектричної точки білок набуває негативний заряд, якщо нижче, то позитивний [3]. З даних літератури відомо, що цитохром-С володіє ізоелектричною точкою при рН 9,7-10,5 [4], в його складі переважають катіоногенні групи. Тому, для очищення екстракту цитохрому-С від домішкових компонентів і двовалентного катіона барію доцільно використовувати негативно заряджені іонообмінні смоли (катіоніти).

Як катіоніт найчастіше використовують карбоксильний катіоніт в Na + - формі. Карбоксильні катіоніти не диссоціюють в кислій області рН, а диссоціюють в лужній. Оскільки рН екстракту цитохрому-С після стадії «Осадження баластних білків» знаходиться в області від 8,0 до 9,0, нами обрано саме цей катіоніт.

Основні результати. З метою вибору оптимальних умов очищення цитохрому-С в динамічних умовах були вивчені сорбенти: карбоксильні смоли Амберлайт FPC3500, макропористий сульфокатіоніт на основі стиролу і дивинилбензолу (КУ-23), зшитий полістирол Lewatit TP 207. При виборі оптимального сорбенту для очищення цитохрому-С враховувався також розмір зерен сорбенту. Контроль адсорбції цитохрому-С на катіоніті здійснювали візуально за освітленою зоною адсорбції цегляно-червоного кольору у верхньому шарі катіоніту. Вплив різних сорбентів на показники якості розчину після адсорбції цитохрому-С наведено у таблиці.

Таблиця

Вплив сорбентів на показники якості розчину цитохрому-С

Показник	Сорбент		
	Амберлайт FPC3500	КУ-23	Lewatit TP 207
	Розмір гранул, мм		
	0,45-0,50	0,4-1,0	0,4-1,25
рН (от 8,0 до 9,0)	8,6	8,6	8,6
Зовнішній вигляд	цегляно-червоний колір	цегляно-червоний колір	цегляно-червоний колір
Кількісне визначення цитохрому-С, %	2,3	1,7	1,3
Чистота $A_{550}^{\text{вост}}/A_{280}^{\text{окисл}}$	0,9	0,87	0,85

Висновки. Вивчення впливу різних сорбентів на очистку цитохрому-С показало, що сорбент зшитий полістирол Lewatit TP 207 для очищення екстракту цитохрому-С не підходить, оскільки розбіг в розмірі гранул становить від 0,4 до 1,25 мм, що позначилося на нечіткому розподілі загострень кордонів зон при абсорбції. Оптимальною смолою є карбоксильна смола Амберлайт FPC3500. Дана смола дозволяє чітко візуально проконтролювати зону адсорбції в верхньому шарі катіоніту, що має цегельно-червоний колір. Було встановлено, що для очищення цитохрому-С необхідно використовувати іонообмінну смолу з розміром гранул 0,45-0,5 мм. Та частина смоли, яка в результаті сорбції цитохрому-С забарвилася в червоний колір, знімається потім з колонки.

Встановлена залежність адсорбції цитохрому-С від рН розчину. Так спостерігався чітко виражений максимум адсорбції при рН 8,6, що приблизно на одну одиницю рН нижче, ніж ізоелектрична точка цитохрому С рІ 9,7. Ці дані добре узгоджуються з відомим фактом, що максимум адсорбції білків знаходиться зазвичай поблизу їх ізоелектричних точок [6]. Це обумовлено проявом вкладу в адсорбцію гідрофобних взаємодій. Невеликий зсув положення цього максимуму в область значень рН, трохи нижчих, ніж значення рІ свідчить про прояв при цьому електростатичних взаємодій позитивно заряджених глобул білка з негативно заряджених при рН 8,6 поверхнею сорбенту. Адсорбція падає при зменшенні рН розчину. Для адсорбції цитохрому-С на катіоніті обрана область рН 8-9. При даних значеннях рН білок цитохрому-С адсорбується на катіоніте, в той час як негативно заряджені білки будуть змиті потоком елюанта. Слід зазначити, що дані умови дозволяють розділити цитохром-С і міоглобін, який при зазначених умов не сорбується на колонці.

Для досягнення максимального очищення цитохрому-С на колонці експериментально підібрані оптимальні умови проведення динамічного процесу: швидкість пропускання розчину через колонку (200мл / хв), висоту насипного шару сорбенту і діаметр колонки (24 см).

Після проходження через колонки всього екстракту необхідно промивання колонок. З даних літератури відомо, що найбільш часто використовуваним розчином для промивання колонок є натрій-фосфатний буферний розчин. Після промивання колонок проводиться десорбція цитохрому-С [4].

Десорбція білків, пов'язаних катіонітом, досягається підвищенням іонної сили вимиваючого розчину, причому взаємодіючі між собою заряджені групи білка і іоніту виявляються в оточенні протилежно заряджених іонів солей. В результаті електростатичні взаємодії між ним і іонітом знімаються і білок елюється з колонки. Для підвищення іонної сили розчину найбільш часто використовується 1 М розчин натрію хлориду. Для підтримання сталості рН системи використовується 0,02 М натрій-фосфатний буферний розчин. Дана концентрація буферного розчину є достатньою для підтримки буферної ємності і постійного рН під час завантаження розчину цитохрому-С. Експериментально було встановлено, що для кращої десорбції цитохрому-С необхідна витримка від 12 до 18 годин при температурі від 2 °С до 8 °С.

Список літератури

1. Аюшин Н.Б. Цитохром С из сердец морских млекопитающих: методы получения и перспективы использования / Н.Б. Аюшин, Н.Н. Ковалев // Вопросы рыболовства. – 2006. – Т. 7. - №2(26). – С. 326-331.
2. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». — 1-е вид. — Доповнення 3. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2009. - 280 с.
3. Ибрагимов А.Н. Хроматографические методы очистки белков / А.Н. Ибрагимов, А.Г. Бикмуллин, Д.А. Сатаева и др. – Казань: ФГАОУ ВПО КФУ, 2013. – 48 с.
4. Хохлова Т.Д. Адсорбция цитохрома С на гидроксिलированных и триметилсилированных силикагелях / Т.Д. Хохлова // Вестн. моск. ун-та. сер.2. Химия. – 2002. – Т. 43. - № 3. – С. 147-149.
5. Шатаева Л.К. Карбоксильные катиониты в биологии /Л.К. Шатаева, Н.Н. Кузнецова, Г.Э. Елькин. - Л.: Наука, 1979. – 285 с.
6. Protein adsorption at solid-liquid interfaces: Reversibility and conformation aspects / W. Norde, F. Mac Ritchie, G. Nowicka, J. Lyklema // J. Colloid Interface Sci. 1986. - V. 112. - № 2. P. 447–456.