

УДК 616.151.5;616-003.725:616.155-092-085

## СИНТЕЗ КРЕМНЕЗЕМНИХ СОРБЕНТІВ ІЗ ЛІГАНДАМИ – АКТИВНИМИ БАРВНИКАМИ ТРІАЗИНОВОГО РЯДУ

Т. Даниш, М. Вороняк, Н. Дульцева, Н. Шурко

*Державна установа „Інститут патології крові та трансфузійної  
медицини Академії медичних наук України”  
вул. Генерала Чупринки, 45, Львів 79044, Україна  
e-mail: dtaras@litech.lviv.ua*

Синтезовані сорбенти на основі використання макропористих кремнеземних матриць і активних тріазинових барвників як лігандів. Вивчені їхні основні фізико-хімічні властивості. На прикладі модельної взаємодії барвників із тромбіном і альбуміном відібрані кращі сорбенти, які можуть бути придатні для виділення і очищення серинових протеїназ трипсинового типу з плазми крові. Вищою специфічністю до тромбіну серед досліджуваних барвників володіють Активний яскраво-голубий КХ, Procion blue HB та Procion Gelb M-4R.

*Ключові слова:* біоспецифічні сорбенти, кремнеземні матриці, активні тріазинові барвники.

На сьогоднішній день існує велика кількість методів фракціонування плазми крові, методів виділення й очищення її компонентів, зокрема, факторів зсідання крові та фібринолізу. Особливо привабливими з погляду ефективності є методи з використанням біоспецифічної хроматографії. Найбільш вживаними матрицями, що використовуються для сучасних хроматографічних сорбентів, є носії на основі декстрану, агарози, целюлози, поліакриламід, полістиролу, поліаміду або комбіновані гелі [7].

Нами протягом тривалого часу на практиці застосовуються макропористі сорбенти на основі кремнеземної матриці для виділення й очищення білкових факторів плазми крові [1–6, 8, 12, 14]. Основною перевагою кремнеземних сорбентів над органічними є висока стабільність, легкість регенерації, стійкість до дії мікроорганізмів, хімічних речовин і стерилізації.

Особливу групу лігандів для афінної хроматографії утворюють тріазинові барвники. Це найдешевші з усіх відомих лігандів, оскільки використовуються вони головним чином як текстильні барвники, і промислове виробництво їх вимірюється тоннами. Трихлорціанурова кислота є основою для синтезу цих барвників. Заміщення активних груп хромофорами приводить до утворення дихлор- чи монохлортріазинових барвників (рис. 1). Світовими лідерами з випуску цих барвників є компанії Ciba Ltd. (торгова назва барвників – Cibacron) та ICI (Imperial Chemical Industries, торгова назва барвників – Procion). Procion серії MX є дихлортріазиновим барвником. Cibacron та Procion H – монохлортріазинові барвники. Основною відмінністю між Cibacron та Procion H є положення сульфогрупи в аніліновому кільці (*орто*- в Cibacron та *мета*- чи *пара*- в Procion H серії). Інші представники даного класу барвників: Drimarene (Sandoz), Lavafix (Bayer).

Молекули барвника, що містять атоми хлору, взаємодіють з нуклеофільними (гідроксильними, аміногрупами) матриці й утворюють таким чином ліганди на поверхні носія. Коли атоми хлору тріазинового кільця поністю заміщені іншими групами, реактивність барвника втрачається.

