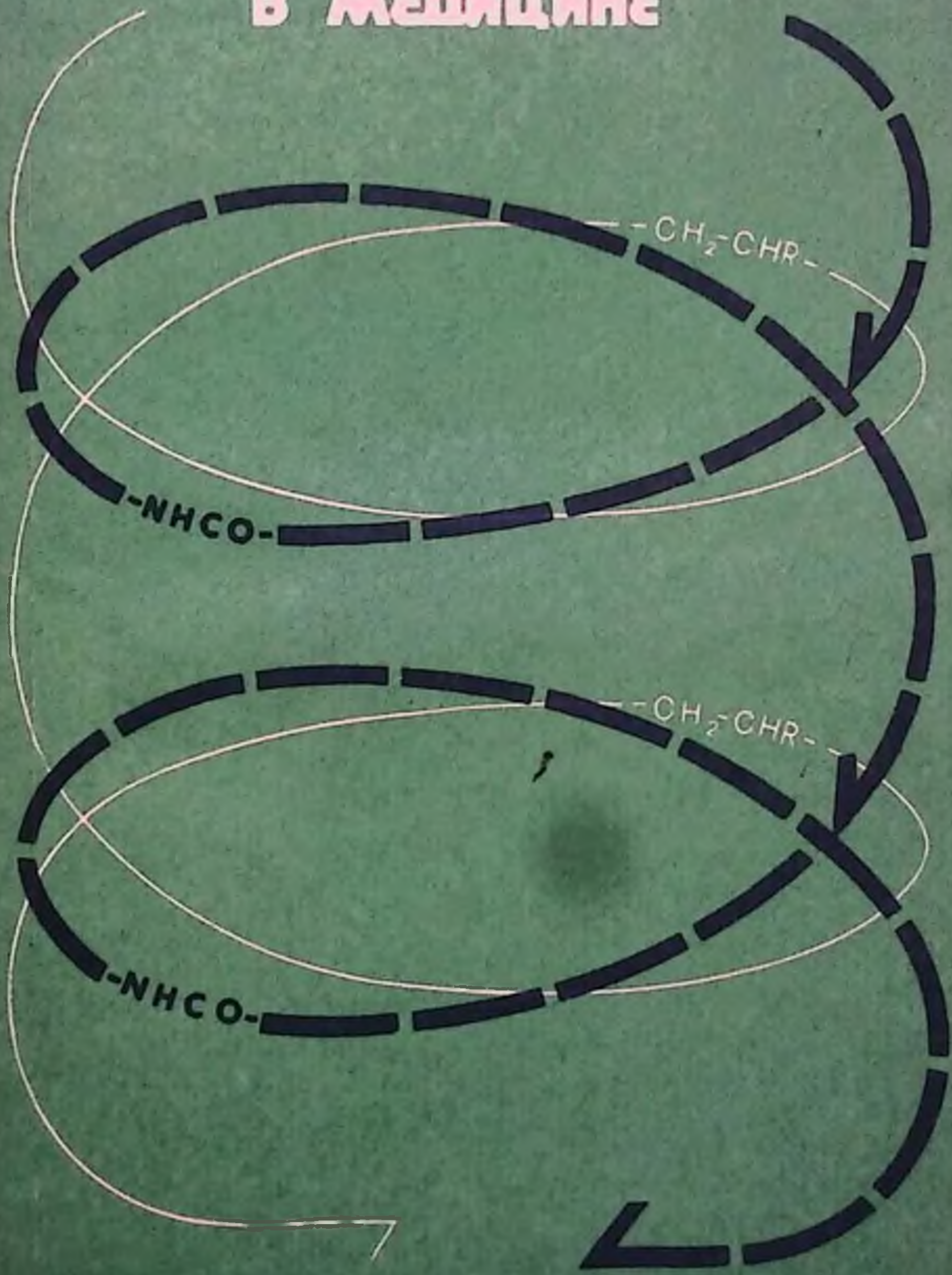


015. 33
M 152

К. А. Макаров С. А. Кибардин

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ БИОПРЕПАРАТЫ В МЕДИЦИНЕ



M 152

К. А. МАКАРОВ, С. А. КИБАРДИН

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ БИОПРЕПАРАТЫ В МЕДИЦИНЕ



МОСКВА, «МЕДИЦИНА», 1980

mm

МАКАРОВ К. А., КИБАРДИН С. А. Имобилизованные биопрепараты в медицине. М.: Медицина, 1980, 128 с.

В монографии рассматриваются различные аспекты применения ферментов, гормонов, антибиотиков и других лекарственных веществ, закрепленных (имобилизованных) на органических и неорганических сополимерах (носителях). Приводится характеристика таких носителей и описываются методы получения иммобилизованных биопрепаратов, их свойства и особенности применения в медицине. Обсуждаются преимущества иммобилизованных препаратов перед аналогичными препаратами, находящимися в растворенном состоянии. Приводятся данные об использовании иммобилизованных препаратов в терапевтических целях: для обработки крови, коррекции недостаточности ферментов в организме, в качестве противоопухолевых препаратов. Рассматриваются перспективы и результаты применения иммобилизованных биопрепаратов в хирургических клиниках. Показана возможность использования их в химико-фармацевтической промышленности.

Книга рассчитана на работников практической медицины, преподавателей, биохимиков, а также работников химико-фармацевтической промышленности.

Рисунков 2. Таблиц 4. Библиография: 169 названий.

М $\frac{50900-132}{039(01)-80}$ 185-80. 4108000000

ВВЕДЕНИЕ

Термин «иммобилизованные препараты» используется для обозначения всех типов нерастворимых производных ферментов, гормонов, антибиотиков, а также пригоден для этих же соединений, модифицированных растворенными в воде сополимерами. В соответствии с рекомендациями Международной комиссии по ферментной технологии модифицированные физико-химическими или химическими методами ферменты можно разделить на две большие группы: внедренные и связанные. К внедренным относят ферменты, заключенные в структуру органических и неорганических сополимеров, к связанным — ферменты, адсорбированные различными физико-химическими методами на твердых носителях (матрицах) или связанные с твердыми носителями химическими связями. Все эти системы рекомендуется называть иммобилизованными ферментами. В случае иммобилизации различных биологически активных соединений (ферменты, антибиотики, гормоны и другие лекарственные соединения) можно принять более общий термин — иммобилизованные биопрепараты.

Иммобилизованные биопрепараты могут широко использоваться для диагностики и лечения различных заболеваний, а также создания более совершенных протезов и аппаратов, заменяющих работу важнейших органов человека. Методы иммобилизации открывают принципиально новые подходы в конструировании аппаратов искусственной почки и печени. Так, на основе иммобилизованной уреазы созданы и прошли успешные испытания портативные аппараты искусственной почки.

По мнению ряда специалистов, на смену эре антибиотиков и гормональных препаратов приходит эра ферментов. Однако широкое использование ферментных

препаратов сдерживается их малой стабильностью при хранении, быстрой инактивацией под воздействием внутренних сред организма, сильными иммунологическими реакциями, высокой стоимостью и невозможностью регенерации. Эти недостатки могут быть в значительной степени устранены благодаря иммобилизации ферментов, т. е. их связыванию с неорганическими и органическими полимерами.

Иммобилизованные ферменты успешно используются для удаления различных вредных метаболитов, лечения некоторых злокачественных новообразований, например лимфосаркомы, при помощи иммобилизованной аспарагиназы. В практической медицине применяются различные типы повязок и тампонов с иммобилизованными на их поверхности ферментами, антибиотиками, антисептиками и другими лекарственными препаратами.

Иммобилизация лекарственных веществ на различных природных и синтетических полимерах не только повышает гидролитическую устойчивость этих соединений, но и приводит к увеличению эффективности самих лекарств. Методы иммобилизации открывают широкие возможности для создания лекарственных препаратов комплексного действия путем совместной иммобилизации (соиммобилизации) ферментов, антибиотиков, гормонов и других соединений, обладающих выраженным терапевтическим свойством. Исследования, проводимые в I Ленинградском медицинском институте, показали, что для создания таких препаратов могут быть эффективно использованы методы радикальной сополимеризации и синтез водорастворимых медицинских (со)полимеров — виниламина, винилпирролидона, винилового спирта, акриловых кислот заданного состава и строения.

С применением иммобилизованных препаратов разработаны более точные и экономичные методы массовых клинических анализов для определения глюкозы, молочной кислоты и инсулина в крови, мочевины в сыворотке крови, лактозы в моче, пенициллина в фармацевтических препаратах. Число публикаций, посвященных получению и применению иммобилизованных препаратов в медицине, растет с каждым годом. Это свидетельствует о том, насколько важна проблема синтеза и использования таких препаратов в теоретической и практической медицине.

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ МЕДИЦИНСКИХ БИОПРЕПАРАТОВ

Успехи использования иммобилизованных препаратов в медицине в значительной мере определяются правильностью выбора метода иммобилизации и природы используемого для нее носителя. Существующие методы иммобилизации биологически активных соединений можно разделить на физические и химические, а носители, применяемые для иммобилизации биологически активных соединений (ферменты, гормоны, антибиотики, лекарственные вещества), в зависимости от их природы — на органические и неорганические.

НОСИТЕЛИ (МАТРИЦЫ) ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Носители, используемые для получения иммобилизованных препаратов, должны обладать высокой механической прочностью, устойчивостью к химическим и микробным воздействиям и высокой гидрофильностью. Кроме того, носители должны легко активироваться (химическим или физическим методом), не оказывать ингибирующего действия на фермент и обладать минимальной неспецифической адсорбцией.

Определенное влияние на иммобилизацию оказывают также величина и знак электрического заряда носителя. Так, наличие на носителе и ферменте противоположных зарядов значительно способствует иммобилизации, в то время как одноименные электрические заряды затрудняют процесс иммобилизации. Необходимо учитывать также стоимость носителя и технологию его изготовления.

Органические носители

Органические носители могут быть получены в различных формах — в виде гранул, трубок, пленок, мембран и др. Они сравнительно легко подвергаются химической модификации, что позволяет вводить в них нужные функциональные группы для прочного связывания иммобилизованного матрицей соединения. Возможность применения различных сшивающих реагентов позволяет широко изменять проницаемость матриц, их набухание и механическую прочность. Органические носители, используемые для иммобилизации, можно разделить на синтетические (со)полимеры и природные.

Из природных органических полимеров для иммобилизации наиболее часто применяют производные целлюлозы, декстранов и агарозы. Эти полимеры обладают значительной гидрофильностью. Их гидроксильные группы легко можно использовать для введения в полимеры различных функциональных групп, пригодных для химического связывания с иммобилизуемым соединением. Производные декстрана и агарозы образуют относительно плотные гели. Производные декстрана применяются преимущественно в форме пористых полимеров — сефадексов с различной степенью сшивки. Производные агарозы носят промышленное название сефароз.

Активирование сефароз позволяет получить носители с различной длиной цепи, несущей активную для иммобилизации группу. При проведении иммобилизации имеется возможность изменять расстояние иммобилизованного фермента от полимерного носителя. Это увеличивает доступность фермента для субстратов с различными молекулярными массами и размерами (Marcus S.L., Valbinder F., 1972).

Из природных полимерных носителей для иммобилизации ферментов часто используют и агар. Он обладает достаточной механической прочностью, которую можно увеличить путем сшивки специальными реагентами. Оксигруппы на агаровой матрице позволяют проводить иммобилизацию многих ферментов химическим способом и при помощи сорбции.

Целлюлозные носители широко применяются для иммобилизации ферментов в виде карбоксиметилцеллю-

лозы, микрокристаллической целлюлозы, бромацетилцеллюлозы, ДЭАЭ-целлюлозы, а также иногда п-аминобензилцеллюлозы.

Из синтетических полимерных носителей для иммобилизации наиболее широко используются (со)полимеры акриламида. Полнакриламид, или акрилан, все чаще применяется для иммобилизации различных ферментов. Полнакриламидные гели, получаемые обычно полимеризацией акриламида в присутствии сшивающего агента (метилен-бис-акриламид), обладают значительной механической прочностью.

В настоящее время в Англии на основе акриламида в промышленном масштабе выпускаются носители для иммобилизации ферментов, носящие общее название энзакрилов (Barker S. A., Somers P. J., 1970). Энзакрил АА имеет ароматические аминогруппы — $C_6H_4NH_2$, которые для ковалентного присоединения ферментов должны быть активированы или реакцией диазотирования, или превращением их в изотиоцианатные группы. Сюда же относится энзакрил АN, используемый для иммобилизации α -амилазы.

Сравнительно недавно предложены новые носители для иммобилизации ферментов — ванакрилы (BROWN F., TOYEAN R., 1974), являющиеся производными метакриловой кислоты и ванилина.

Характеризуя носители для иммобилизации ферментов на основе сополимеров акриловых кислот, следует отметить, что хотя они и отличаются значительной механической прочностью, однако неустойчивы к действию микробов, сильно набухают в воде и органических растворителях, обладают невысокими гидродинамическими свойствами. В последнее время в ЧССР были синтезированы полимерные гели, сравнительно слабо набухающие в воде и обладающие достаточно жестким скелетом. Такие носители имеют макропористую структуру и носят промышленное название сферонон (Tugkova J. et al., 1973). Сферонон получают при сополимеризации акрилатов и метакрилатов с диакрилатами или диметилметакрилатами в присутствии неактивного растворителя. Изменяя соотношение исходных мономеров при их сополимеризации, можно значительно варьировать свойства полученных сополимеров (Макаров К. А., 1974), например пористость и удельную поверхность

сферононов. В работе J. Turkova и соавт. (1973) указывается на механическую прочность, химическую стабильность, биологическую устойчивость и хорошие гидродинамические свойства этого носителя.

Для иммобилизации ферментов применяются ионообменные смолы, являющиеся сополимерами стирола и дивинилбензола, с различной степенью сшивки и с разными ионообменными группами. В качестве примера можно указать на иммобилизацию дрожжевой инвертазы на ионообменной смоле (амберлит) при помощи реакции диазотирования (Березин И. В. и др., 1976). Достаточно широко используются для иммобилизации (со)полимеры аминокислот. В работе F. Riesel и F. Katchalski (1964) приводятся данные о применении в качестве носителя для иммобилизации ферментов многих (со)полимеров аминокислот, а также методы их активирования. Широко используется для иммобилизации нейлон в виде различных форм (гранулы, трубки, сетки, волокна и др.). В качестве новых полимерных органических носителей для иммобилизации ферментов были предложены полноксиэфиры, обладающие высокой механической прочностью, а также полиаллилкарбонаты, содержащие активные карбонатные кольца.

Неорганические носители

Среди большого числа неорганических носителей и сорбентов для иммобилизации биологически активных соединений чаще используют различные типы силикагелей и силохромов, макропористые стекла и их различные модификации. Эти носители обладают определенными преимуществами. Они имеют жесткий каркас и высокую механическую прочность, их структуру можно целенаправленно менять путем изменения размеров пор. Неорганические носители не подвергаются микробным воздействиям, их легко регенерировать, поэтому они могут использоваться многократно.

Макропористые силикагели характеризуются различной удельной поверхностью и размерами пор. Силикагели могут быть получены с нужной удельной поверхностью и размерами пор путем соответствующей обработки в автоклавах при различных температуре и давлении. На поверхности силикагеля находятся гидро-

кисильные группы, которые легко вступают в различные химические превращения. Размеры пор силикагеля от 10 до 2000 нм. Помимо силикагелей, для иммобилизации ферментов применяются также силохромы, производные двуокиси кремния, которые выпускаются отечественной промышленностью. Структурные характеристики силохромов существенно не отличаются от свойств некоторых типов макропористых силикагелей.

В настоящее время промышленность выпускает также разнообразные сорта макропористых стекол с регулируемыми в широких пределах размерами пор (от 10 до 1000 нм). Обычно для химической иммобилизации необходимо предварительно активировать поверхность стекла. Часто это достигается методом обработки стекла γ -амино-пропилтриэтоксиланом: $(C_2H_5O)_3Si(CH_2)_3NH_2$. За рубежом (США) выпускаются макропористые стекла с уже активированной поверхностью, содержащей NH_2 -группы. Активация поверхностей кремнезема этиленмином была использована для иммобилизации α -амилазы (рН 7,0) и пепсина (рН 4,3). Иммобилизованные ферменты сохраняли высокую активность по отношению к субстратам — крахмалу и гемоглобину соответственно (Тертых В. А., 1977).

