

Изобретение относится к медицине и может применяться в биохимии, гематологии, медицине и медицинской промышленности.

Известен способ получения дестабилазы из пиявки, взятый нами в качестве прототипа, включающий аффинную хроматографию на L-лизине, иммобилизованном на водонерастворимом носителе, элюцию целевого продукта, нейтрализацию элюата и лиофилизацию. В качестве сырья используют секрет слюнных желез пиявок, порошок лиофильно высушенных пиявок и экстракт из культуры бактерии-симбионта медицинских пиявок.

Однако данный способ имеет следующие недостатки: конечный продукт не является гомогенным препаратом, т.к. содержит в своем составе гирудин и ингибитор калликреина. Не вся дестабилаза связывается с L-лизином, до 50% ее активности определяется в проскоке, т.е. в несвязавшейся части исходного раствора с лизином, иммобилизованном на водонерастворимом носителе.

В основу изобретения поставлена задача создания способа выделения комплекса дестабилаза-простаноид из медицинской пиявки, в котором обеспечивается увеличение выхода конечного продукта и повышение его чистоты.

Поставленная задача решается тем, что в способе выделения комплекса дестабилаза-простаноид из медицинской пиявки, содержащем очистку обработанного сырья путем аффинной хроматографии, элюирование буферным раствором, нейтрализацию элюата с последующей лиофильной сушкой, согласно изобретению аффинную хроматографию проводят на возвратных колонках SILASOBS C8, а элюирование – органическими растворителями или на антитела 6-кето-простагландин F, иммобилизованные на водонерастворимом носителе.

Способ осуществляют следующим образом. По п.1 формулы изобретения аффинную хроматографию проводят на сорбенте SILASORB C8, элюируют связывающуюся с сорбентом дестабилазу органическими растворителями. Полученные элюаты упаривают до сухого остатка.

Приводим примеры осуществления способа.

**Пример 1.** На колонку, наполненную сорбентом SILASORB C8 (1,5 x 4 см) наносили 10 мл секрета слюнных желез пиявок. Промывали дистиллированной водой от несвязывающей части секрета пиявок. Элюировали 40 мл 100% метанола. Элюат упаривали в ротаторном испарителе, растворяли в 0,5 мл 0,05 М фосфатного буфера pH 6,8. Определяли содержание и активность дестабилазы, пиявочных простагландинов, гирудина и ингибитора калликреина плазмы крови. Конечный продукт содержит дестабилазу, простаноид. Анализ несвязавшейся части секрета пиявок с сорбентом показал полное отсутствие активности дестабилазы и простаноида, т.е. произошло 100% связывание дестабилазы с сорбентом (табл. 1).

**Пример 2.** Водный экстракт культуры бактерии-симбионта медицинской пиявки в объеме 20 мл наносили на колонку с сорбентом SILASORB C8. Далее все процедуры, как в п.1, только в качестве элюирующего раствора использовали этилацетат. Полученный препарат дестабилазы соответствует целевому продукту (табл.1.).

**Пример 3.** Водный экстракт порошка лиофильно высушенных медицинских пиявок в объеме 40 мл наносили на колонку, наполненную сорбентом SILASORB C8. Далее, как в п.1, только элюцию проводили 50% метанолом в дистиллированной воде в количестве 80 мл. Полученный препарат дестабилазы соответствует целевому продукту (табл.1.).

**Пример 4.** Все процедуры, как в п.1, только элюцию проводили дистиллированной водой, затем 0,05 М трис-HCl, буфером pH 3,5. В этом случае не удастся элюировать связавшуюся с сорбентом дестабилазу.

Приводим примеры осуществления способа по п.2 формулы изобретения.