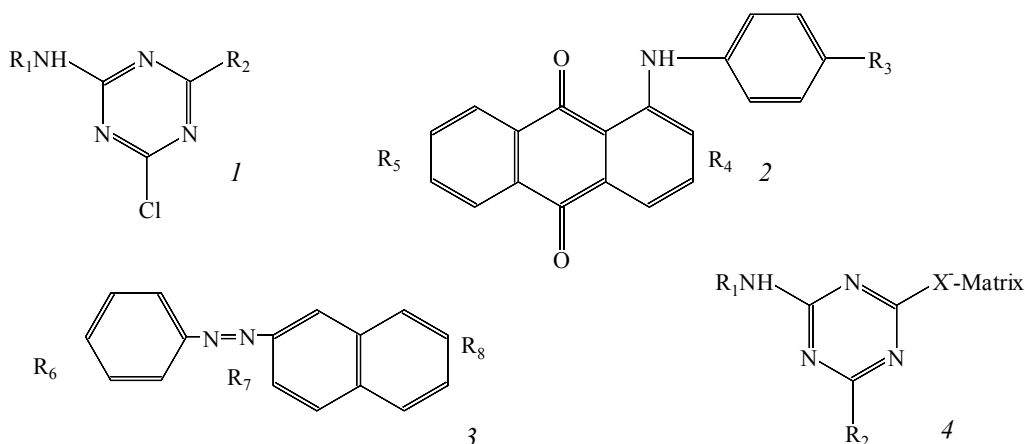


Рис. 1. Структурні формули активних тріазинових барвників: 1 – хлортріазинова група, де  $R^1$  – сульфопохідна антрахінону, заміщений антрахінон, ароматична азогрупа, фталоціанінова група;  $R^2$  – органічна група, хлорпохідна; 2 – антрахінонові похідні Цібакронів та Проціонів, де  $R^3$ ,  $R^4$  та  $R^5$  – сульфогрупи чи атом водню; 3 – ароматичні азопохідні Цібакронів та Проціонів, де  $R^6$ ,  $R^7$  та  $R^8$  – сульфогрупи чи атом водню; 4 – місце зв'язування тріазинових барвників із матрицею.

Типовим представником тріазинових барвників, який найчастіше використовується як ліганд, є Цібакрон голубий (Cibacron Blue F3G-A, Procion Blue H-B). Раніше було описано [11], що цей барвник володіє групою специфічності з нуклеотидзв'язуючим сайтом (близько 120 амінокислот) деяких ферментів (наприклад, кіназ і дегідрогеназ). Спочатку він був використаний як ліганд, зв'язаний з Целітом<sup>®</sup> (діатомовою землею, корпорація Johns-Manville), для очищення ДНК, дегідрогеназ, кіназ, мутаз, інтерферону фібробластів. Пізніше було доведено, що його успішно можна застосовувати для очищення CoA-залежних ферментів, нуклеаз, полімераз, рестриктаз, фосфорилаз, амінотрансфераз, факторів зсідання крові, сироваткового альбуміну, білків комплексу, інтерферону та ін. [11].

Як матриці для прив'язки моно- і дихлортріазинових барвників використовують агарозу, целіт-поліметакрилат, целіт-полівініловий спирт, агарозо-целітну композицію, ацетат целюлози, Сефарозу 4В, Toyopearl. Вважають, що іммобілізований Цібакрон голубий і його аналоги належать до імфілітів – сорбентів зі змішаною іонно-гідрофобною функцією, – для яких біоспецифічність виникає у результаті випадкової просторової орієнтації його структури з відповідною ділянкою білка, що відповідає за певні функції. Якщо ця ділянка включає в себе один із активних центрів ферменту, або якщо в результаті взаємодії з коферментом, субстратом чи інгібітором просторова конфігурація його суттєво порушується, то стає можливою конкурентна афінна елюція білка з колонки.

У наших дослідженнях ми використовували такі тріазинові барвники: Procion blue HB ("Acros Organics", Бельгія), Procion blue MX-R, Procion yellow H-E3G (Fluka, Швейцарія), Procion gelb M-4R (Serva, Німеччина), а також: Активний яскраво-оранжевий КХ, Активний фіолетовий 4К, Активний яскраво-голубий КХ, Активний яскраво-червоний 5СХ (виробництва заводу "Барва" Івано-Франківськ). Структурні формули цих барвників представлені на рис. 2, 3.