МЕТОДЫ ИММОБИЛИЗАЦИИ

Иммобилизацию биологически активных соединений можно проводить как физическими, так и химическими методами. К физическим методам иммобилизации относятся адсорбция, включение в гель, микрокапсулирование. Они были одними из первых методов иммобилизации биологически активных соединений. Эти методы основаны на электростатических, дисперсионных и гидрофобных взаимодействиях и позволяют получить стабильные формы различных биологически активных и лекарственных веществ.

Адсорбция

Наибольший интерес для медицины представляет адсорбция различных биологически активных соединений на активированных углях. Имеются данные о сорбции на угле инвертазы, каталазы, гексокиназы, глюкоамилазы, АТФ-дезаминазы, глюкооксидазы, уреазы и

урокиназы. Для создания более совершенных аппаратов искусственной почки представляют интерес данные о сорбционной иммобилизации уреазы и урокиназы на природных алюмосиликатах (глины). На кислых глинах проводилась также сорбция глюкоамилазы, глюкооксидазы, каталазы и инвертазы (Sundogam P. V., Crook F. M., 1971).

Активные препараты были получены методом сорбционной иммобилизации на стекле химотрипсина и трипсина, а также папаина и глюкооксидазы (Messing R. A., 1970). Для сорбционной иммобилизации ферментов широко используются ионообменные целлюлозы. Так, ДЭАЭ-целлюлоза применялась для сорбции пепсина, протейназы, аспарагиназы, инвертазы, глюкоамилазы (Maeda H., Suzuki F. L., 1973). Катионообменные целлюлозы (КМ-целлюлоза) использовались для изготовления стабильных ферментных препаратов на основе химотрипсина, аспарагиназы, глюкоамилазы, кислой фосфатазы. Активные водонерастворимые препараты трипсина, полинуклеотидфосфорилазы, щелочной фосфатазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы были получены путем сорбции на нитроцеллюлозах (Goldman R., Lenhoff H. M., 1971). Созданы активные препараты инвертазы, лизоцима и пенициллинамидазы путем сорбции на коллагене.

Иммобилизацию лекарственных веществ можно проводить методом простого смешивания в растворе соответствующего лекарственного препарата и полиэлектролита. Иммобилизация в этом случае происходит за счет электростатического взаимодействия. Таким способом можно иммобилизовать синтетические лекарственные вещества, гормоны, антибиотики, ферменты и т. д. Образование ионной связи между лекарственным веществом и полимером не только увеличивает время пребывания лекарства в организме в биологически активном состоянии, иногда в 2—3 раза и более, но и усиливает его растворимость в воде и в изотоническом растворе хлорида натрия, устраняет неприятный вкус и запах и, что особенно важно, уменьшает токсичность (Тенцова А. И., Ажгихин И. С., 1974). Равновесная концентрация лекарственного вещества в организме при этом определяется рН среды, конформацией полиэлектролита, концентрацией электролитов, белков плазмы крови и других биологических макромолекул, спо-

способных к солеобразованию. При выполнении свободным (несвязанным) лекарством своих функций его количество будет восполняться в системе (по закону действия масс) за счет освобождения из комплекса с полиэлектролитами. Такой комплекс является поставщиком свободного лекарства с постоянной, достаточно малой концентрацией. В случае присоединения лекарственного вещества к сильным ионитам скорость отщепления зависит от ионной силы пищеварительных соков и практически не зависит от рН. Частичное замедление освобождения лекарственного вещества на сшитых полиэлектролитах было достигнуто также увеличением размера частиц полимера и степени сшивки полимерных цепей (Разводовский Е. Ф., 1976).

Вещества кислого характера, например производные барбитуровой кислоты, присоединяли с целью пролонгирования их действия к сшитым анионитам. Однако в желудочно-кишечном тракте такие вещества освобождаются не полностью — не более 80%.

Некоторые иониты с адсорбированными на них лекарственными веществами выпускаются в форме твердых желатиновых капсул с крышечками или в виде таблеток «Ионекситен». Они содержат лекарственные вещества, связанные с катионитами (эфедрин, атропин, резерпин), или с анионитами (барбитураты).

Полиэлектролитные свойства полиметакриловой кислоты используются для защиты инсулина от воздействия ферментов при приеме его *per os*. Если же получить комплексное соединение инсулина с полиметакриловой кислотой, то он окажется недоступным для воздействия ферментов пищеварительного тракта. Используя полиэлектролитные свойства четвертичной соли полидиметиламиноэтиламетакрилата, удалось получить пролонгированные формы пенициллина.

По-видимому, поликатионы способны транспортировать цитостатические вещества к опухолевой клетке. С этой целью использовали полиэтиленмин, полипропиленмин, диэтиламинодекстран, полибрэн и другие полимеры. Эти высокомолекулярные вещества способны образовывать комплексы с иоддезоксицитидиловой кислотой и переносить йоддезоксиуридин — активный метаболит. Наличие поликатиона, облегчает проникновение активного метаболита через клеточную мембрану либо целого комплекса поликатион — метаболит.

Включение в структуру гелей

В последнее время широкое распространение в медицине получили различные гели и гидрогели. Гидрогели представляют собой особый класс молекулярных соединений, состоящих из молекул воды (веществ-«гостей»), включенных в трехмерную структуру полимерного геля (веществ-«хозяев»). В качестве веществ-гостей — иммобилизуемых веществ — часто используются ферменты, антисептики, антибиотики и другие лекарственные препараты. В роли веществ-«хозяев» используют различные органические сополимеры, способные к образованию трехмерных сшитых структур. Наибольшее применение нашли (со)полимеры акриловых кислот, акриламида, винилового спирта, винилпирролидона и другие сополимеры, содержащие функциональные группы, способные образовывать различные межмолекулярные связи. Интерес к гидрогелям объясняется тем, что большинство тканей организма имеет именно такую природу. На основе акриловых гидрогелей в начале 60-годов XX века удалось создать нашедшие клиническое применение контактные глазные линзы. Нерассасывающиеся «пломбы» из поливинилового спирта (ПВС) применяют при пластических операциях для заполнения послеоперационных полостей и при заболеваниях легких. В практической медицине уже довольно давно применяются гели из ПВС. Этот спирт нетоксичен, из него легко приготовить гели. В большинстве случаев гели получали путем обработки раствора ПВС соединениями бора, например борной кислотой. Часто в гель включают антибиотики и антисептические вещества, например йод. Токсотропные гели йодполивинилового спирта образуются при остывании нагретых смесей водных растворов ПВС и йода с добавлением вещества, способного образовывать сшивки. При введении в организм такого препарата образуется своеобразное лекарственное депо. Йодные комплексы продолжительное время остаются неизменными, при постепенном рассасывании в организм вводятся дополнительные дозы йода, сохранившего свои антимикробные свойства, что обеспечивает длительный лечебный эффект (Мохнач В. О., 1974). Гели позволяют также увеличить время действия антибиотиков, причем пролонгирование, если в качестве основы взять гель

поливинилового спирта, более длительно, чем в случае применения полимерных растворов, так как гель рассасывается медленно. С точки зрения практического применения гидрогели имеют большую перспективу, так как являются одним из очень немногих полимерных материалов, с помощью которых можно подойти к созданию искусственных кровеносных сосудов, действительно близких по ряду физико-химических и структурных свойств к естественным кровеносным сосудам. Гель предотвращает образование мономолекулярного слоя белка, который появляется на разделе фаз: кровь — полимер. Этот слой имеет решающее значение для взаимодействия полимера с белками крови, в частности с фибриногеном. Вследствие набухания полимерных гидрогелей в жидких средах организма, например в плазме, создается непрерывная жидкая фаза крови, гель как бы постепенно, без резкой границы, переходит в кровь, что мешает ей «видеть» чужеродную поверхность и «реагировать» тромбообразованием (Смурова Е. В., Доброва Н. Б., 1976).

Широкое распространение для иммобилизации биологически активных соединений нашли также полиакриламидные гели.

Впервые Р. Bergfeld и Т. Van (1963) предложили использовать полиакриламидный гель для иммобилизации биологически активных соединений. С помощью полиакриламидного геля была проведена иммобилизация трипсина, декарбоксилазы, химотрипсина, инвертазы. Наибольшая эффективность иммобилизации в структуре гелей наблюдается для ферментов с большей молекулярной массой (порядка нескольких сотен тысяч). В случае малых размеров фермента (например, трипсина — молекулярная масса около 24 000) происходит его вымывание даже при небольших концентрациях.

Имеются данные об иммобилизации трипсина и α -химотрипсина в гелях акриловых кислот и гелях кремнийорганических полимеров. Включение в структуру полидиметилсилоксанового геля ацетилхолинэстеразы резко увеличивало стабильность этого фермента.

Наибольший интерес для создания медицинских препаратов представляет иммобилизация биологически активных веществ в структуре гелей плазмозаменителей. Иммобилизация в структуре гелей поливинилово-

го спирта глюкоамилазы и инвертазы при помощи γ -радиации привело к сохранению 50% активности этих ферментов, причем вымывание их из структуры гелей практически не наблюдалось. Из природных (со)полимеров для иммобилизации наибольший интерес представляют полисахаридные гели. Пространственные сетки этих гелей более лабильны, так как образованы за счет водородных связей. Описана иммобилизация некоторых ферментов в агар-агаре и крахмальном геле.

Иммобилизация в структуре гелей позволяет максимально сохранить нативность иммобилизованного соединения, защищает его от воздействия внешней среды и микроорганизмов. Однако из-за отсутствия специфических взаимодействий между структурой гелей и биологически активным соединением длительной стабилизации биологических свойств иммобилизуемого соединения, как правило, достигнуть не удастся.

Микрокапсулирование

Наиболее перспективным методом иммобилизации биологически активных веществ является микрокапсулирование. Этот метод состоит во включении водных растворов иммобилизованных веществ (ферменты, антибиотики и некоторые другие лекарственные препараты) в микрокапсулы, которые проницаемы для низкомолекулярных и непроницаемы для высокомолекулярных соединений.

Микрокапсулирование позволяет создавать высокие концентрации белка в малых объемах раствора, находящегося в микрокапсуле, и сохранять каталитические свойства микрокапсулированных ферментов. Так, например, каталаза, включенная в полиамидные капсулы, содержащие 10% раствор гемоглобина, полностью сохраняет свою каталитическую активность.

Необходимо отметить, что иммобилизация в микрокапсулах сохраняет активность и стабильность ферментов не только *in vitro*, но и *in vivo*. Так, микрокапсулированная аспарагиназа, введенная в кровь мышам, активна и в организме животных.

Использование микрокапсулированной суспензии инсулина значительно уменьшает число инъекций при диабете. Существенно, что внутрь микрокапсул поме-

щают не только растворимые соединения, но и преимущественно связанные с носителем иммобилизованные препараты ферментов, что пролонгирует их действие. Полупроницаемые мембраны имеют толщину около 20 нм и радиус пор приблизительно 2 нм. Проницаемость мембран может быть изменена увеличением или уменьшением диаметра пор мембраны.

Имеются данные о создании полупроницаемых антитромбогенных мембран путем иммобилизации гепарина, обладающего противосвертывающим свойством (Chang T. M. et al., 1967). Авторы подробно описывают метод приготовления микрокапсул, содержащих гепарин. В качестве мембран используется коллодий, а также нейлон. Диаметр капсул — от 60 до 100 мкм. Существенно, что контакт между антитромбогенными капсулами и кровью не вызывает гемолиза. Микрокапсулы, обладающие антикоагуляционными свойствами, были использованы авторами в опытах как *in vivo*, так и *in vitro*. Показана также возможность очистки крови *in vitro* от токсинов при интоксикации организма. Пластиковая емкость объемом 50—70 мл, содержащая микрокапсулированные ферменты, подключается к бедренной артерии и соответствующей вене подопытного животного (собака) по принципу шунта. Диаметр микрокапсул 50—100 мкм. Емкость содержит 3 мл коллоидных микрокапсул с иммобилизованным на поверхности гепарином. Внутри микрокапсул находится необходимый фермент в свободном или иммобилизованном состоянии. Через емкость с микрокапсулами пропускается кровь подопытного животного со скоростью приблизительно 200 мл/мин. Время пропускания — около 2 ч. С помощью микрокапсулированной уреазы можно снизить содержание мочевины в крови собак на 50% в течение 90 мин. Эта техника может быть использована для лечения почечной недостаточности.

Микрокапсулированная каталаза также была применена для повышения каталазной активности крови. Толщина сферической мембраны около 20 нм. Радиус пор 1,5 нм. Микрокапсулированная каталаза вводилась в виде водной суспензии. Через 20 мин содержание фермента в организме подопытных животных (мыши) повысилось с 20 до 70%.

Введение в организм микрокапсулированного водного раствора фермента или его эмульсии обычно не

вызывает иммунной реакции при использовании небольших доз (1—2 мл на 1 кг массы тела).

Микрокапсулы, полученные из полимерных мембран, обладают механической прочностью. Вместе с тем следует отметить определенные трудности, связанные с применением полупропускаемых микрокапсул. Для микрокапсулированных ферментов невозможно проникновение высокомолекулярных субстратов, например фибрина, внутрь капсулы. Кроме того, оболочка микрокапсул обычно не участвует в метаболизме и должна удаляться из организма. Важно также, что парентеральное введение микрокапсулированных ферментов не позволяет создать высокие концентрации фермента или лекарственного препарата в патологическом очаге. В связи с этим наиболее перспективным является создание микрокапсул из биорассасывающихся материалов. При этом скорость рассасывания и время полного растворения носителя в организме можно целенаправленно изменять режимами получения сополимерных микрокапсул.

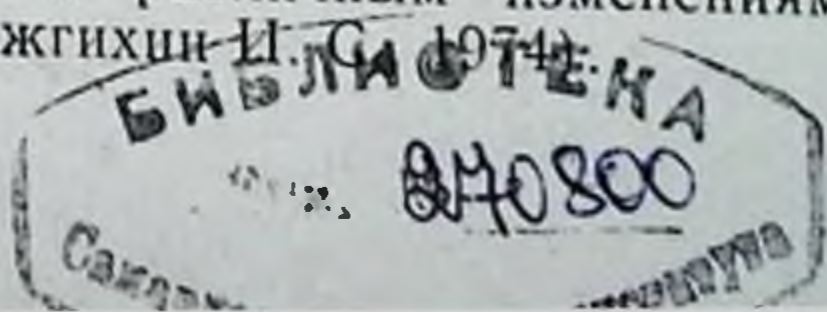
В работе В. П. Торчилина и соавт. (1976) описывается метод получения иммобилизованных ферментов путем включения их в поливинилпирролидоновые микрогранулы, обладающие медленной растворимостью в организме, а также регулируемой скоростью выхода фермента в окружающую среду. Химотрипсин иммобилизовался при помощи реакции сополимеризации винилпирролидона с акроленом. В другой работе в качестве биологически растворимых носителей предложено применять альдегидпроизводные сефадекса, обладающие медленным рассасыванием в организме (от нескольких дней до нескольких недель (Чазов Е. И. и др., 1976)). Авторы определяли время выделения иммобилизованного фермента в окружающую среду, а также время полного растворения носителя. В качестве ферментов, связанных с носителем, использовали химотрипсин, фибринолизин и стрептокиназу. Оказалось, что полное время выхода в раствор и освобождения связанного химотрипсина (30 мг на 1 г носителя) равно 24 ч. Для стрептокиназы (80 мг на 1 г носителя) это время равнялось 32 ч. Время же полного рассасывания альдегидсефадекса в организме составляло 48 ч. Показано также, что иммобилизованные ферменты обладали значительной термостабильностью.

Представляет определенный интерес использование в качестве «биологически растворимых» носителей полимеров полисахаридной природы, а также некоторых синтетических (со)полимеров. Для получения препаратов пролонгированного действия, обладающих замедленной скоростью освобождения ферментов в окружающей среде, и для создания значительных концентраций лекарственных веществ непосредственно в пораженном органе, например в миокарде, применяются тромболитические ферменты, вводимые в кровь.

Для этой цели использованы растворимые декстраны с молекулярной массой от 35 000 до 50 000, модифицированные окислением йодной кислоты с введением в носитель активных альдегидных групп. Имобилизованный химотрипсин полностью сохранял активность и обладал значительной устойчивостью к повышению температуры. В качестве носителей использовались также сополимеры акриламида и акриловой кислоты различного состава (Торчилли В. П. и др., 1976). При иммобилизации ферментов в таких сополимерах удалось добиться значительной емкости носителей (до 400—500 мг белка на 1 г носителя). Активность ферментов при этом сохранялась почти полностью (80—100% от первоначальной активности).