**Пример 1.** Лيوфилизированную антисыворотку к 6-кето-ПГF иммобилизовывали на бромцианактивированную агарозу. На колонку наносили 5 мл водного экстракта лиофильно высушенных пиявок (система рециклина в течение 2 часов). Промывали колонку дистиллированной водой. Элюировали целевой продукт буфером, содержащим 0,2 М глицина, 0,15 М HCl pH 3,0. Собранные фракции подщелачивали 0,1 N NaOH до pH 8,0. Объем элюата 8,5 мл (белок 0,03 мг/мл). Элюат диализовали против дистиллированной воды в течение 48 часов при 4°C через мембрану с порами размером 2000 Да, после чего лиофилизовали.

Полученный препарат соответствует целевому продукту, обладает фибринолитической активностью, содержит простагландины и обладает активностью гирудина и ингибитора калликреина плазмы крови. При электрофорезе проявляется в виде доминантной полосы, соответствующей белку с ММ 12,3 кДа (табл.2).

**Пример 2.** Все процедуры, как в п.1, только в качестве сырья использовали секрет слюнных желез пиявок в количестве 5 мл, а элюирующего буфера – раствор уксусной кислоты с pH=4,0. Полученный препарат соответствует целевому продукту (табл. 2).

**Пример 3.** Все, как в примере 1, только в качестве сырья использовали водный экстракт культуры бактерии-симбионта медицинских пиявок, а элюирующего раствора - раствор уксусной кислоты с pH 3,5, содержащий 0,2 М глицина. Полученный препарат соответствует целевому продукту.

**Пример 4.** Все, как в примере 1, только в качестве элюирующего буфера использовали раствор уксусной кислоты с pH 5,0. Активность снижена на 80%. Полученный препарат не соответствует целевому продукту, т.к. полной элюции не произошло.

Методы определения.

1. Спектрофотометрический метод определения белка (Кочетов Г.А. Практическое руководство по экимологии. М., Высшая школа, 1971 г.).

2. Активность гирудина определяли по удлинению тромбинового времени и выражали в международных ATNII единицах. Активность ингибитора калликреина плазмы крови анализировали по удлинению вре-

мени рекальцификации плазмы крови и выражали в условных антипрокоагулянтных единицах (Кудряшов Б.А. Большой практикум по физиологии человека и животных. М., Высшая школа, 1984 г.).

3. Содержание простагландинов анализировали по прописи фирмы Amersham (США) с использованием радиоиммунологического метода определения 6-KETO-P F.

4. Электрофорез проводили в системе Лемли в ПААГ в декотурирующих условиях.

5. Фибринолитическую активность определяли по размеру зон лизина на пластинах стабилизированного фибрина (3).

Предлагаемый способ позволяет получить конечный продукт с более высокой частотой и в большем объеме.

Таблица 1

Характеристика дестабилазы, полученной по предлагаемому способу и способу-прототипу

Параметр определения	Прототип	Примеры			
		1	2	3	4
Активность дестабилазы (мм/мг)	24	54	58	53	0
Содержание простагландинов (нанограмм/мг)	600	1750	1800	1620	0
Активность гирудина (ATNII Un/mg)	50	0	0	0	0
Активность ингибитора калликреина (АПК Ед/мг)	46	0	0	0	0
Выход целевого продукта (%)	45	100	100	100	0
Наличие полос на электрофорограммах образце дестабилазы	50 12,3 25 6	12,3   6	12,3	12,3	0

Таблица 2

Характеристика дестабилазы, полученной по предлагаемому способу и способу-прототипу

Параметр определения	Прототип	Примеры			
		1	2	3	4
Активность дестабилазы (мм/мг)	24	60	55	58	8
Содержание простагландинов (нанограмм/мг)	600	1500	1350	1620	100
Активность гирудина (ATNII Un/mg)	50	0	0	0	0
Активность ингибитора калликреина (АПК Ед/мг)	46	0	0	0	0
Выход целевого продукта (%)	45	0	0	0	0
Наличие полос на электрофорограммах образце дестабилазы	50 12,3 25 6	12,3	12,3  6	12,3	12,3



---

Тираж 50 екз.

Відкрите акціонерне товариство «Патент»  
Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101  
(03122) 3 – 72 – 89      (03122) 2 – 57 – 03

---