Матрицею для синтезу хроматографічних сорбентів служив Діасорб амінопропіловий (модифікований  $\gamma$ -амінопропілтриетоксисиланом кремнеземний сорбент, раніше відомий під маркою Силохром), фракція 0,25-0,50 (ЗАТ БиоХимМак Ст, Росія).

Сорбенти з іммобілізованими тріазиновими барвниками можуть бути отримані ефективною методикою "з включенням солі", згідно з якою для прискорення гідролізу тріазинового компонента в інкубаційну суміш додають хлорид натрію, а сам синтез проводять протягом тривалого часу при лужних значеннях рН [13].

Синтез кремнеземних сорбентів з іммобілізованими барвниками ми здійснювали таким чином.

До 5 см<sup>3</sup> сухого Діасорбу амінопропілового додавали 6,5 мл водного розчину (10 мг/мл) барвника. Через 20 хв додавали 2,5 мл 5 М NaCl, а ще через 90 хв 1,25 мл 5 М розчину карбонату калію (рН розчину близько 10,5). Витримували 48 год при 45°C. Одержані сорбенти від ковалентно незв'язаного барвника відмивали шляхом декантування дистильованою водою, 4 М розчином KCl, 25%-ним розчином ізопропанолу, 6 М розчином сечовини, дистильованою водою. Одержані сорбенти зберігали в 25%-ному розчині ізопропанолу.

Для барвників Procion blue MX-R та Активний яскраво-оранжевий КХ, які є дихлортріазиновими похідними, після іммобілізації на Діасорбі амінопропіловому, вільна реактивна хлоридна група блокувалася в процесі відмивання. Для забезпечення їх повного блокування сорбенти додатково промивали розчином тріс-оксиметиламінометану.

Як видно з представлених рисунків (рис. 2, 3), барвники Procion blue MX-R та Procion blue НВ є спорідненими за структурою: наявність антрахінонового хромофору, приєднаного до тріазинового кільця через бензамідиновий залишок (в *meta*- і *ortho*- положеннях, відповідно). Саме наявність бензамідинового залишку, сполуки, похідні якої є ефективними інгібіторами протеїназ трипсинового типу, може свідчити про їх можливі переваги перед іншими представленими барвниками як лігандами для виділення цього класу ферментів. Procion blue НВ (синонім відомого з літератури тріазинового барвника Cibacron blue F3G-A), який виробляється корпорацією ICI. Згідно з вітчизняною класифікацією, якої дотримується український завод-виробник "Барва", цей барвник має назву Активний яскраво-голубий К.

Всі інші наведені барвники містять нафтилову групу та заміщені ароматичні групи, які можуть відігравати значну роль у гідрофобній взаємодії з досліджуваними білками. Проте придатність того чи іншого сорбенту для очищення білка не завжди можна теоретично обґрунтувати. Необхідно дослідити його в умовах сорбції-десорбції.

Оскільки для експериментів нами були використані барвники різних фірм-виробників та різного походження, необхідно було дослідити ступінь чистоти препаратів, наявність чи відсутність домішок. Для цього досліджували спектри поглинання водних розчинів барвників у діапазоні довжин хвиль 190–750 нм на спектрофотометрі Shimadzu UV 1650 PC з використанням програмного забезпечення для аналізу даних UV Probe (версія 2,0) на базі Інституту біології клітини НАН України (м. Львів). Одержані результати показали, що всі досліджувані барвники не містили домішок іншого типу барвників, а максимуми спектрів поглинання відповідали паспортним даним. На основі отриманих даних розраховані коефіцієнти молекулярної екстинкції водних розчинів барвників.

Серед інших важливих властивостей досліджуваних барвників слід виділити наступні: всі вони водорозчинні, швидко та міцно (ковалентно) зв'язуються з хроматографічною матрицею, надлишок незв'язаного барвника легко відмивається кількакратним промиванням сорбенту розчинами з високою іонною силою та полярністю. Звичайно, основні властивості синтезованих сорбентів зумовлені природою матриці.