В настоящее время созданы и прошли успешные испытания протезы кровеносных сосудов из различных синтетических волокон с иммобилизованными на внутренней поверхности тромболитическими ферментами.

Включать биологически активные и лекарственные соединения можно не только в структуру гелей или капсул. Эффективным методом увеличения стабильности лекарственных соединений, а также пролонгирования их действия является метод включения их в структуру клатратов — клатратообразование. Клатратные соединения — это вещества, имеющие полости или в кристаллической решетке, или в молекуле. В качестве веществ-«хозяев» — клатратообразователей — чаще всего используют мочевины. В качестве веществ-«гостей» использовали такие лекарственные соединения, как декамин, камфора, аскаридол, тетрациклин. Так, клатрат тетрациклина с мочевиной обладает повышенной стабильностью к различным изменениям среды (Тенцова А. И., Ажгихин И. С., 1974).



Химическая иммобилизация биологически активных соединений является наиболее широко распространенным и перспективным методом иммобилизации. В случае иммобилизации ферментов этот метод делится на: 1) химическое (ковалентное) связывание фермента с полимерным носителем; 2) сшивку молекул ферментных белков с использованием бифункциональных соединений, чаще всего глутарового альдегида. Для получения иммобилизованных ферментов используют различные типы химических реакций: ацетилирование, аминоацетилирование, алкилирование (арилирование), азосочетание, образование иминов и др.

Выбор метода химической иммобилизации для создания новых медицинских препаратов определяется видом иммобилизуемых веществ (фермент, антибиотик, гормон и др.), типом синтетической матрицы-носителя (органические, неорганические, водорастворимые, неворастворимые носители), методом введения в организм (инъекционно, перорально, ингаляционно, ректально и т. д.).

Создание растворимых стабилизированных препаратов на основе белковых веществ может быть достигнуто путем как химического связывания этих соединений с растворимой матрицей, так и создания дополнительных ковалентных связей в молекулах белка.

Создание растворимых стабилизированных препаратов

Создание стабилизированных препаратов биологически активных соединений может быть достигнуто путем их иммобилизации на растворимых (со)полимерах. Синтезированы растворимые препараты трипсина (Яровая Г. А. и др., 1974) и химотрипсина (Бессмертная Л. Я. и др., 1974), модифицированные сополимерами маленновой и акриловой кислот. Растворимые в воде производные α -химотрипсина могут быть получены иммобилизацией на полимерах (полиакриловая кислота, поли- Γ -глутаминовая кислота и карбоксиметилцеллюлоза) при помощи реактива Вудворда (Patel R. P. et al., 1967). Этот реагент используется в синтезе пептидов. Меняя соотношение реагента и полимерного носителя, можно получать нерастворимые или растворимые пре-

параты фермента. Помимо ферментов, иммобилизации подвергались гормоны, в частности инсулин, связанный с растворимым декстраном (Armstrong K. J. et al., 1972). Декстран предварительно обрабатывали бромистым цианом, после чего к раствору добавляли инсулин. рН раствора поддерживали около 9,4, раствор перемешивали 16 ч и промывали 6M раствором гуанидхлорида. При этой операции связывается с полимером 23% инсулина. Авторами доказано, что иммобилизованный инсулин обладает гормональной активностью как *in vivo*, так и *in vitro*.

Успешный синтез иммобилизованного инсулина на основе декстрана и сополимеров винилпирролидона осуществлен также в нашей стране (Torchilin V. P. et al., 1978). Иммобилизованный гормон проявлял свою активность в организме в 3—4 раза продолжительнее неиммобилизованного. Весьма эффективными матрицами для получения водорастворимых иммобилизованных препаратов являются плазмозаменители на основе (со)полимеров акриловых кислот, винилпирролидона и винилового спирта. Предварительная обработка и активация поливинилпирролидона (ПВП) заключается в его гидролизе. Показано, что активированный ПВП связывает трипсин, полностью сохраняя его активность.

Иммобилизация глюкооксидазы на водорастворимые сополимеры винилацетата, винилпирролидона и винилового спирта в значительной мере увеличивало термостабильность этого фермента (O'Malley J., Ulmer R., 1973). Из синтетических полиамидов для иммобилизации биологически активных соединений наиболее перспективным оказался нейлон. Активацию поверхности нейлона производят путем последовательной обработки концентрированной хлористоводородной кислотой и раствором глутарового альдегида. Образующиеся на поверхности активные альдегидные группы способны к взаимодействию с аминогруппами иммобилизуемых биологически активных соединений. Этот метод может быть использован для активации различных медицинских изделий из нейлона — трубок, волокон, тканей.

Наиболее интересными и перспективными носителями для иммобилизации биологически активных соединений являются (со)полимеры аминокислот. Сополимеры L-аланина, L-глутаминовой кислоты, L-лейцина и других аминокислот использовали для иммобилиза-

ции трипсина, пепсина и некоторых других ферментов. Для иммобилизации уреазы химическим способом использовали различного состава сополимеры L-фенилаланина с L-лейцином, глицином или аланином.

Для иммобилизации биологически активных соединений различными методами большой интерес представляют сополимеры производных стирола с акриловыми кислотами. В этих сополимерах вследствие одновременного присутствия бензольных колец стирола и полярных группировок акриловых кислот в значительной мере можно регулировать гидрофобно-гидрофильный баланс и сорбцию биологически активных соединений.

Иммобилизация на природных (со)полимерах

Основная часть медицинских иммобилизованных препаратов изготовлена с использованием природных (со)полимеров. Наибольшее распространение в качестве матриц для иммобилизации получили полисахариды и белковые соединения.

Из природных полисахаридов для иммобилизации используются главным образом: 1) производные целлюлозы (поли-1,4-β-D-глюкопиранозил-D-глюкопираноза); 2) производные декстрана (поли-1,6-α-D-глюкопиранозид-D-глюкопираноза); 3) производные агарозы.

Реакционноспособные группы полисахаридов могут быть использованы для создания активных ионообменных или гидрофобных центров, способных сорбировать биологически активные соединения или вступать во взаимодействия с функциональными (но не биологически активными) центрами иммобилизуемых веществ.

На основе полисахаридов получены как растворимые, так и нерастворимые в воде биологически активные препараты, обладающие разнообразными по своему лекарственному действию свойствами. Так, препараты, обладающие антимикробными свойствами, получали путем химического взаимодействия бактерицидных и фунгицидных веществ с целлюлозой. Для этого были использованы антисептические вещества акридинового ряда (этакридинлактат), галогензамещенные фенолы, препараты йода. Изучение антибактериальной активности показало, что ею обладают лишь те производные целлюлозы, в которых антисептическое вещество при-

соединено к полимеру ионной, лабильной ковалентной или координационной связью. Соединения с прочной ковалентной связью между производным целлюлозы и антисептиком антибактериальной активностью не обладают. Исследовали антимикробные свойства олово- и ртутьорганических соединений на основе привитых сополимеров целлюлозы и полиакриловой кислоты. Отмечена их высокая антимикробная активность, которая может быть достигнута введением небольшого количества олова или ртути (0,1—0,2% от массы целлюлозы). Некоторые соединения ртути обладают диуретическим свойством. При иммобилизации на дезоксицеллюлозе происходит изменение этих свойств со снижением диуретических и появлением антимикробных.

Для иммобилизации анестетиков преимущественно использовались карбоксиметилцеллюлоза и циклодекстрины. Токсические дозы целлюловокаина (полимерное производное новокаина и карбоксиметилцеллюлозы), а также смеси новокаина и карбоксиметилцеллюлозы значительно отличаются в зависимости от способа введения.

Иммобилизованный новокаин и дикаин характеризуются некоторым снижением проникновения в ткани.

Иммобилизация местноанестезирующих средств (анестезин, новокаин) на циклодекстринах вызывает пролонгирующий эффект за счет замедления скорости их гидролиза. Терапевтический эффект анальгетиков типа салицилата натрия снижается в случае иммобилизации на метилцеллюлозе и резко повышается при иммобилизации на полипептидных носителях, например пектине (Ряпосова О. И., Назаров Б. В., 1970).

Антимикробные иммобилизованные препараты, содержащие антибиотики с основными группами (например, неомицин), получили на основе привитого сополимера целлюлозы с полиакриловой или полиметакриловой кислотой, ксантогената целлюлозы или эфиров карбоксиметилцеллюлозы. Отмечено, что активность антибиотиков по отношению к ряду микроорганизмов в присутствии метилцеллюлозы и карбоксиметилцеллюлозы значительно повышается с одновременным существенным продлением антимикробного действия (Allen R. H., Mehlman C. S., 1973).

Иммобилизация натриевой соли бензилпенициллина повышает его устойчивость к пенициллиназе. Примене-

ние иммобилизованного на полилизине пенициллина существенно повысило чувствительность различных методов выявления специфической сенсибилизации больных к антибиотикам группы пенициллина. Несомненные преимущества этого соединения по сравнению с обычным пенициллином показаны в диагностике поздней и скрытой сенсибилизации к антибиотикам (Разводовский Е. Ф., 1976).

Для повышения растворимости жирорастворимых витаминов (А и D) и их производных использовали моноэфиры сахарозы (или рафинозы) и одноосновных жирных кислот — линолевой, лауриловой, капроновой и др. В результате этих исследований установлено, что комплекс витамина А с циклодекстринами позволяет создать более стабильный витаминный препарат.

Химические комплексы с лекарственными веществами образуют полигалактуроновые кислоты, карбоксиметилцеллюлозы или другие производные полисахаридов. Таким образом были получены иммобилизованные формы хинидина, дигитоксина и некоторых других лекарственных препаратов (Ряпосова О. И., Назаров Б. В., 1970).

При использовании иммобилизованных препаратов необходимо учитывать возможности побочных реакций за счет различных групп лекарственного препарата и полимера, а также продуктов их метаболизма. Например, в продуктах окисления целлюлозы появляются метилтиометильные группы. Иммобилизация такого полимера с тубазидом обуславливает выраженное побочное действие на почки, что проявляется, в частности, гематурией.

В дальнейшем было многократно показано, что химическая природа полимерной матрицы может оказывать большое влияние на терапевтический эффект иммобилизованного лекарственного препарата. Например, лактоза резко ускоряет действие тестостерона, замедляет действие барбитуратов и полностью тормозит лечебный эффект тубазида (Ряпосова О. И., Назаров Б. В., 1970).

Среди производных целлюлозы наиболее изучена монокарбоксилцеллюлоза — продукт окисления целлюлозы окислами азота. Кальциевая соль монокарбоксилцеллюлозы оказалась эффективным гемостатическим препаратом. Для создания нерассасывающегося гемо-

статического материала была получена также кальциевая соль привитого сополимера целлюлозы и полиакриловой кислоты. Этот материал хорошо стерилизуется, сохраняя свои гемостатические свойства и стабильность. Гемостатические препараты такого рода могут быть синтезированы и на основе смешанных эфиров целлюлозы, в частности метилоксипропилцеллюлозы, которая отличается высокой прочностью и эластичностью, не является питательной средой для микроорганизмов и позволяет регулировать сроки рассасывания препаратов. Метилоксипропилцеллюлоза не инактивирует тромбин, наоборот, смесь тромбина и метилоксипропилцеллюлозы вызывает более быструю коагуляцию белков, чем смесь тромбина с изотоническим раствором хлорида натрия. Показано, в частности, что время свертывания плазмы под влиянием смеси тромбин-метилоксипропилцеллюлоза в 6 раз меньше, чем в контрольном опыте.

Известно, что адреналин, норадреналин и продукты их окисления являются прямыми активаторами одного из энзимов контактной фазы свертывания — фактора Хагемана. При исследовании взаимодействия факторов контактной фазы свертывания крови с норадреналином выявлено, что плазма крови человека после пропускания через колонку с норадреналин-сефарозой утрачивает способность к контактной активации. Отмеченное сродство ферментов контактной фазы свертывания крови к катехоламинам лежит в основе молекулярного регулирования этими гормонами свертываемости крови. В настоящее время считается, что катехоламины выполняют роль активатора ключевой реакции, катализируемой фактором Хагемана (Зубаиров Д. М. и др., 1977).

Сорбционная иммобилизация ферментов на модифицированных полисахаридах применена для большого числа ферментов. В качестве носителей использовались различные производные целлюлозы, сохранившие ионообменные группы. В большинстве случаев это приводило к значительной потере ферментативной активности, в связи с чем ионообменные смолы не нашли широкого применения для иммобилизации ферментов, используемых в медицинской практике. В этом плане наиболее перспективен метод иммобилизации ферментов путем включения их в структуру гелей целлюлозы, агарозы, крахмала.

Созданы ртутьсодержащие препараты ферментов путем иммобилизации на меркурированном ацетатом ртути 2-окси-3-аллилоксипропиловом эфире целлюлозы. Такая иммобилизация базируется на взаимодействии ртутьсодержащего целлюлозного препарата с сульфгидрильными группами цистеина. Начиная с 1970 г., шведская фирма «Pharmacia» выпускает широкий ассортимент иммобилизованных ферментов на основе производных агарозы. Среди природных (со)полимеров в качестве матриц для иммобилизации нашли применение также полипептиды и белки.

Иммобилизация лекарственных препаратов на полипептидах и белках оказалась продуктивной для ряда психотропных и противоопухолевых препаратов (Полевая О. Ю. и др., 1976).

Полипептиды и белки (полилизин, фибриноген, альбумин, глобулин) легко проходят через мембраны клеток и тем самым, если они связаны с лекарственным препаратом, обеспечивают более высокую концентрацию его в клетке. Отмечено, что пептидные препараты сарколизина и хлорамбуцила проявляют высокую противоопухолевую активность, увеличивают продолжительность жизни животных с лимфобластозом на 10% и некоторых других форм лейкозов на 80%, а в случае саркомы — на 75—80%. По степени избирательности противоопухолевого действия они существенно не отличаются от немобилизованных препаратов сарколизина, но обладают большей устойчивостью к гидролизу (Родина Л. Б. и др., 1976; Лидак М. Ю. и др., 1976).

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Поведение иммобилизованных лекарственных веществ в организме значительно отличается от поведения немобилизованных. В настоящее время установлено, что иммобилизация лекарственных веществ на полимере позволяет: 1) пролонгировать их терапевтический эффект; 2) усиливать терапевтическое действие иммобилизованного препарата; 3) придавать новые свойства низкомолекулярному лекарству, например способность быть индуктором интерферона (Разводовский Е. Ф., 1976).

Продление действия лекарственных соединений представляет значительный интерес для таких разви-

вающихся направлений медицины, как химиотерапия и заместительная терапия, для которых необходима длительная и постоянная концентрация препарата в биологических средах. Создание дюранных препаратов (депо лекарств) имеет не только медицинское, но и экономическое значение, так как позволяет увеличить стабильность лекарственных веществ в процессе их хранения и применения.

Из трех методов пролонгации лекарственных веществ — уменьшение скорости выделения препаратов из депо, замедления их биотрансформации и торможения всасывания — последний наиболее перспективен. Этот способ, применимый к различным лекарственным формам, наиболее широко используется для создания иммобилизованных форм инъекционных и пероральных препаратов.

Замедления всасывания можно достигнуть путем образования труднорастворимых солей, эфиров, комплексов лекарственных веществ, увеличением вязкости растворителей, созданием микрокристаллических суспензий в водных и неводных растворителях. Именно таким способом получены пролонгированные инъекционные препараты из группы пенициллина — бензилпенициллина новокаиновая соль, экмоновоциллин, бициллины, а также некоторые пероральные сульфаниламиды длительного действия (сульфадиметоксин, мадрибон).

Для замедления биотрансформации наиболее перспективны методы физической иммобилизации лекарств на полимерных носителях, так как они в меньшей степени изменяют структуру, а следовательно, и биологические свойства лекарственных препаратов, включающих высокоактивные ингредиенты. Лекарственное соединение может быть связано с полимерным носителем при помощи межмолекулярных, водородных и координационных связей. В качестве носителей используют сополимеры акриловых кислот, полиэтиленгликоль, ПВП, ПВС, различные ионообменные смолы, а также природные (со)полимеры: декстрины, желатин, гепарин и др. Освобождение лекарственного вещества в организме зависит от рН среды, концентрации биологических низко- и высокомолекулярных электролитов, присутствия различных белков крови, например альбумина.