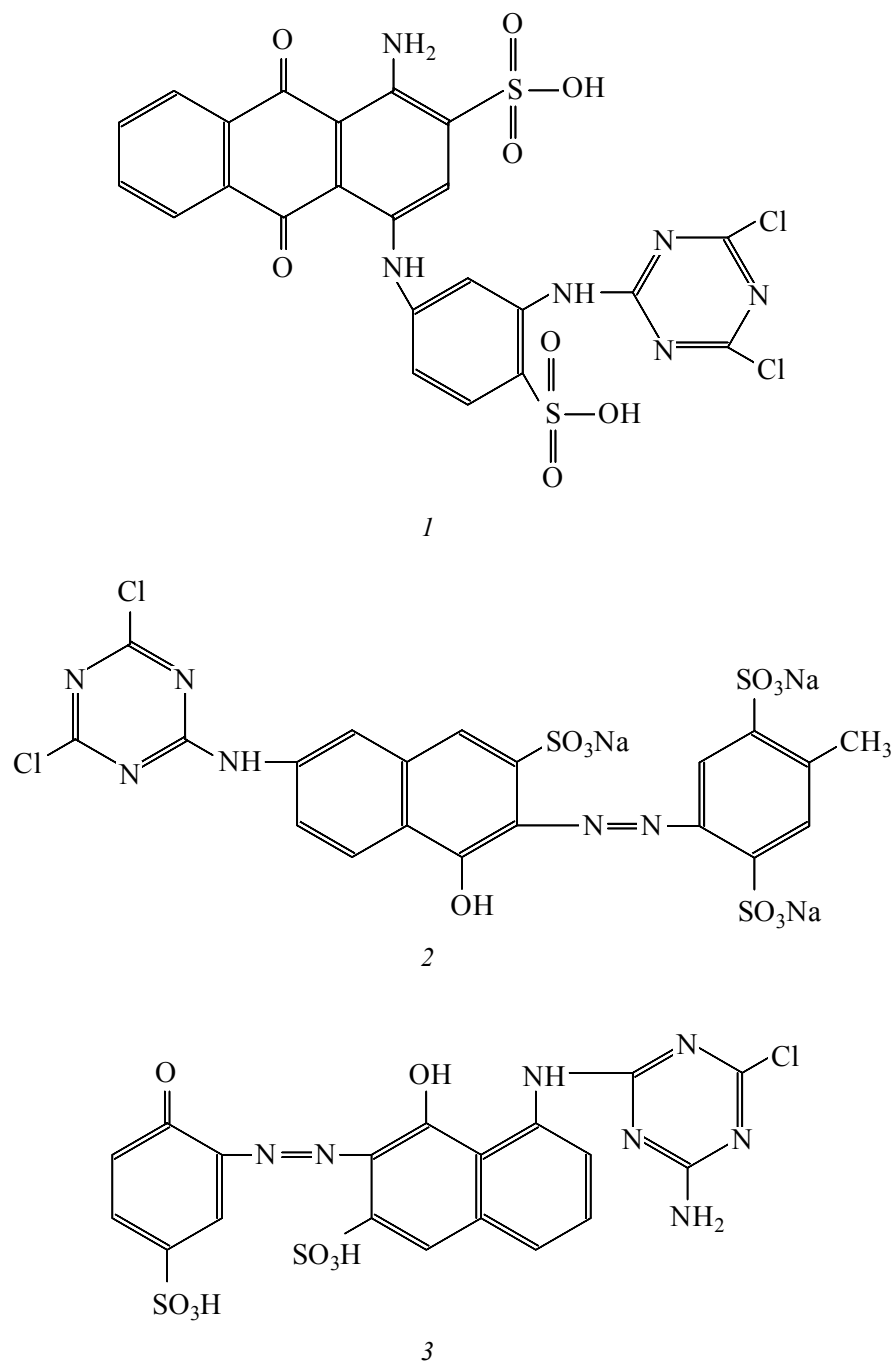


Рис. 2. Активні триазинові барвники, що використовувалися для іммобілізації на кремнеземних носіях: 1 – Procion blue MX-R; 2 – Активний яскраво-оранжевий КХ; 3 – Активний фіолетовий 4К.

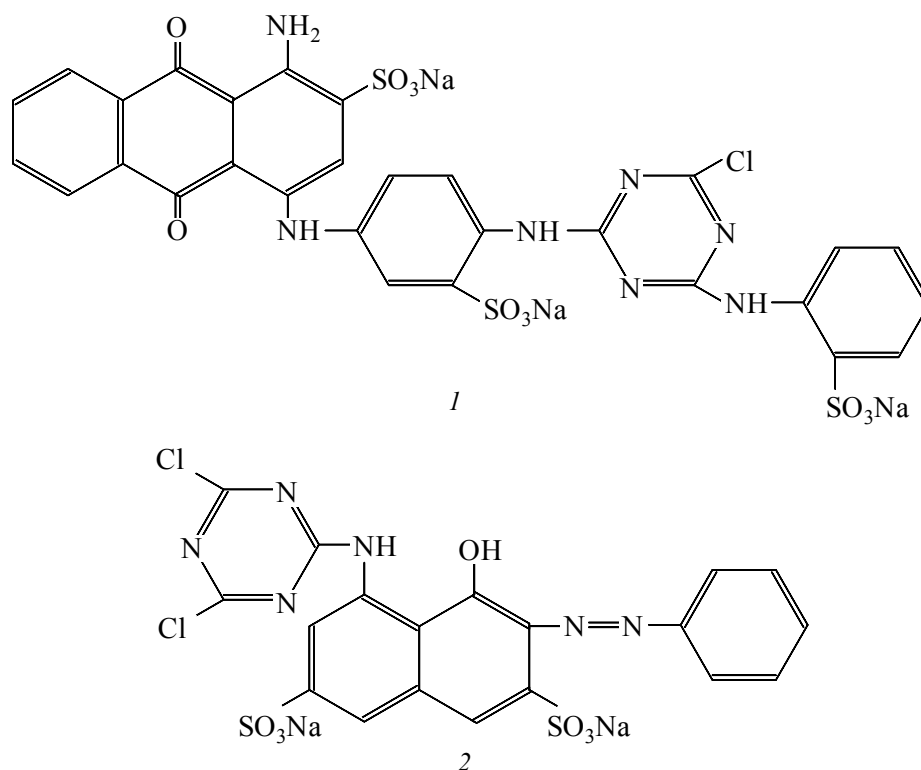


Рис. 3. Активні тріазинові барвники, що використовувалися для іммобілізації на кремнеземних носіях: 1 – Procion blue HB (Активний яскраво-голубий К); 2 – Активний яскраво-червоний 5CX.

Основною перевагою кремнеземних сорбентів над органічними є висока стабільність, легкість регенерації, стійкість до дії мікроорганізмів, хімічних речовин і стерилізації. Тому сорбенти такого типу успішно можуть використовуватися в інтенсивному виробництві препаратів, подібному до тих, які здійснюються на станціях переливання крові та заводах із випуску білкових препаратів.

Для визначення можливої специфічності лігандів-барвників і досліджуваних нами білків у модельному експерименті досліджені спектри поглинання в діапазоні довжин хвиль 190–700 нм розчинів вільних барвників при рН 8,0, а також барвників у присутності очищеного тромбіну чи альбуміну. Зсув пікового поглинання при певній довжині хвилі для того чи іншого барвника у присутності білка свідчив про їхню біоспецифічність (наявність взаємодії білок-барвник). Так, серед досліджуваних барвників зсув спостерігався для Активного яскраво-червоного 4К (від 540 до 545 нм), Procion blue HB (від 620 до 630 нм), Procion blue MX-R (від 600 до 625 нм), Yellow H-E3G (від 350 до 355 нм), Procion Gelb M-4R (від 430 до 440 нм).