К настоящему времени пролонгирующее действие синтетических и природных сополимеров изучено более

чем для 6000 лекарственных препаратов (Разводовский Е. Ф., 1976). Наиболее целесообразна иммобилизация на (со)полимерах быстро разрушающихся в организме лекарственных соединений типа антибиотиков, а также лекарств, принимаемых обычно в больших дозах (γ -аминомасляная и γ -аминосалициловая кислоты).

С использованием синтетических и природных сополимеров созданы пролонгированные формы ацетилсалициловой кислоты, новоканна, эфедрин, фенамин, тримеканна, сарколизин, сальсолидин, тубазид, пенициллин и других лекарств. Лечебный эффект этих препаратов оказался аналогичным лечебному эффекту немобилизованного лекарства; время же действия увеличилось в 2—3 раза, причем в ряде случаев выявлено снижение токсичности антибиотиков в результате их иммобилизации на ПВП (Pitha P., Carter W., 1971). Иммобилизация сарколизина на поли-4-винилпиридине позволила получить активный противораковый препарат, обладающий меньшей токсичностью, чем немобилизованный сарколизин. Необходимо отметить, что при пероральном применении синтетические (со)полимеры, используемые в качестве носителей лекарственных веществ, не проявляли токсичности даже в значительных дозах. Однако для решения вопроса о том, какова судьба полимерного носителя в организме, выводится он или накапливается в органах и тканях, каковы отдельные воздействия полимеров на организм, требуются дальнейшие исследования.

Очевидно, что вопросы использования синтетических полимеров в качестве носителей лекарственных веществ тесно связаны с изучением механизмов их распада под влиянием активных сред организма, путем выведения продуктов распада или их дальнейшей трансформации, а также побочных и отдаленных результатов их воздействия на организм. При использовании пролонгаторов лекарственных соединений необходимо учитывать действие не только пролонгированной формы самого лекарственного соединения, но и остающегося в организме полимерного носителя, причем в зависимости от правильности выбора природы и соотношения сомономеров, участвующих в процессе получения сополимеров, сополимерная матрица может давать положительный физиологический эффект. Например, звенья ПВП могут

играть роль детоксикантов, звенья ПВС являются основой для иммобилизации антисептиков (например, йода), звенья, содержащие кислотные и аминогруппы, могут служить центром для иммобилизации различных лекарственных соединений. Физиологический эффект может быть усилен методами целенаправленного распределения мономерных звеньев в цепи сополимеров. Возможность такого синтеза показана в работе К. А. Макарова (1974).

Иммобилизация на синтетических (со)полимерах

При иммобилизации лекарственных соединений на синтетических сополимерах используется широкий набор типов связей (ковалентные, водородные, донорно-акцепторные, межмолекулярные и др.) полимер — лекарственное вещество.

К синтетическим носителям предъявляют весьма жесткие требования. (Со)полимеры должны иметь строго определенную молекулярную массу (полимеры с малой молекулярной массой быстро выводятся из организма, полимеры с высокой молекулярной массой задерживаются в ретикулоэндотелиальной системе и могут блокировать ее. Полимеры не должны содержать остаточных мономеров, характеризующихся повышенной токсичностью; они должны обладать максимальной однородностью (иметь узкое молекулярно-массовое распределение), высокой степенью композиционной однородности, поскольку распределение функциональных групп, участвующих в образовании связей при иммобилизации, должно быть равномерным.

Из физиологически активных (со)полимеров наибольший интерес для целей иммобилизации лекарственных веществ представляют водорастворимые (со)полимеры и, в первую очередь, сополимеры — плазмозаменители. В медицинской практике уже сейчас широко используются (со)полимеры винилпирролидона (ВП) и винилового спирта (ВС). На основе этих же мономеров синтезирован широкий круг сополимеров, где в качестве второго мономера использованы мономеры, содержащие различные функциональные группы: виниламин (ВА), виниламидоянтарная кислота (ВАЯК), малеиновый ангидрид (МА), кротоновый ангидрид (КА), кротоновая кислота (КК). Результаты иммоби-

лизации на этих (со)полимерах некоторых лекарственных соединений приведены в табл. 1.

В опытах *in vivo* и *in vitro* было показано, что тип химической связи полимер — лекарственное вещество (П — Л), а также характеристика (со)полимера влияют на физиологическую активность соединения. Сравнение устойчивости к гидролизу амидной, солевой и эфирной связей полимер — антибиотик в условиях мембранного равновесия выявило, что амидная связь не гидролизуется в нейтральной среде, а солевая и эфирная связи гидролизуются быстро. Поэтому активность полимерных пенициллинов, соединенных солевой и сложной эфирной связями, после гидролиза равна активности низкомолекулярных пенициллинов. Пенициллины же, иммобилизованные при помощи амидной связи, своей антимикробной активностью не проявляют. В литературе имеется указание (Чернов Г. А. и др., 1971), что тип связи П — Л отражается и на степени токсичности препаратов.

Следует, однако, учитывать, что зависимость между типом связи и терапевтическим эффектом индивидуальна для конкретного лекарственного препарата и (со)полимера. Так, ковалентная связь между сополимером ПАСК и ГИИК усиливает антибактериальный и сообщает соединению пролонгирующий эффект, тогда как солевой тип связи между этими противотуберкулезными препаратами и полимером снижает эффект пролонгации. Накопленный клинический опыт по использованию в фармакотерапии природных и синтетических (со)полимеров, а также иммобилизованных препаратов делает, на наш взгляд, возможным обсуждение некоторых общих вопросов, связанных с механизмом их действия.

Макромолекулярная фармакотерапия

Из высокомолекулярных природных соединений широкое применение в качестве лекарственных веществ нашли в первую очередь ферменты. В частности, протеолитические ферменты трипсин и химотрипсин являются ценным вспомогательным средством для разжижения и удаления вязких секретов из дыхательных путей при трахеобронхитах, пневмониях, бронхоэктазах, а также эвакуации гнойных экссудатов при эмпиеме

Иммобилизация на (со)полимерах ВП и ВС некоторых лекарственных препаратов

Сополимерная матрица	Лекарственное вещество	Эффект, достигнутый при иммобилизации
ВП — КА	Парааминосалициловая кислота (ПАСК)	Пролонгирование
	Гидразид изоникотиновой кислоты (ГИИК)	Индукция интерферона
ВП — ВА	ГИИК	Пролонгирование
	Инсулин	Индукция интерферона
ВП — ВА	Адамантиламины	То же
ВП — ВАЯК	ПАСК	Пролонгирование
	Олеандомицин	Индукция интерферона
ВП — ВАЯК	Канамицин	То же
	Амантадин	» »
ВП — ВАЯК	Ремамтадин	» »
ВП	Ацетилсалициловый альдегид	Пролонгирование
ВС — ВА	Леворин	Пролонгирование
	Тетрациклин, пенициллин	Индукция интерферона
ВС — ВАЯК	Олеандомицин	Пролонгирование
	Канамицин	»
ВС — ВАЯК	ПАСК	»
	Амантадин	»
ВС — ВАЯК	Ремамтадин	»
ВП — МА	ПАСК	Пролонгирование
ВС — ВА	Пенициллин	Пролонгирование
ВС	Салициловая кислота	Пролонгирование
	Пелентановая »	Противовоспалительное действие
ВП	Под и другие антисептики	Усиление антибактериального эффекта, стимуляция иммуногенеза
ПВ — ВАЯК	Олеандомицин	Пролонгирование
	Ремамтадин	»
ПВ — ВАЯК	Амантадин	»

плевры и экссудативном плеврите. Эти же препараты способствуют удалению некротизированных тканей и гнойно-фибринозного выпота с пролежней и инфицированных ран. Их противовоспалительное действие используется в комплексной терапии иритов, иридоциклитов, отитов, гайморитов, пародонтоза, остеомиелитов и многих других болезней. Тромболитин (комплекс трипсина и гепарина в отношении 6:1), фибринолизин (плазмин), а также препараты стрептокиназы (в СССР — стрептолиаза, за рубежом — стрептаза) применяются в качестве профилактических и лечебных средств при острых тромбозах, тромбозах и тромбозах коронарных сосудов, сосудов головного мозга, легких, глаза. Значительное место в терапии аденовирусных и герпетических поражений глаз занимает дезоксирибонуклеаза, которая тормозит репродукцию ДНК-содержащих вирусов в пораженных клетках. В последние годы дезоксирибонуклеаза все чаще включается в комплекс лечебных мероприятий при невритах лицевого нерва. Рибонуклеаза используется в качестве дополнительного средства для лечения больных вирусными энцефалитами и менингитами. Были попытки использовать рибонуклеазу и в терапии вирусных гепатитов. Но чаще и более широко нуклеазы применяются с теми же целями, что и протеолитические ферменты, а именно для разжижения гноя и вязких экссудатов, лечения воспалительных процессов в полости рта, верхнечелюстной пазухе, оболочках глаза и пр. Высокой терапевтической активностью обладают препараты гиалуронидазы — лидаза и ронидаза (для наружного применения) — при рубцах различного происхождения, анкилозирующих спондилоартритах, контрактурах и тугоподвижности суставов, тендовагинитах, гематомах и др. Лидаза оказалась перспективным препаратом для лечения распространенных форм склеродермии, бесплодия в результате непроходимости маточных труб, а также травматических поражений периферических нервов и нервных сплетений. В качестве противоопухолевого препарата внедрена в клиническую практику аспарагиназа (краснитин, леуназа), которая применяется для лечения острого лимфобластного лейкоза и других форм гемобластозов, в том числе бласт-ретикулосаркомы с лейкемизацией и др. Широко ис-

пользуются в лечебной практике различные гормоны, мукополисахариды (антикоагулянты типа гепарина), железопроизводные декстранов и альбумина для лечения анемии, γ -глобулины, нуклеиновые кислоты, альбумины, интерферон и др.

Синтетические высокомолекулярные соединения используются в медицине как активные противобактериальные и противовирусные средства, синтетические аналоги природных физиологически активных веществ (грамцидин, окситоцин, инсулин, гепарин и др.), а также в качестве противосиликозных и противофиброзных препаратов.

Эффективность действия биологически активного (со)полимера нередко связана со способом его введения. Так, например, поли-2-винилпиридин-N-оксид ингибирует развитие фиброза при введении его внутривенно, внутрибрюшинно и ингаляционно, но не перорально. Величины требуемых молекулярных масс сополимеров также определяются способами их применения. При пероральном способе они, как правило, выше, чем при инъекционном. Необходимо иметь в виду, что метод введения иммобилизованного лекарственного препарата во многом определяет не только его положительный, но и возможный отрицательный эффект.

Синтетические (со)полимеры являются активными индукторами интерферона. Так, сополимеры акриловых кислот подавляли развитие вируса Менго и везикулярного стоматита, обладали защитным свойством против малярийного паразита. Профилактическое действие по отношению к вирусным инфекциям показали сополимеры малеинового ангидрида с дивиниловым эфиром. Сополимеры винилпирролидона с кротоновой кислотой и малеиновым ангидридом предупреждали гибель животных от клещевого и шотландского энцефалитов; аналогичное действие оказывали сополимеры винилсульфата (Разводовский Е. Ф., 1976).

Необходимо отметить, что все эти сополимеры обладают в той или иной мере полиэлектролитными свойствами. Полиэлектролиты (при их предварительном введении), являясь индукторами интерферона, способны ингибировать развитие вирусов. Период интерферогенной активности полимеров может длиться от нескольких дней до 2 ч перед заражением организма вирусами. Так, гидролизированный полимер дивинилово-

го эфира с малеиновым ангидридом создавал устойчивость у животных к вирусу Менго в течение 60 дней, а полиакриловая кислота — в течение 30 дней. Наиболее эффективными индукторами интерферона являются синтетические полинуклеотиды — полиинозиновая (ПИ) и полицитидиловая (ПЦ) кислоты. Иммунизация ПИ и ПЦ в комплексе с поли-L-лизинном на карбоксиметилцеллюлозе (ПИЦЛК) делает их устойчивыми к ферментативному гидролизу. Препарат ПИЦЛК успешно применялся для лечения тяжелых вирусных заболеваний у приматов, подавлял развитие вируса гепатита, оказался (в сочетании с антирабической вакциной) эффективным средством для профилактики бешенства у зараженных обезьян. При сочетании с вакцинами ПИЦЛК зарекомендовал себя как сильный иммунологический адьювант. Лечение этим индуктором интерферона, как и любым иммобилизованным препаратом, намного дешевле, чем чистым интерфероном. Кроме того, ПИЦЛК активизирует иммунную систему, тогда как интерферон может оказывать иммунодепрессивное действие.

По мнению специалистов для подтверждения предварительных результатов, полученных при лечении отдельных больных, необходимо организовать массовые испытания ПИЦЛК. Являясь эффективным, возможно единственным, оружием клетки против вируса, интерферон быстро разрушается в организме под действием протеолитических ферментов. Для увеличения эффективности действия интерферона предложена его иммобилизация в липосомах. С. Ла-Бонардье, например, готовил липосомы из относительно простых липидных соединений: лецитина, стеариламина и холестерина. Для образования липосом суспензию липидов подвергали ультразвуковой обработке, в результате чего интерферон обволакивался липидной оболочкой. Доказано, что интерферон после этого сохранял биологическую активность и приобретал устойчивость к протеолитическим ферментам.

Методы иммобилизации могут быть эффективно использованы для выделения и очистки интерферона. В работе М. Н. Танга и соавт. (1978) показано, что механизм действия интерферона в клетке основан на его связывании с тРНК аспарагиновой кислоты, фенилаланина, триптофана и валина в клетке. Такая внут-

рикеточная самоиммобилизация повышает устойчивость клеток к вирусной инфекции. Возможно, что интерферон связывается в клетке с вирусной РНК, так как в составе многих вирусных РНК имеются сходные с тРНК клетки последовательность нуклеотидов, которые и узнает интерферон. Исходя из всего изложенного, очевидно, что для выделения и очистки интерферона можно использовать нерастворимые носители с иммобилизованными на их поверхности тРНК.

В отношении механизма противовирусного действия полиэлектролитов нет единого мнения. Очевидно только то, что сначала полиэлектролит реагирует с поверхностью биологической мембраны, где находятся заряженные группы. В дальнейшем возможно взаимодействие полимера с клеточной ДНК, ответственной за образование интерферона.

Тот факт, что блокада репродукции вирусов может осуществляться *in vitro* при непосредственном действии на них полимеров, позволяет предполагать, что полимеры тормозят репродукцию вируса на стадии «раздевания», т. е. освобождения нуклеиновой кислоты вируса от белковой оболочки. Такое действие оказывают поливинилсульфат и другие сополимеры.

Иноногенной активностью обладают не только иноногенные (со)полимеры. Показано, в частности, что (со)полимеры акриламида, не относящиеся к полиэлектролитам, успешно используются для лечения герпеса глаз (Майчук Ю. Ф. и др., 1973).

Высокомолекулярная природа обуславливает физиологическое действие и мышьяковистых сополимеров, которые использовались ранее для лечения сифилиса. Низкомолекулярные аналоги не только не обладают лечебными свойствами, а, наоборот, оказывают токсическое действие на организм.

Отмечено, что с ростом молекулярной массы сополимеров — носителей (от 20 000 до 80 000) увеличивается эффективность пролонгирования лекарства, причем в ряде случаев (иммобилизация оксibenзойных кислот и барбитуратов на поли-N-винил-5-метил-2-оксозолидо-не) возрастает и его активность.

Иноногенные (со)полимеры (полиэлектролиты) широко используются как дезинтоксикаторы.

В результате ряда исследований установлено, что дезинтоксикационное, как и пролонгирующее, действие

сополимеров проявляется, начиная с величины молекулярной массы 7 000. Наиболее эффективны сополимеры с молекулярной массой в пределах 20 000—40 000. С другой стороны, отмечено, что в случае использования сополимеров с молекулярной массой более 40 000, особенно при парентеральном введении, возникает опасность накопления этих сополимеров в организме, главным образом, в фагоцитирующих клетках.

Физиологическая активность отмечена у олигомерных соединений, полученных конденсацией низкомолекулярных продуктов. Так, продукт конденсации формальдегида с салициловой кислотой обладает антибрадикнинной активностью, продукт конденсации формальдегида с мочевиной — антисептической. Подобные олигомеры способны изменять наружную поверхность стенки микобактерий туберкулеза, увеличивая эффективность фагоцитоза.