Проведені дослідження по інгібуючому впливу вільних барвників на активність очищеного препарату тромбіну. Для цього готували робочий розчин тромбіну з активністю 15 с. Попередньо прогрівали на водяній бані при +37°C протягом двох хвилин пробірку з 0,2 мл пулу плазми з нормальними показниками протромбінового часу, фібриногену, АПТЧ та часу рекальцифікації. Проводили визначення тромбінового часу, додаю-

Основні характеристики досліджуваних нами барвників наведені в таблиці.  
Властивості досліджуваних барвників

Назва барвника	Молекулярна маса	Максимум поглинання $\lambda_{\text{max}}$ , нм	Коефіцієнт молярної екстинкції	Синоніми
Активний яскраво-оранжевий КХ	674	465	$127 \times 10^3$	
Активний фіолетовий 4 К	568,5	550	$155 \times 10^3$	
Активний яскраво-червоний 5 СХ	643	510–540	$177 \times 10^4$	Procion brilliant red 5 СХ
Procion yellow H-E3G		350 (354/267)	$123 \times 10^4$	Reactive Yellow 81
Procion blue HB	840	607	$178 \times 10^3$	Cibacron Blue F3GA; Reactive Blue 2; Активний яскраво-голубий К
Procion blue MX-R	637	595	$475 \times 10^3$	Reactive Blue 4

чи до прогрітої плазми 0,1 мл робочого розчину тромбіну (контроль), а також у присутності 0,01, 0,02, 0,03, 0,04 та 0,06 мл 10 мг/мл розчину барвника. Будували графіки залежності тромбінового часу від кількості барвника у пробі.

Нами продемонстровано, що виражене інгібування активності тромбіну характерне для барвників Активний яскраво-голубий К, Procion blue HB та Procion Gelb M-4R [ $K_i$  в межах (1–3)  $10^{-5}$  моль/л]. Дещо слабшим є інгібуючий ефект на активність тромбіну барвників: Активний фіолетовий 4К, Активний яскраво-червоний 5СХ, Procion yellow H-E3G та Procion blue MX-R.

Вищенаведені результати дають підстави припускати, що барвники Активний яскраво-голубий КХ, Procion blue HB та Procion Gelb M-4R можуть бути найефективнішими лігандами серед досліджуваних для виділення й очищення серинових протеїназ із плазми крові, оскільки саме для них характерною є специфічність зв'язування з цими ферментами. Проте, як відомо, на характер зв'язування білка з лігандом суттєво може впливати і природа матриці. Тому остаточно зробити висновок про придатність того чи іншого барвника як ліганда для хроматографічного очищення протеїназ можна лише після дослідження сорбційно-десорбційних властивостей синтезованих сорбентів.

Таким чином, синтезовані сорбенти на основі кремнеземів, які містять у ролі лігандів активні тріазинові барвники: Активний яскраво-оранжевий КХ, Активний фіолетовий 4К, Активний яскраво-голубий КХ, Активний яскраво-червоний 5СХ, Procion blue HB, Procion blue MX-R, Procion Yellow H-E3G, Procion Gelb M-4R. Вивчені фізико-хімічні властивості одержаних сорбентів, які характеризують їх високу стійкість і стабільність.

Вищою специфічністю до тромбіну (серинової протеїнази трипсिनного типу) серед досліджуваних барвників володіють Активний яскраво-голубий КХ, Procion blue HB та Procion Gelb M-4R.

1. *Гайда А. В., Монастырский В. А., Магеровский Ю. В.* и др. Хроматография тромбина на модифицированных кремнеземах: роль матрицы, спейсера и величины pH // Биотехнология. 1989. Т. 5. № 4. С. 449–454.
2. *Даниш Т. В., Магеровський Ю. В., Вороняк М. І.* та ін. Виділення вірусінактивованого препарату тромбіну людини з використанням біоспецифічної хроматографії на силохромі-активному яскраво-голубому // Гематологія і переливання крові: Міжвідомчий зб. К., 2006. Вип. 33. С. 94–99.

3. Даниш Т. В., Магеровський Ю. В., Вороняк М. І. та ін. Одержання високоочищеного вірусінактивованого препарату тромбіну людини методом афінної хроматографії в поєднанні з сольвентно-детергентною обробкою // Укр. мед. альманах. 2007. Т. 10. № 3 (Додаток). С. 110–111.
4. Даниш Т. В., Магеровський Ю. В. Схема получения очищенных вирусинактивированных белковых препаратов из плазмы крови // Сб. материалов науч.-практ. конф. по проблемам трансфузиологии. М., 15–16 ноября, 2005. С. 56.
5. Магеровський Ю. В., Брагінець О. Г., Даниш Т. В. Одержання високоочищених препаратів плазміногену та тромбіну з використанням SD-методу й афінної хроматографії // Праці 3-го Західноукр. симп. з адсорбції та хроматографії. Львів, 2003. С. 174–175.
6. Магеровський Ю. В., Монастырський В. А., Гайда А. В., Даниш Т. В. Биоспецифическая хроматография тромбина и урокиназы на кремнеземных сорбентах, модифицированных ингибиторами протеиназ // Хроматография в биологии и медицине: Міжнар. симп. М., 15–19 грудня 1986. М., 1986. С. 183–184.
7. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1985. 536 с.
8. Патент України на корисну модель № 24182 від 25.06.2007 р., С12N 9/96, А61К 38/02. Спосіб виділення та очищення тромбіну / Магеровський Ю.В., Брагінець О.Г., Шурко Н.О. та ін. // Бюл. № 9. 2007.
9. Danysh T., Magerovsky Yu., Braginetz O. G. The influence of antibiotics-polypeptides on fibrinolytic and coagulation activity *in vitro* // Ann. Hematol. 1996. Vol. 72. Suppl. 1. p. A33.
10. Danysh T., Magerovsky Yu. Creation of the technology of purification of the coagulative and fibrinolytic proteins // Haematologica. 1999. Vol. 84. P. 43.
11. Denizli A., Piskin E. Dye-ligand affinity systems // J. Biochem. Biohys. Methods. 2001. Vol. 49. P. 391–416.
12. Gaida A. V., Monastyrskii V. A., Magerovskii Yu. V. et al. Affinity chromatography of human thrombin on modified silica // J. Chromatogr. 1987. Vol. 424. N 2. P. 385–391.
13. Larsson P.-O. High-performance liquid affinity chromatography // Meth. Enzym. 1984. Vol. 104. P. 213–223.
14. Magerovsky Yu. V., Braginetz O. G., Danysh T. V. Preparation of high-purity and viral safety plasminogen by affinity chromatography // "Advances in Transfusion Safety–2001". Int. Symposium. Langen, Germany, 7–8 June 2001. P. 36.

#### SYNTHESIS OF SILICA-BASED SORBENTS WITH ACTIVE TRIAZINE DYES AS LIGANDS

**T. Danysh, M. Voronyak, N. Dultseva, N. Shurko**

*State Institution «Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine  
of Academy of Medical Science of Ukraine»  
45, General Chuprynka St., Lviv 79044, Ukraine  
e-mail: dtaras@litech.lviv.ua*

Macroporous silica-based sorbents with triazine dye ligands were synthesized. Their basic physical and chemical properties were explored. On the example of interaction model between of dyes and thrombin or albumin were selected the best sorbents which can be suitable for the purification of serine trypsin-like proteinases from blood plasma. Reactive brightly blue KX, Procion blue HB and Procion Gelb M-4R had the greatest specificity to thrombin.

*Key words:* biospecific sorbents, silica-based matrixes, reactive triazine dyes.

Стаття надійшла до редколегії 26.03.08

Прийнята до друку 30.03.08