Данные о влиянии строения высокомолекулярных соединений на их физиологическую активность, так же как и сведения о механизме действия (со)полимерных лекарств, в настоящее время лишь накапливаются. Несомненно, что физиологические эффекты высокомолекулярного соединения зависят от его молекулярной массы, степени полидисперсности, наличия гидрофобных и гидрофильных участков в цепи сополимера, его природы и распределения функциональных ионогенных группировок вдоль цепи.

Нерастворимые синтетические ионообменные материалы могут быть использованы самостоятельно для лечения болезней, связанных с накоплением в организме неорганических ионов. Катионит в солевой форме, введенный в организм при гипернатриемии, вступает в реакцию ионного обмена с тканевой жидкостью. Активные группы смолы связывают избыток ионов натрия, выделяя в раствор эквивалентное количество своего подвижного положительно заряженного иона. При правильном подборе смолы можно добиваться нормализации нарушенного ионного равновесия. Известны успешные попытки использования катионитов, анионитерапевтических средств было малоэффективно.

К синтетическим полиэлектролитам, физиологическое действие которых обусловлено главным образом их макромолекулярной природой, следует отнести по-

лимерные четвертичные соли, полимерные кислоты, полиаммины. Их получают обычно реакциями (со)полимеризации с последующими полимераналогичными превращениями. Полимерные четвертичные соли (продукты алкилирования поливинилпиридина и так называемые ионены) способны селективно нейтрализовать действие гепарина, причем в ряду ионенов антигепариновая активность увеличивается с ростом положительного заряда макромолекулы, иными словами, с уменьшением количества метиленовых групп $-(CH_2)_n-$, разделяющих положительно заряженные четвертичные атомы азота. Так, ионены с $n=2$ или $n=5$ обладают большей антигепариновой активностью и одновременно менее токсичны по сравнению, например, с ионеном полибре-ном, у которого $n=3$ или $n=6$ (Вирник А. Д., 1973).

Полнэлектронные комплексы характеризуются чрезвычайно высокой проницаемостью для воды и растворов малых молекул, причем селективная проницаемость может контролироваться содержанием воды в геле комплекса, его композиционным составом. Селективная проницаемость пленок из этих комплексов в 500 раз выше по сравнению с обычными ионообменными мембранами и в 10 раз выше, чем у целлофана (Илиев И. и др., 1974). Комплексы сильных электролитов обладают высокой биосовместимостью.

Имеются данные о способности полиакриловой и полиметакриловой кислот, а также различных полиамфолитов вступать в кооперативное взаимодействие с белковыми фракциями сыворотки крови. При этом наблюдалась избирательная сорбция отдельных фракций крови, например альбумина и γ -глобулина, в результате образования различных комплексов полиамфолитов с ними. Эти данные были использованы нами для создания тромборезистентных полиамфолитных покрытий на катетерах и канюлях (Макаров К. А. и Зытнер Я. Д., 1979).

По мнению ряда специалистов, в лечении и диагностике многих болезней можно будет использовать процессы образования кооперативных полимер-полимерных комплексов в организме. Имеются работы в этом направлении, касающиеся диагностики и лечения опухолевых заболеваний.

Известно, что поверхность нормальных и опухолевых клеток обладает определенным электрическим зарядом.

Возникновение электростатических связей между синтетическими полиэлектролитами и биополимерами живого организма создает предпосылку для ингибирования роста опухолей. Например, связывание определенным электролитом ферментов, обеспечивающих деление клетки, могло бы замедлить или остановить рост опухоли. Однако и в этом случае возникает необходимость защиты организма от токсического влияния полиэлектролитов, так как они могут действовать как на раковые, так и на нормальные клетки. Было показано, что отрицательные заряды, возникающие на поверхности нормальной и раковой клеток, отличаются по величине, причем опухолевые клетки имеют отрицательный заряд большей величины. По этой причине поликатионы, например ионены, способны селективно реагировать с раковыми клетками, что, по-видимому, можно объяснить большим количеством кислых групп на поверхности опухолевой клетки по сравнению со здоровой. На основании этих представлений было предложено использовать ионены для диагностики некоторых видов рака.

Однако не все поликатионы оказывают противоопухолевое действие. Так, среди трех полимеров,— полиэтиленimina, поливинил-4-бутилпирина и полигексаметиленгуамидина — противоопухолевые свойства были выявлены только у полиэтиленimina. Наряду с этим было показано, что противораковое действие свойственно не только поликатионам, но и полианионам. Впервые этот факт был обнаружен при изучении гепарина, затем при исследовании натриевой соли полиэтиленсульфо кислоты с молекулярной массой 15 000—35 000; при этом удалось верифицировать ее противораковый эффект на разных видах клеточных культур. Специальные исследования (со)полимеров акриловой кислоты и малеинового ангидрида (чистых, гидролизованных и в амидокислотной форме) подтвердили данные о противораковой активности различных ионитов.

Таким образом, противоопухолевой активностью обладают как поликатионы, так и полианионы, и не исключено, что максимальные лечебные свойства будут иметь амфолиты соответствующей структуры. При создании таких препаратов необходимо стремиться увеличить избирательные противоопухолевые свойства, регулируя длину макромолекулы сополимера, содержа-

ние и расположение функциональных групп вдоль его цепи. Достигнуть этого можно на основе разработки методов направленного синтеза сополимеров заданного состава и строения с использованием ЭВМ (Макаров К. А., 1974).

СОВМЕСТНАЯ ИММОБИЛИЗАЦИЯ

Совместная иммобилизация различных биологически активных соединений является новым и перспективным методом создания иммобилизованных препаратов. В основе совместной иммобилизации лежат процессы статистической или привитой сополимеризации, достаточно хорошо разработанные в настоящее время в химии высокомолекулярных соединений. Совместная иммобилизация может осуществляться следующими путями.

1. (Со)иммобилизация в структуре гелей осуществляется методом синтеза или сшивки функциональных (со)полимеров (акриламид, виниловый спирт, виниламин) в присутствии различных иммобилизуемых соединений, например фермента и антисептика, фермента и антибиотика, антибиотика и антисептика и т. д. Так, для создания противоожоговых пленок, когда целесообразно и клинически оправданно совместное применение протеолитических ферментов и антисептиков, нами проведена совместная иммобилизация гидролитина и фурацилина (Макаров К. А. и др., 1976). В качестве матрицы для иммобилизации использовали тонкие (10—20 мкм) медицинские пленки на основе полиэфирных смол и сополимеров винилхлорида. Иммобилизацию антисептика и фермента проводили путем включения биоактивных молекул в структуру полимерного геля на основе ПВП и его сополимеров с акриловыми мономерами.

С этой целью предварительно активировали поверхности исходной пленки химическими или физико-химическими методами, затем осуществляли сополимеризацию в присутствии антисептика, фермента или их сочетания.

В предварительных опытах оценивали возможности сочетания фермента гидролитина с рядом антисептиков и антибиотиков, а также изучали их стабильность в модельных системах, воспроизводящих процесс получения биоактивной пленки. На основании полученных

данных подбирали оптимальные условия, позволяющие проводить иммобилизацию в диапазоне температур от 10 до 20° С.

Полученные пленки испытывали на биологическую активность методом наложения на агар и на агаризованный казенн соответствующей микробной тест-культуры. Оценку активности проводили по зонам просветления, которые сравнивали с контрольными. Испытание полученных пленок в эксперименте показало возможность и перспективность их использования в качестве противоожоговых повязок.

2. Комплексная соиммобилизация состоит в синтезе двойных (а если необходимо, то и многокомпонентных) сополимеров, содержащих активные центры, способные образовывать комплексные соединения с иммобилизуемыми веществами. Сопolíмеры винилового спирта, например, могут быть использованы для комплексной иммобилизации йода и антибиотиков (Хегинашвили Г. Г. и др., 1979). Рядом исследований показано, что действие системы антибиотик + йодополимер дает значительно более высокий терапевтический эффект, чем действие одного антибиотика (Шувалова Е. П., 1962, 1964, 1979; Кашкин П. Н. и др., 1970; Фаворский М. С. и др., 1975). Сопolíмеры акриламида и винилпирролидона могут быть использованы для соиммобилизации антисептика и анестетика (Аркадьева Г. Е. и др., 1979). Показано, что при взаимодействии новокаина и (со)полимеров винилпирролидона образуется комплекс, препятствующий всасыванию новокаина из места введения и усиливающий эффект местной анестезии. Сроки пролонгации при этом достигали 6—7 сут после однократного введения препарата.

3. Статистическая соиммобилизации заключается в получении исходных соединений иммобилизуемых веществ с мономерами и их последующей сополимеризацией. Так, виниловые производные ферментов могут вступать в сополимеризацию с виниловыми производными антибиотиков или антисептиков. Исходные мономеры, например акриловые, могут быть соединены с иммобилизуемыми антибиотиками или ферментом при помощи ковалентных связей.

Перспективность рассмотренных методов соиммобилизации заключается в том, что, используя теорию и методы, разработанные для процессов сополимеризации

(Макаров К. А., 1974), можно точно варьировать природу, количество и распределение вдоль сополимерной цепи сомономерных звеньев, ответственных за тот или иной положительный физиологический эффект. Это в свою очередь открывает широкие возможности для изучения фармакологических эффектов, обусловленных как природой иммобилизуемых соединений, так и присутствием самой макромолекулярной цепи. Так, например, иммобилизация уреазы на сополимерах винилпирролидона позволяет эффективно использовать дезинтоксикационные свойства этого полимера. ПВП связывает токсины в кровяном русле и выводит их через почки. Его диуретическая активность обусловлена усилением почечного кровотока и повышением клубочковой фильтрации при интоксикации в связи с устранением стаза в капиллярах (Алюшин М. Т. и др., 1976).

Значительные перспективы открываются при соиммобилизации лекарственных соединений в структуре (со)полимерных гелей, формирование которых происходит непосредственно внутри патологического очага ткани или органа. Так, увеличения эффективности цитостатических препаратов (а возможно, и уменьшения метастазирования) можно достигнуть путем введения цитостатика в опухоль в смеси с акриламидом и низко-температурным инициатором. В эксперименте была изучена иммобилизация анестетика (тримеканна) в процессе формирования акриламидного геля путем введения в шприце смеси акриламида, тримеканн $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ и аскорбиновой кислоты (Аркадьева Г. Е. и др., 1979). В результате образования в месте введения рассасывающегося акриламидного депо тримеканна анестезирующий эффект его значительно увеличивался. Иммобилизация различных биологически активных соединений (йод, антибиотик, анестетик, цитостатик и др.) проводилась в процессе получения геля ПВС путем одновременного введения в одну область в разных шприцах ПВС, борной кислоты и соответствующего иммобилизуемого соединения. Разработка йодных комплексов для создания антисептических покрытий на коже осуществлялась путем иммобилизации йода на тройном сополимере винилпирролидона — метилметакрилата и бутилакрилата. При этом йод вводился в процессе получения сополимерных гранул. Путем изменения соотношений мономеров были получены пре-

параты, содержащие от 8,7 до 16 мкг/л йода, обладающие высокой антисептической и антибактериальной активностью (Терещенко Г. П. и др., 1979).

Значение разработки и применения иммобилизованных антибактериальных препаратов состоит и в том, что инфекционные болезни продолжают занимать значительное место в структуре общей заболеваемости во всем мире. Если учесть также все случаи заболеваний, не относящихся к собственно инфекционным болезням, но имеющих инфекционную природу (сепсис, остеомиелиты, флегмоны, гломерулонефриты, ревматизм и др.), то значение инфекций в патологии человека еще велико. По мнению О. В. Барояна, не менее 60% общего числа смертных случаев обусловлены болезнями инфекционной природы, и, следовательно, в мире от них ежегодно умирает 7—8 млн. человек. Рациональная терапия инфекционных заболеваний направлена на санацию очагов инфекции, дезинтоксикацию и стимуляцию иммунологической реактивности организма. Спектр лекарственных средств, применяемых в настоящее время в инфекционной патологии, чрезвычайно широк, но далеко не всегда врачу удается добиться быстрого и полного выздоровления больного. Особенно это относится к вирусным болезням, при которых антибактериальные средства неэффективны, а известные противовирусные препараты оказывают вспомогательное и профилактическое действие. С другой стороны, использование антибактериальных средств привело к нежелательным и опасным последствиям антибактериальной, в первую очередь, антибиотической терапии. Достаточно упомянуть нарастание резистентности и полирезистентности микробов (вплоть до полной потери чувствительности, например у большинства так называемых госпитальных штаммов стафилококков) к антибиотикам, селекцию устойчивых возбудителей, дисбактериоз, повреждение некоторых органов и систем в процессе химиотерапии, в частности угнетение в ряде случаев функции иммунокомпетентной системы, развитие неспецифической сенсibilизации, возникновение эндогенных, смешанных инфекций, а также суперинфекций.

Более перспективной в преодолении отрицательных последствий антибактериальной терапии может быть модификация антибактериальных средств методами их (со)иммобилизации на различных (со)полимерных но-

сителях. (Со)полимеры в зависимости от требований способны снижать или повышать растворимость лекарственных средств, пролонгировать их действие, что позволяет длительное время поддерживать терапевтические концентрации препаратов во внутренних средах и тканях организма, уменьшать дозы и частоту введений лекарств, защищать ткани от раздражающего действия на них применяемых препаратов и, наоборот, предохранять лекарственные средства от разрушающего действия биологических сред (например, кислого содержимого желудка и щелочного — верхних отделов тонкой кишки), препятствовать их инактивированию в результате связывания белками крови, адсорбировать токсические вещества, индуцировать выработку интерферона и т. д.

Рассмотрение этого, даже неполного, перечня положительных свойств полимеров показывает, что с их помощью можно корригировать многие или большинство побочных и негативных эффектов антибактериальных препаратов. Между тем в настоящее время иммобилизация применяется главным образом для стабилизации и пролонгации химиотерапевтических средств.

Создание иммобилизованных антибактериальных средств для перорального введения и их изучение показало сохранение антимикробной активности и спектра их антибактериального действия (Шувалова Е. П., 1964). Кроме того, доказано, что иммобилизованный на ПВП пенициллин при однократном введении циркулирует в крови экспериментальных животных в течение 24 ч, а стрептомицин — 72 ч, т. е. в 3—4 раза дольше, чем водные растворы этих антибиотиков. Таким образом, получены обнадеживающие результаты о пролонгации действия иммобилизованных пенициллина и стрептомицина, однако до сих пор эти препараты находятся в стадии доклинических испытаний и в медицинскую практику еще не внедрены.

ОСОБЕННОСТИ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ БИОПРЕПАРАТОВ

Иммобилизация биологически активных соединений в значительной мере изменяет их свойства. Особенно сильно она отражается на свойствах сложных белков.

Иммобилизация, как правило, увеличивает устойчивость ферментных белков к температурным изменениям, денатурирующим агентам, действию микроорганизмов. Часто у ферментов, подвергшихся иммобилизации, изменяется специфичность к субстрату. Иммобилизованные ферменты при расщеплении субстратов могут давать другие продукты, чем те же ферменты, находящиеся в растворе. Может изменяться и скорость гидролиза субстратов иммобилизованными ферментами.

Иммобилизация обычно приводит к снижению активности закрепленных ферментов. При этом уменьшение активности колеблется от нескольких процентов до нескольких десятков процентов по сравнению с активностью ферментов, находящихся в свободном состоянии в растворе. Большое влияние на свойства иммобилизованных ферментов имеет тип и характер матриц, или носителей, используемых для иммобилизации. Характер матриц часто оказывает решающее воздействие на активность, стабильность и специфичность ферментов. По-видимому, для многих ферментов можно подобрать соответствующие матрицы, иммобилизация на которых позволит получать препараты с оптимальными свойствами.

Одним из факторов, влияющих на стабильность иммобилизованных соединений, является микроокружение, в котором находится иммобилизованный биопрепарат (Березин И. В. и др., 1976). Присутствие в среде, окружающей фермент, ионов металлов, особенно тяжелых, может инактивировать ферменты, присутствие же

инертных белков (например, альбумина) увеличивает стабильность иммобилизованных ферментов. Так, пероксидаза, иммобилизованная включением в полиакриламидный гель, в присутствии альбумина обладает значительно более высокой стабильностью, чем пероксидаза без альбумина. Белковое окружение (из инертного белка), как правило, защищает фермент от инактивирующего воздействия среды.

К другим факторам, способным повысить стабильность иммобилизованных ферментов, можно отнести увеличение жесткости белковой молекулы, а также экранирование функциональных групп фермента.

Как правило, при иммобилизации стабильность фермента повышается. Изменение стабильности иммобилизованных препаратов может быть вызвано также физико-химическими изменениями свойств используемых для иммобилизации матриц. Так, при ковалентном связывании β -галактозидазы с целлюлозой стабильность фермента тем выше, чем меньше размеры частиц носителя, но при значительном уменьшении частиц носителя они могут вымываться из среды, и это приводит к падению стабильности фермента.

Особенно важна в практическом отношении температурная стабильность ферментов. В результате ковалентного связывания ферментов с полимерными носителями термостабильность ферментных препаратов, как правило, повышается. Так, увеличение термостабильности показано для лактатдегидрогеназы (носитель — ДЭАЭ-целлюлоза), фицина (носитель — карбоксиметилцеллюлоза), папаина и трипсина, иммобилизованных на пористом стекле, глюкозооксидазы (носитель — целлофан и окись никеля). Следует, однако, отметить, что характер носителя оказывает определенное влияние на термостабильность. Так, папаин, иммобилизованный на стекле, обладает повышенной термостабильностью, тогда как папаин, связанный с сополимером лейцин-р-аминофенилаланина, менее термостабилен, чем свободный фермент в растворе. Понижение термостабильности при иммобилизации наблюдается также для щелочной фосфатазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.

Важна также стабильность иммобилизованных био-препаратов при воздействии денатурирующих агентов. Трипсин, находящийся в растворе, денатурируется 8М раствором мочевины, в то время как трипсин, кова-

лентно связанный с сополимером малеинового ангидрида и этилена, при обработке мочевиной сохраняет большую часть своей активности. Папаин в растворе полностью инактивируется 6М раствором мочевины, тогда как иммобилизованный папаин при обработке мочевиной сохраняет активность (Westall H. H., Mason R. D., 1973).

Н. Н. Угарова и Б. М. Кершенгольц (1974) изучали влияние иммобилизации на стабильность и активность окислительных ферментов. Показано, что иммобилизация пероксидазы в гелях полнакриламида существенно повышает устойчивость фермента к воздействию денатурирующих агентов. Активность иммобилизованной пероксидазы в значительной степени зависит от структуры и концентрации геля и от химической природы полимерной матрицы.

По-видимому, механизм устойчивости биопрепаратов к действию денатурирующих агентов и высокой температуры в основном одинаков и обусловлен увеличением жесткости макромолекул.

На стабильность биопрепаратов оказывают влияние микроорганизмы. При иммобилизации в пористых носителях или микрокапсулах, размер пор которых меньше размеров бактериальной клетки, молекулы биопрепарата становятся недоступными для микроорганизмов; при этом необходимо, чтобы носитель, выбранный для иммобилизации, также был устойчив к действию микроорганизмов. Поэтому неорганические носители имеют значительные преимущества перед органическими.

Важно, чтобы ферментные препараты были стабильными при хранении. Обычно ферменты сравнительно быстро теряют свою активность при хранении даже в условиях пониженных температур. Иммобилизация ферментов в большинстве случаев повышает их стабильность при хранении. Показано, что для большинства ферментов можно найти соответствующий носитель, на котором фермент почти полностью сохраняет свою активность при хранении при 4°С в течение нескольких недель, а иногда и месяцев.

В результате иммобилизации у ферментов в ряде случаев может появиться особая субстратная специфичность, отличающаяся от специфичности тех же ферментов, находящихся в свободном состоянии в растворе. Изменение субстратной специфичности может

быть вызвано влиянием носителя, различной доступностью молекул фермента для субстратов с разной молекулярной массой, диффузионными факторами и другими причинами. Например, протеолитические иммобилизованные ферменты при расщеплении полипептидной цепи дают иные пептидные фрагменты, чем те же ферменты, но находящиеся в свободном состоянии в растворе. Иммобилизованные амилазы образуют при гидролизе крахмала больше низкомолекулярных продуктов, чем свободный фермент.

Специфичность фермента может изменяться также в результате его химической модификации, вызванной иммобилизацией. Так, модификация каталазы глутаровым альдегидом значительно уменьшает ее активность; в то же время аналогичная модификация пероксидазы увеличивает активность этого фермента (Heggo V., Fahimi H. D., 1974). Иммобилизованная на стекле дезоксирибонуклеаза и дезоксирибонуклеаза, находящаяся в растворе, расщепляют ДНК на различные нуклеотиды. Иммобилизованный трипсин расщепляет миозин значительно медленнее, чем свободный, и лишь на 22%, тогда как трипсин в растворе проводит расщепление миозина на 45% и по другим пептидным связям. Отмеченные различия в поведении свободных и иммобилизованных ферментов связаны, по-видимому, с конформационными препятствиями при подходе субстратов к активным центрам иммобилизованных ферментов.

Различное поведение свободных и иммобилизованных ферментов наблюдается также и по отношению к высокомолекулярным субстратам и ингибиторам. Иммобилизованные ферменты обычно имеют относительно высокую каталитическую активность по отношению к низкомолекулярным субстратам и практически теряют активность по отношению к высокомолекулярным субстратам. Например, трипсин, иммобилизованный на силикагеле, расщепляет этиловый эфир N-бензоил-L-аргинина в 3 раза медленнее фермента, находящегося в свободном состоянии, и совсем не гидролизует казеин. Подобным же образом иммобилизованный политирозил-папаин расщепляет казеин только на 30% по сравнению с его активностью по отношению к низкомолекулярным субстратам. В работе с иммобилизованными производными фицина, трипсина- α -химотрипсина папаина и субтилопептидазы А показано снижение активности иммо-

билизированных ферментов, что, по-видимому, может быть объяснено пространственными препятствиями при диффузии субстратов к иммобилизованному ферменту.

Ингибирование иммобилизованного трипсина белковыми ингибиторами уменьшается с увеличением их молекулярной массы. При действии на трипсин (иммобилизованный на сополимере этилена и малеинового ангидрида) высокомолекулярного ингибитора (мол. м. 22 000) он ингибируется на 92%, при действии же белком с молекулярной массой 6500 совершенно не ингибируется.

В работе R. J. Knights и A. Light (1974) показано, что частичное ингибирование высокомолекулярными ингибиторами и понижение активности по отношению к субстратам с большими молекулярными массами также вызваны пространственными причинами. Например, эстеразная активность иммобилизованного на сефарозе трипсина снижается белковыми ингибиторами только на несколько десятков процентов, тогда как его протеазная активность угнетается полностью.

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДЫ МАТРИЦЫ НА СВОЙСТВА ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

На свойства иммобилизованных ферментов значительное влияние оказывает физическая и химическая природа используемой матрицы. Большое значение имеют механическая прочность матриц, их стабильность, способность к набуханию, гидрофильность или гидрофобность, наличие заряда на поверхности. Химическая природа матрицы влияет на величину возможной неспецифической сорбции белков на матрице.

Особенно повышенная неспецифическая сорбция наблюдается в случае поверхностно-заряженной матрицы, имеющей свободные заряды на поверхности своего каркаса. Большое значение здесь могут иметь ионные и водородные связи. Специфические ионные эффекты играют определенную роль, например, при аффинной хроматографии, что было показано на примере одной из аминоксидотрансфераз (Shaltiel S. et al., 1974). Величина частиц носителя, или матрицы, также может иметь существенное значение при иммобилизации. Обычно, с уменьшением размеров частиц носителя увеличивается количество ковалентно связанного с ним иммобилизованного фермента.

По-видимому, иногда матрица может влиять на стабильность фермента, противодействуя разворачиванию белковой глобулы и тем самым препятствуя денатурации иммобилизованного фермента. Эта особенность иммобилизованных белков, т. е. различная устойчивость к денатурирующим агентам в зависимости от природы матрицы, показана на примере трипсина. Трипсин, иммобилизованный на сефадексе с помощью бромистого циана, сохраняет до 80% первоначальной каталитической активности при обработке его 8М раствором мочевины, тогда как трипсин, иммобилизованный на агарозе тем же методом, при обработке теряет активность полностью (Gabel D., Rogath J., 1972). Этот пример достаточно ярко демонстрирует влияние природы матрицы на свойства фермента. Иногда связи молекулы фермента с матрицей способствуют восстановлению активной трехмерной структуры иммобилизованного белка.

В процессе иммобилизации ферментов важно получить препарат, сохраняющий значительную долю первоначальной активности. Коэффициент активности (K) иммобилизованного препарата фермента часто рассматривают как отношение:

$$K = \frac{A_{\text{имм.}}}{A_{\text{раств.}}}$$

где $A_{\text{имм.}}$ — удельная активность иммобилизованного фермента;

$A_{\text{раств.}}$ — удельная активность фермента, находящегося в свободном состоянии в растворе.

В большинстве случаев для иммобилизованных ферментов величина коэффициента активности меньше единицы. В некоторых случаях, однако, было показано увеличение первоначальной активности для иммобилизованных ферментов. В определенной степени это увеличение, вероятно, связано с природой матрицы, используемой для иммобилизации. Пример такого рода — увеличение суммарной активности иммобилизованной системы из трех ферментов (β -галактозидазы, гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы), ковалентно связанных с сефадексом, показан в работе В. Mattiasson и К. Mosbach (1971). Увеличение активности в данном случае объясняется, по-видимому, тем, что продукты первой реакции ферментной системы имеют возможность легко проникать к активным центрам ферментов, осуществляющих последующие реакции.

Увеличение исходной активности иммобилизованных ферментов может происходить в связи с возможностью легкого проникновения молекул субстрата к фиксированному на матрице ферменту.

Снижение удельной активности иммобилизованных ферментов может быть результатом химической модификации отдельных групп активного центра фермента, возможного экранирования, препятствующего проникновению субстрата к ферменту, изменения конформации белковой молекулы, ухудшающей контакт между молекулами субстрата и иммобилизованным ферментом. При иммобилизации ферментов часто наблюдается определенная зависимость фиксированных ферментов от рН среды. Ферментативная активность зависит от рН среды, от природы и характера используемых для иммобилизации матриц. Большое значение при этом имеет наличие у матриц электростатического поля, существование которого приводит к тому, что концентрации водородных ионов вблизи матрицы и в свободном растворе отличаются друг от друга. Концентрация водородных ионов около отрицательно заряженной матрицы выше, а вблизи положительно заряженной — ниже, чем в собственном растворе.

При иммобилизации ферментов может происходить сдвиг оптимума рН. Сдвиг его в кислую сторону наблюдается для протокатехинатдиоксигеназы, уреазы, пенициллинамидазы, в щелочную сторону — для липоксигеназы, эластазы, инвертазы. При низких значениях ионной силы оптимум рН трипсина, иммобилизованного на поланионной матрице, сдвигается в щелочную сторону; при больших значениях ионной силы оптимум рН для иммобилизованного и для неиммобилизованного фермента практически одинаков. При иммобилизации ферментов на матрицах, лишенных заряда, сдвига оптимума рН вообще не происходит.

Сдвиг оптимума рН объясняется разными его величинами у активного центра фермента и в окружающем растворе. На различие в значениях рН оказывают влияние заряд матрицы, изменение заряда субстрата в процессе его превращений, диффузии субстрата и продуктов реакции, изменение суммарного заряда белка при его иммобилизации и некоторые другие причины.

При иммобилизации часто меняется и форма кривой рН-зависимости. Расширение интервала рН наблюда-

лось для адсорбированной сукцинатдегидрогеназы, а также для ковалентно связанных с носителем ацетилхоллинэстеразы, энолазы, проназы, аденозиндезаминазы. Сужение этого интервала имеет место для ковалентно связанных папаниа, инвертазы, аспарагиназы, пенициллин амидазы и адсорбированной глюкоамилазы.

Таким образом, влияние природы матрицы на свойства иммобилизованных препаратов зависит как от природы матрицы, так и от характера иммобилизации (химическая или физическая иммобилизация). Неорганические матрицы, обладающие большей механической прочностью, стабильностью к воздействию различных сред и незначительным зарядом, в меньшей степени влияют на активность иммобилизуемых соединений.

Органические матрицы, применяемые для иммобилизации биологически активных соединений (особенно методом химической иммобилизации) в большой степени влияют на активность иммобилизованных веществ и в первую очередь ферментов.

**ПРИМЕНЕНИЕ
ИММОБИЛИЗОВАННЫХ БИОПРЕПАРАТОВ
ДЛЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ И ПРЕПАРАТИВНЫХ ЦЕЛЕЙ
В МЕДИЦИНЕ**

**ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ БИОПРЕПАРАТОВ
В БИОХИМИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ
И ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ**

Иммобилизованные ферменты используются в настоящее время для определения содержания мочевины в биологических жидкостях. В качестве фермента применяют иммобилизованную уреазу. Носителями служат силикагели, пористое стекло, полиакриламид, нейлон, триацетилцеллюлоза, сефароза и некоторые другие материалы. Количество мочевины определяют по содержанию выделившегося во время реакции аммиака или по изменению рН раствора. Н. Filippusson и соавт. (1972) показали, что уреазы, связанная с внутренней поверхностью нейлоновой трубки (диаметром 1 мм и длиной 2000 мм) при помощи глутарового альдегида, может «работать» непрерывно в течение 4 мес.

В дальнейшем был предложен прибор для определения мочевины в сыворотке крови с помощью иммобилизованной уреазы, позволяющий проводить массовые анализы (Watson B., Koyes M. H., 1976). Принцип работы прибора состоит в том, что уреазу, ковалентно связанную с гидроокисью алюминия, помещают в колонку, куда при помощи микрошприца вводят сыворотку крови (20 мкл). Мочевина, находящаяся в сыворотке и подлежащая определению, подвергается гидролизу с образованием хлористого аммония. После элюирования хлорида аммония из колонки элюент смешивают с раствором едкой щелочи; количество выделившегося при этом свободного аммиака определяют на газово-проточном аммиачном электроде. Результаты определения мочевины этим способом совпадают с данными, полученными другими методами. Иммобилизованная на гидроокиси алюминия уреазы может храниться без потери активности почти 3 мес при температуре от 0 до 5°С.

Производительность прибора — до 1 000 анализов на одной колонке.

Довольно широко применяются также иммобилизованная на нейлоне уратоксидаза для определения мочевой кислоты в водных растворах и биологических жидкостях (Filipusson H. et al., 1972). Этим методом можно определить концентрацию мочевой кислоты с точностью до 10^{-5} — 10^{-4} моль.

Для определения содержания глюкозы в крови используется иммобилизованная глюкозооксидаза (Hicks G. P., Urdike S. J., 1966). В этом случае применялись колонки, заполненные полиакриламидным гелем с включенной в гель глюкозооксидазой. Определение глюкозы основано на образовании перекиси водорода в результате окисления углевода. Перекись водорода количественно определяется спектрофотометрически при помощи цветного реагента, изменяющего свой цвет (до синего) в присутствии другого фермента — пероксидазы.

В состав реагента входит 20 мг о-толидина и 0,8 мг пероксидазы в ацетатном буферном растворе. Глюкозооксидазный метод может быть применен для массовых анализов крови на сахар и использован с целью автоматических определений в клинических лабораториях. В работе Weibel и соавт. (1973) определение глюкозы с помощью иммобилизованной глюкозооксидазы основано на оценке количества кислорода в испытуемой жидкости. В качестве носителя фермента применялось пористое стекло, поверхность которого была модифицирована при помощи аминопропил-триэтоксисилана. Глюкозооксидаза связывалась со стеклом ковалентно. Для определения глюкозы этим методом был предложен специальный аппарат, состоящий из трех частей: смесителя, реактора (небольшой колонки с иммобилизованной глюкозооксидазой) и детектора (покрытого мембраной кислородного электрода) для определения растворенного в жидкости кислорода. При определении глюкозы энзиматическим методом важно не загрязнить глюкозооксидазу примесью каталазы. Поэтому препараты глюкозооксидазы, используемые для иммобилизации, должны быть тщательно очищены.

Показана возможность проведения автоматических анализов испытуемых растворов на содержание в них глюкозы и мочевины (Inman D. J., Hornby W. F., 1972).

Глюкозооксидаза для определения глюкозы и уреазы, для выявления мочевины была ковалентно соединена при помощи глутарового альдегида с внутренней поверхностью нейлоновой трубки. В качестве носителя авторы использовали также порошок из нейлона и нейлоновые мембраны. Определение глюкозы и мочевины проводилось в специальном анализаторе, включающем резервуар для проб, насос, реактор с иммобилизованным ферментом и диализатор. Оценка конечных продуктов осуществлялась спектрофотометрически. Система достаточно стабильна и может работать в течение месяца, анализируя тысячи проб биологических жидкостей на содержание глюкозы и мочевины.

В заключение укажем еще на два метода определения глюкозы с помощью иммобилизованных ферментов, опубликованные в последнее время и основанные на применении проточных анализаторов. В одном из этих методов, предложенном L. P. Leon и соавт. (1976), используется проточная аналитическая система с применением иммобилизованной глюкозооксидазы и пероксидазы. Носитель — нейлоновая трубка, на внутренней стороне которой находится ковалентно связанный с носителем фермент. Другой метод определения глюкозы, также использующий проточный аналитический прибор, основан на совершенно другом принципе (Bowens L. D., Cagg P. W., 1976). Аналитический прибор содержит иммобилизованную ковалентно на пористом стекле гексокиназу, катализирующую реакцию фосфорилирования глюкозы в присутствии АТФ. При этом происходит изменение энтальпии (теплосодержания) системы и повышение температуры за счет теплового эффекта энзиматической реакции (примерно на 18 ккал/моль). Энтальпиметрический анализатор регистрирует величину изменения температуры. Ошибка метода составляет около 5%, а его результаты близки к результатам определения глюкозы, полученным при помощи других методов. Оба метода могут быть использованы для массовых определений глюкозы в сыворотке крови в условиях клинических лабораторий.

Отмечено, что при некоторых опухолях пищеварительного тракта может изменяться содержание лактозы в моче. Лактозу в этих случаях можно определить с помощью иммобилизованной лактазы (Stasiw R. O., 1972). Лактаза ковалентно связывается с полосками

диэтиламиноэтилцеллюлозы. Количество фермента, удерживаемое полоской размером 1×5 см, равно приблизительно 0,5 мг. Активность иммобилизованного фермента составляет 56% от активности лактазы в свободном состоянии. Метод позволяет быстро определить концентрацию лактозы в моче.

Нередко в клинической практике необходимо определить содержание пировиноградной и щавелевоуксусной кислот, а также этанола в биологических жидкостях. В этих случаях предложено использовать иммобилизованные ферменты (Hornby W. F. et al., 1972). Система давала хорошие показатели в следующих границах концентраций: для пирувата 0,04—0,20 ммоль, для оксалатацетата 0,02—0,16 ммоль, для этанола 10—100 ммоль, и при этом обладала достаточной стабильностью для проведения 800—1000 анализов, тогда как эти ферменты в растворе теряют активность на 90% за тот же период времени. При заболеваниях печени и некоторых других болезнях наблюдается значительное увеличение содержания молочной кислоты в крови. Обычные методы обнаружения достаточно трудоемки. Показано, что возможно определять содержание молочной кислоты в крови при помощи иммобилизованной лактатдегидрогеназы (Hicks G. P., Urdike S. J., 1966). Лактатдегидрогеназу иммобилизовали включением фермента в полиакриламидный гель. Авторы разработали колонки, в которые помещали иммобилизованный фермент, пробы крови, а также никотинамидадениндинуклеотид (НАД). В результате энзиматической реакции происходило редуцирование НАД в НАД·Н₂. Концентрацию НАД·Н₂ измеряли с помощью 2,6-дихлорфенолиндофенола.

Определять пенициллины в биологических средах в растворах можно при помощи иммобилизованной пенициллиназы (Rusling J. F. et al., 1976). Метод основан на гидролизе пенициллина пенициллиназой, ковалентно связанной с пористым стеклом. Образующаяся при этом пенициллановая кислота определяется потенциметрически. Авторы использовали колонки с иммобилизованным ферментом. В интервале концентраций пенициллина 0,08—0,50 ммоль наблюдалась линейная зависимость между показаниями потенциометра и содержанием антибиотика в среде. Система стабильна и не теряет активности в течение 8 мес при 5°C. Оптимум pH иммо-

билизованного фермента лежит около 7,0, тогда как нативный фермент имеет оптимум рН 6,5. Метод может быть использован для быстрого определения пенициллина в фармацевтических препаратах и в ферментационной среде. В последнее время для аналитических целей с использованием иммобилизованных ферментов были предложены высокоэффективные реакторы в виде колонок с регистрацией продуктов реакции спектрофотометрическим или флюорометрическим методом. Отмечено, что использование таких колонок с иммобилизованными ферментами значительно производительнее и эффективнее, чем тех же ферментов, но находящихся в растворе (Cremonesi P., Bovaga R., 1976).

Необходимо указать и на применение в медицине иммобилизованных полиферментных систем. Они состоят из двух или нескольких ферментов, которые, будучи закрепленными на носителе, взаимодействуют таким образом, что продукт одной ферментативной реакции является субстратом для последующей. Подобная последовательная цепочка реакции может осуществляться только при определенном взаимно ориентированном положении ферментов на носителе. Показана высокая эффективность иммобилизованных полиферментных систем. Так, совместно иммобилизованные гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа способны достигать стационарного равновесия за более короткий промежуток времени, чем те же ферменты в растворе. Эффективность полиферментной иммобилизованной системы, состоящей из трех ферментов: малатдегидрогеназы — цитратсинтетазы — лактатдегидрогеназы, значительно выше, чем отдельных ферментов в растворе (Stere P. A. et al., 1973). При добавлении же в систему пировиноградной кислоты наблюдалось четырехкратное увеличение скорости ферментативной реакции. Повышение эффективности реакции для глюкозооксидазы и каталазы, совместно иммобилизованных на пористом титане, показано в работе R. A. Messing (1970).

Для системы совместно иммобилизованных ферментов, имеющих разные оптимумы рН, иногда наблюдается смещение оптимума рН по сравнению с ферментами, находящимися в растворе. Величина смещения определяется относительной активностью иммобилизованных ферментов и количественными соотношениями отдельных компонентов ферментативной реакции. Большое

значение при катализе иммобилизованными ферментными системами имеет диффузия. Увеличение суммарной активности полиферментных ансамблей, по-видимому, можно объяснить уменьшением диффузии при закреплении и связывании ферментов в систему по сравнению со свободными ферментами в растворе. Иммобилизованные полиферментные системы, фиксированные в определенной последовательности по отношению друг к другу, могут служить моделью для изучения регуляции активности ферментов в живых системах, а также в исследованиях, связанных с изучением клеточных мембран.

Иммобилизованные ферменты постепенно внедряются в практику для оценки загрязнения окружающей среды токсическими веществами. В частности, использование иммобилизованных холинэстераз для определения фосфорорганических или карбаматных ингибиторов ферментов основано на выявлении ингибирующей способности этих соединений по отношению к холинэстеразам. Особенно большая чувствительность метода достигается, если субстрат содержит какой-либо флюоресцирующий индикатор. В качестве субстратов L. H. Goodson и соавт. (1973) применяли 2-нафтилфосфат и 2-нафтил-ацетат. Далее проводили флюорометрическое определение продуктов реакции, что позволило вести непрерывное наблюдение за наличием в воде или воздухе антихолинэстеразных веществ. Метод позволяет определять такие соединения в концентрациях 0,1—0,0005 мг/мл. Определение токсических холинэстеразных ингибиторов в воде легко осуществляется при помощи холинэстеразы, иммобилизованной путем включения ее в крахмальный гель. Предварительно фермент сорбируют на гидроксид алюминия. Состав наносят на пенопластовую пластинку, через которую пропускают анализируемую воду. При определении токсических антихолинэстеразных веществ в воде иммобилизованный фермент «работает» при непрерывном протекании воды в течение 2 сут. Система обладает высокой чувствительностью. Активность иммобилизованной холинэстеразы составляет от 23 до 63% активности фермента, находящегося в растворе.

Представляет интерес применение иммобилизованной тирозиназы для определения фенола в сточных водах и других объектах (Schiller J. G., Liu C. C., 1976). Фермент

включали в полиакриламидный гель, содержащий тонкие платиновые сетки. В результате такой операции получали тирозиназу в геле, нанесенном на платиновые сетки. Активность иммобилизованной тирозиназы сохраняется в пределах 47—70% от исходной.

ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ В БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Ферментные электроды представляют собой электрохимические датчики различного типа с нанесенным на них слоем иммобилизованного фермента. Действие ферментных электродов основано или на определении продуктов ферментативной реакции или на выявлении изменения (уменьшения) количества субстрата, поступающего на электрод.

При контакте ферментного электрода с анализируемым раствором, содержащим специфический субстрат, происходит соответствующая ферментативная реакция. Поскольку субстрат или продукт реакции является электрохимически активным, изменение электродного потенциала можно измерить, что будет характеризовать количества анализируемого вещества в испытуемой жидкости. Использование ферментных электродов позволяет проводить непрерывный количественный анализ определяемых веществ.

В настоящее время предложены различные типы ферментных электродов, используемых для аналитических целей. Уже в первых работах по применению ферментных электродов для определения глюкозы была использована глюкозооксидаза, иммобилизованная в полиакриламидном геле. Полярографический кислородный электрод с иммобилизованной глюкозооксидазой был применен для определения глюкозы по расходу кислорода, необходимого для окисления глюкозы (Urdike S. J., Hicks G. P., 1967). Метод определения глюкозы по образовавшейся во время ферментативной реакции перекиси водорода на платиновом электроде является примером действия другого типа ферментного электрода (Guilbault G. G., Kramer D. N., 1972). Ферментный электрод в виде платинового диска с нанесенной на него иммобилизованной глюкозооксидазой также использовался для определения глюкозы. Особенностью этого электрода является применение для окисления

глюкозы не кислорода, а бензохинона. Реакция происходит по схеме: глюкоза + бензохинон + $H_2O \rightarrow$ глюконовая кислота + гидрохинон. Количество образовавшегося гидрохинона регистрируется с помощью платинового электрода по изменению тока. Система позволяет легко измерять концентрацию бензохинона в анализируемом растворе и, следовательно, количество содержащейся в нем глюкозы.

При помощи платинового ферментного электрода определяли количество молочной кислоты с использованием иммобилизованной лактатдегидрогеназы. Особый тип ферментных электродов был получен нанесением иммобилизованного фермента на стеклянный рН-электрод, посредством которого определяли концентрацию водородных ионов, образующихся при ферментативных реакциях. Такие ферментные электроды были использованы для определения глюкозы с иммобилизованной глюкозооксидазой. Реакция идет по схеме: глюкоза + $O_2 + H_2O \rightarrow$ глюконовая кислота + H_2O_2 .

Определение мочевины при помощи иммобилизованной уреазы основано на реакции: $H_2N - CO - NH_2 + 2H_2O + H^+ \rightarrow 2NH_4^+ + HCO_3^-$, определение различных пенициллинов с помощью иммобилизованной пенициллиназы — на реакции: пенициллин + $H_2O \rightarrow$ пенициллановая кислота.

Новый тип ферментного электрода, в котором был использован кристаллический цианидный датчик, покрытый слоем иммобилизованного фермента, предложили G. A. Rechnitz и R. Lescnado (1971). Для определения амигдалина авторы применяли β -глюкозидазу, включенную в полиакриламидный гель. При гидролизе амигдалина β -глюкозидазой в растворе появлялись ионы циана, которые определяли потенциометрически электрохимическим цианидным датчиком.

К подобному типу ферментных электродов могут быть отнесены и электроды, в которых электрохимический датчик является чувствительным к определенным ионам, образующимся в среде в результате ферментативной реакции. Такие электроды называют ионселективными. С их помощью можно определять содержание мочевины по образованию ионов аммония, аспарагина и глутамина, а также D- и L-аминокислот. Ион-селективный электрод регистрирует ионы аммония, образующиеся в среде: в случае аспарагина — при помощи

реакции с иммобилизованной аспарагиназой, в случае глутамина — с глутаминазой, а в случае D- и L-аминокислот — реакцией с иммобилизованными на электродах D- и L-аминооксидазами. При помощи иммобилизованных оксидаз и пероксидаз на ионселективных электродах определяли, например, L-фенилаланин (Guilbault G. G., Nagy G., 1973). Показана возможность применения двух сопряженных ферментов, иммобилизованных в полнакриламидном геле, нанесенном на поверхности электрода, селективного к иодид-ионам.

Важное значение имеет устойчивость и стабильность ферментных электродов, способность их сохранять ферментативную активность в течение определенного времени. Стабильность ферментных электродов колеблется в довольно широких пределах и зависит от многих факторов: концентрации субстрата в среде, концентрации фермента в геле, типа ферментного электрода, начальной активности иммобилизованного фермента, способа иммобилизации, толщины слоя гель-фермента на электроде, температуры.

Большинство ферментных электродов к настоящему времени изготовлено на основе полнакриламидных гелей. Это связано с возможностью целенаправленного изменения величины пор, а также активации полнакриламидного геля. Однако при этом часто наблюдается постепенное вымывание фермента в раствор, окружающий электрод, и уменьшение активности иммобилизованного на электроде фермента.

Стабильность таких электродов в известной мере можно увеличить, окружив электрод тонкой пленкой, способной пропускать молекулы субстрата и продукт реакции, но непроницаемой для молекул фермента. В отношении ионселективных электродов следует отметить, что большинство из них основано на чувствительности к ионам аммония. Присутствие в среде других одновалентных катионов (Na^+ , K^+ , Li^+ и др.) существенно затрудняет количественный анализ. В настоящее время широкое применение ферментных электродов для аналитических целей в значительной степени обеспечено повышением стабильности ферментных электродов, увеличением как специфичности ионселективных электродов по отношению к определяемым ионам, так и чувствительности электрохимических систем, расширением набора носителей для иммобилизованных фер-

ментов, используемых в ферментных электродных системах.

В табл. 2 приводятся применяемые в медицине ферментные электроды с краткой их характеристикой.

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

В последнее время в иммунохимии развивается новое перспективное направление — иммуноферментный анализ, в котором используются методы иммунохимии в сочетании с ферментными методами и экспериментальной техникой, применяемой в энзимологии.

Сущность иммуноферментного анализа состоит в образовании комплекса между молекулами фермента и молекулами антигена или антитела. В таком иммуноферментном комплексе молекулы антител играют роль своеобразного детектора для определяемого вещества, а молекула фермента служит индикатором, по которому, наблюдая за изменением ферментативной активности, судят о количестве вступившего в иммунохимическую реакцию антигена. Можно выделить два метода иммуноферментного анализа: конкурентный метод и метод тройных комплексов (сэндвич-метод). При конкурентном методе антитела предварительно иммобилизуют на твердом носителе. Антигены, меченные ферментом, и антигены, не меченные (без фермента), конкурируют за места связывания антитела, иммобилизованного на носителе (Engvall F., Perlman P., 1972).

Для определения антигенов этим методом измеряют активность ферментов, оставшихся в растворе, или активность связавшихся ферментов. Например, в качестве фермента-индикатора использовали щелочную фосфатазу, конъюгированную с иммуноглобулином G кроличьей антисыворотки. Чувствительность реакции определения специфических антител достигала 1 нг/мл. Антитела в сыворотках могут быть количественно определены в сравнении со стандартными антисыворотками.

При помощи этой методики определяли инсулин, связанный с β -D-галактозидазой (Kato K. et al., 1975). Кроме того, ранее инсулин был конъюгирован в комплексе с глюкоамилазой (Ichikawa F., 1973) как индикаторным ферментом. В качестве антитела был использован антиинсулин, связанный с сефадексом.

Основные характеристики ферментных электродов в биомедицинских исследованиях

Фермент	Метод иммобилизации	Определяемое вещество	Что определяется на датчике	Электрод	Чувствительность	В чем определяется	Автор и год
Алкоголь-оксидаза	Включение в мембрану, окружающую электрод	Этанол, метанол	H_2O_2	Платиновый	$10^{-9}-10^{-8}$ моль		Guilbault G. G., 1971
Аспарагиназа	Включение в гель	L-аспарагин	NH_4^+	То же	$5 \cdot 10^{-6} - -2$ моль		Онн же
Аспарагиназа	Включение в мембрану	L-аспарагин	NH_4^+	» »	—		» »
β -глюкозидаза	Включение в гель	Амигдалин	CN-	Кристаллический дианодный	$10^{-5}-10^{-2}$ моль		Lecnado R. A., Rechitz G. A., 1971
β -глюкозидаза	Включение в гель и покрытие пленкой	Амигдалин	CN-	То же	$5 \cdot 10^{-6}-10^{-3}$ моль		Rechnitz G. A., Lecnado R. A., 1971
Глутаминаза	Включение в пространство между электродом и пленочной мембраной	L-глутамин	NH_4^+	Катионный рН-электрод	$10^{-4}-10^{-1}$ моль	Трис-буфер, рН 5,5	Guilbault G. G., Shu F. R., 1971

Продолжение

Глюкозо-оксидаза	Включение в гель	Глюкоза	O_2	Кислородный	0,15—2 мг/мл	В биологических жидкостях	Urdike S. T., Flicks G. P., 1967
То же	Включение в пространство между электродом и мембраной	То же	Гидрохинон	Платиновый	$2 \cdot 10^{-3}-2 \cdot 10^{-2}$ моль	В крови	Williams D. L., et al., 1970
» »	Ковалентное связывание	»	H_2O_2	То же	$5 \cdot 10^{-4}-2 \cdot 10^{-2}$ моль	В биологических жидкостях	Guilbault G. G., Lubrano G. T., 1972
» »	Включение в гель	»	H_2O_2	» »	$5 \cdot 10^{-4}-2 \cdot 10^{-2}$ моль	Фосфатный буфер, рН 6,6	Guilbault G. G., Lubrano G. T., 1973
» »	Включение между электродом и мембраной	»	H_2O_2	» »	$5 \cdot 10^{-4}-2 \cdot 10^{-2}$ моль	Фосфатный буфер, рН 6,6	Онн же
» »	Включение в полиакриламидный или этиленгликольметакрилатный гель	»	H_2O_2	» »	$5 \cdot 10^{-4}$ моль	В малых количествах крови (0,1 мл)	Кулис Ю. Ю., Панова Б. С., 1974

Фермент	Метод иммобилизации	Определяемое вещество	Что определяется датчиком	Электрод	Чувствительность	В чем определяется	Автор и год	
Лактатдегидрогеназа	Включение между электродом и мембраной	Молочная кислота	—	Платиновый	10^{-4} — $2 \cdot 10^{-3}$ моль	В крови	Williams D. L. et al., 1970	
		D-аминокислоты	NH_4^+	То же	$5 \cdot 10^{-5}$ — 10^{-2} моль	В биологических жидкостях	Guilbault G. G., Hrabankova F., 1971	
		То же	То же	»	»	»	Они же	Они же
Оксидаза L-аминокислот	Включение в гель	L-фенилаланин	NH_4^+	Стеклопильный	10^{-4} — $5 \cdot 10^{-3}$ моль	В моче	Guilbault G. G., Hrabankova F., 1970	
		Включение между электродом и мембраной	L-аминокислоты	NH_4^+	То же	10^{-4} — $5 \cdot 10^{-3}$ моль	То же	Они же
		То же	То же	»	»	»	Guilbault G. G., 1971	

»	Ковалентное связывание	L-фенилаланин			10^{-4} — 10^{-2} моль		Guilbault G. G., Nagy G., 1973
Пенициллиназа	Включение в гель	Пенициллин	Пенициллановая кислота	»	10^{-4} — $5 \cdot 10^{-2}$ моль	В фармацевтических препаратах	Paragiella G. J. et al., 1973
		Уреаза	Мочевина	Стеклопильный	$5 \cdot 10^{-5}$ — 10^{-2} моль	В водных растворах	Guilbault G. G., Montalvo J. G., 1969
		»	То же	То же	$5 \cdot 10^{-5}$ — 10^{-2} моль	В биологических жидкостях	Guilbault G. G., Nagy G., 1973
»	Включение в гель и покрытие пленкой	»	NH_4^+	»	11—81%	В сыворотке крови	Guilbault G. G., 1971
»	То же	»	NH_4^+	»	5,5—35 мкг/л	В моче	Они же

Сэндвич-метод предложили К. Ф. Rubenstein и соавт. (1972). Авторы использовали лизоцим и микробные клетки, по разрушению которых оценивалась активность фермента. Здесь происходило образование тройного комплекса фермент — антиген — антитело. Предварительно к ферменту «пришивался» антиген, который специфически взаимодействовал с соответствующими антителами, находящимися в испытуемом растворе. При этом взаимодействии происходило экранирование активного центра фермента антителами, что приводило к ингибированию фермента и уменьшению его активности. Метод был с успехом использован для определения ряда лекарственных веществ (кодеин, кокаин, барбитураты и др.) в моче больных. Сэндвич-метод перспективен для обнаружения антител в сыворотке крови человека. Антитела сыворотки реагируют с антигеном, предварительно иммобилизованным на нерастворимом носителе. К образующемуся на носителе комплексу антиген — антитело добавляют антитела против иммуноглобулинов данной сыворотки с конъюгированным ферментом. Образуется тройной комплекс:

антиген — антитело₁ — антитело₂

Этот метод был использован, например, для обнаружения антител у лиц, переболевших малярией. Малярийный антиген сорбировали на поверхности пластиковых чашек, куда добавляли сыворотку людей, переболевших малярией. Антималарийные антитела сыворотки связывались с антигеном. После удаления несвязавшихся иммуноглобулинов промыванием буфером в чашки добавляли меченные ферментом кроличьи антитела против иммуноглобулинов человека. Последним этапом было проведение ферментативной реакции с участием соответствующих субстратов для оценки активности меченных ферментом антител. Для получения иммуноферментных комплексов использовались лизоцим (Rubenstein K. F. et al., 1972), β-галактозидаза (Kato et al., 1975), глюкоамилаза (Ichikawa F., 1973), цитохром, лактатдегидрогеназа, глюкозооксидаза, щелочная фосфатаза, а в настоящее время преимущественно пероксидаза.

ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ СОЕДИНЕНИЙ В МЕДИЦИНЕ ДЛЯ ПРЕПАРАТИВНЫХ ЦЕЛЕЙ

В последние годы для препаратного выделения и очистки разнообразных биополимеров широко используются иммобилизованные биопрепараты, обладающие специфическим сродством к выделяемому продукту. Этот метод выделения и очистки получил название биоспецифической аффинной хроматографии, или хроматографии по сродству.

В режиме аффинной хроматографии иммобилизованный (обычно ковалентно) на твердом носителе фермент или другой белок помещают в колонку (или реактор), через которую пропускают смесь белков или культуральную жидкость, из которой необходимо выделить белок, обладающий биологической специфичностью к белку, иммобилизованному на носителе. Такими белками могут быть комплексы соответствующего фермента и его субстрата или ингибитора, кофермента, антигена или антитела и т. п.

В аффинной хроматографии явления пространственного соответствия, лежащие в основе специфичности биологических взаимодействий, играют решающую роль. В аффинной хроматографии приходится даже бороться с обычными для всех видов хроматографии физико-химическими силами сорбционного взаимодействия, так как они могут быть причиной неспецифической сорбции, снижающей эффект аффинной хроматографии.

Методами традиционной хроматографии трудно выделить очищенный белок или фермент при помощи только одной хроматографической процедуры (Кибардин С. А., Макаров К. А., 1978).

Аффинная хроматография обычно позволяет получить выделяемый белок из белковой смеси в одну стадию, в один прием, экономя при этом материалы и время. Этот метод применяется для выделения и очистки ферментов, коферментов и нуклеотидов, а также для очистки стероидсвязывающих белков (Черкасов И. А., 1972; Клящицкий Б. А., Шапот В. С., 1976).

В качестве матриц для аффинной хроматографии обычно используются те же носители, что и для иммобилизации различных биологически активных соединений, наиболее часто — полиакриламид, сефароза, порис-

тое стекло. Требования, предъявляемые к носителям, такие же, как и к матрицам для иммобилизации: механическая и химическая стабильность, достаточная инертность носителя по отношению к выделяемым белкам, способность к модификации, экономичность.

Носители при аффинной хроматографии должны быть достаточно пористыми, что обеспечивает эффективность адсорбента — носителя. Вещества, обладающие способностью специфически взаимодействовать с выделяемыми соединениями и ковалентно связанные с носителем, в аффинной хроматографии называют лигандами. Часто лиганд связан с носителем не непосредственно, а при помощи особой «вставки», которая отделяет лиганд от поверхности адсорбента или носителя. Это делается в целях уменьшения влияния стерических препятствий при взаимодействии лиганда с выделяемым белком. В качестве вставок часто используются углеводородные метиленовые мостики типа $(\text{CH}_2)_n$, отделяющие лиганд от поверхности носителя. Применение вставок в значительной степени способствует повышению эффективности аффинной хроматографии. Оптимальной вставкой является углеводородная цепь из 6 углеродных атомов.

Дальнейшее увеличение длины углеводородной цепи малоэффективно.

Недавно были получены носители с новым типом вставок полипептидной природы. Эти носители характеризуются высокой стабильностью, поскольку полипептидная вставка присоединена к носителю не в одной, а в нескольких точках. Поэтому разрыв отдельных вставок не приводит к отщеплению присоединенного лиганда. Вставки, пригодные для выделения и очистки белковых веществ в очень небольших количествах, могут быть получены методом твердофазного синтеза пептидов на органических и неорганических матрицах (Макаров К. А. и др., 1977).

Существенную роль в аффинной хроматографии играет концентрация лиганда на носителе. Имеется, по видимому, оптимальное количество присоединяемого к носителю лиганда, при котором реализуется максимальная емкость сорбента. Повышение количества лиганда на единицу объема сорбента или носителя выше оптимального часто не приводит к увеличению емкости носителя.

Аффинная хроматография медицинских ферментов

Разработке и применению методов аффинной хроматографии для выделения белков и ферментов посвящено значительное число работ. При этом рассматриваются различные методические вопросы и приводятся многочисленные примеры аффинной хроматографии ферментов, в том числе всех форм ацетилхолинэстеразы (Jacoby W. R., Wilchek M., 1974). Разрабатываются аффинная хроматография связывающих пенициллин компонентов из бактериальных мембран, разделение различных форм изоферментов, очистка рецепторов инсулина, эстрогенов и ряда других гормонов, выделение различных белков, кофакторов ферментов. Так, например, проводили выделение НАД на колонках с иммобилизованной алкогольдегидрогеназой и лактатдегидрогеназой. Ферменты были иммобилизованы на активированной ДЭАЭ-целлюлозе и на сефарозе ЧВ, активированной бромистым цианом. Полученные препараты ферментов при хроматографии эффективно отделяют НАД от аденозинтрифосфата, аденозиндифосфата и аденозинмонофосфата, а также выделяют НАД из гидролизатов РНК и ДНК. Метод аффинной хроматографии предложен для выделения из плазмы крови беременных женщин гистаминазы (диаминоксидазы) в целях диагностики беременности (Baylin S., Margolis S., 1975). Показана также возможность выделения изоферментов алкогольдегидрогеназы при помощи аффинной хроматографии. Ферменты выделены на сефарозе ЧВ, ковалентно связанной с аденозинмонофосфатом (АМФ).

Аффинная хроматография холинэстеразы из сыворотки крови человека описана в работе J. Picard (1976). В качестве носителя использована сефароза, ковалентно связанная с аминофенилтриметиламмонием. Ацетилхолинэстераза из эритроцитов человека выделена при помощи аффинной хроматографии на сефарозе, ковалентно связанной с бромистым капроиламмонофенилтриметиламмонием. При этом выход фермента составлял около 28%. Аффинная хроматография ацетилхолинэстеразы мозга проведена на агарозе с ковалентно связанным хлоридом триметиламмония, с выходом 50—60% фермента. Выделение аденозиндезаминазы из эритроцитов человека при помощи аффинной хроматографии описано в работе W. P. Schradeg и соавт.

(1976), в которой использована в качестве носителя сефароза 6В, связанная с аденозином. Метод позволяет обрабатывать 23 л осажденных эритроцитов с достаточно высоким выходом фермента. Очистка аденозиндезаминазы достигается в 500 000 раз. Представляет интерес аффинная хроматография транскортина из сыворотки крови человека на сефарозе ЧВ с иммобилизованной на ней оксикетоандростенкарбоксилловой кислотой (Le Gaillard F. et al., 1974).

Из эритроцитов человека при помощи аффинной хроматографии на сефарозе ЧВ, связанной с аденозиндифосфатом (АДФ), получена глутатионредуктаза (Mannervik B. et al., 1976). Элюцию проводили с добавлением в буфер никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФ). С помощью этого метода была достигнута очистка фермента почти в 10 000 раз. Из эритроцитов человека же при помощи аффинной хроматографии на сефарозе с ковалентно связанным в качестве лиганда НАДФ была успешно выделена глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа с выходом 60% (Yoshida A., 1975). Эритроциты человека использовались в качестве источника карбоангидразы, которая была выделена при помощи аффинной хроматографии на сефарозе с п-аминометилбензолсульфамидом в качестве лиганда (Whitney R. L., 1974). На сефарозе, часто используемой в аффинной хроматографии, были выделены также малатдегидрогеназа, пиридиннуклеотидтрансгидрогеназа. Для малатдегидрогеназы лигандом служил аденозиндифосфат; выход фермента составил 41%. Для пиридиннуклеотидтрансгидрогеназы в качестве лиганда использовали аденозинмонофосфат.

Использование в аффинной хроматографии в качестве лигандов специфических антител из соответствующих антисывороток было показано в работах G. D. Viadutiu и соавт. (1975) и Ф. А. Валюлиса и соавт. (1975). G. D. Viadutiu и соавт. (1975) с помощью аффинной хроматографии на сефарозе получили гексозаминидазу из плаценты человека. Лигандом являлись антитела, специфичные к активному центру этого фермента. В исследовании Ф. А. Валюлиса и соавт. (1975) аффинная хроматография глюкозооксидазы была также проведена на сефарозе с ковалентно присоединенными к ней в качестве лиганда специфическими антителами к глюкозооксидазе.

Коммерческие препараты рибонуклеазы и дезоксирибонуклеазы часто бывают с примесями протеолитических ферментов (трипсин, химотрипсин). Для удаления примесей и получения особо чистых нуклеаз используют метод аффинной хроматографии на сефарозе с иммобилизованным в качестве лиганда АМФ. Отделение рибонуклеазы от дезоксирибонуклеазы происходит при изменении ионной силы элюирующего раствора. Рибонуклеаза сорбируется на колонке при высокой ионной силе, тогда как дезоксирибонуклеаза в этих условиях на колонке не связывается.

Заслуживает внимания работа D. Hue и соавт. (1976), в которой аффинная хроматография использована для очистки ферментов, часто применяемых в медицине с диагностическими целями: лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, аминотрансферазы, фосфотрансферазы. В качестве носителей служили стекло, силикагель, полиакриламидный гель, целлюлоза и сефароза.

Из гранулоцитов больных хронической гранулоцитарной лейкемией при помощи аффинной хроматографии выделена фосфоглицераткиназа (Slavik K. et al., 1976). Интересная разновидность метода аффинной хроматографии киназ с общим лигандом предложена Lee и соавт. (1977), которые применили колонку, заполненную сефарозой с иммобилизованными адениновыми нуклеотидами. Этот метод может быть с успехом использован в клинической гистохимии.

В заключение раздела приводим таблицу аффинной хроматографии некоторых ферментов, используемых в медицинских и биологических исследованиях в настоящее время (табл. 3). Список ферментов расположен согласно общепринятой в настоящее время классификации ферментов.

Аффинная хроматография других белковых соединений

Помимо очистки и выделения ферментов, аффинная хроматография с успехом применяется и для выделения других биополимеров. Особенно перспективно применение аффинной хроматографии для очистки белковых рецепторов ряда гормонов. Выделение гормональных белков обычными методами связано с многочисленными трудностями. При аффинной хроматографии гормональных белковых рецепторов большое значение имеет

Аффинная хроматография ферментов, используемых в медицине

Фермент	Носитель	Лиганд	Авторы и год
Алкогольдегидрогеназа	Сефароза ЧВ	АМФ	Andersson L. et al., 1975
Глюкозооксидаза	Сефароза ЧВ	Специфические анти-тела	Валюлис Ф. А. и др., 1975
НАД-оксидоредуктаза	Агароза	НАД	Nwoko N. A., Schachter H., 1975
Малатдегидрогеназа	Сефароза ЧВ	Аденозиндифосфат	Ieng K. K., 1976
»	Агароза	НАД	Hue D. et al., 1976
Изоцитратдегидрогеназа	Сефароза ЧВ	НАДФ	Burgisser F., Fauchere J. — L., 1976
Фосфоглюконатдегидрогеназа	»	»	Ониг же
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	»	»	»

Продолжение

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	Агароза	»	Yoshida A., 1975
Оксистероиддегидрогеназа	Сефароза ЧВ	Гликохолевая кислота	Aukrust L. et al., 1976
Лактатдегидрогеназа	Целлюлоза полнакриламидный гель	НАД	Hue D. et al., 1976
Лактатдегидрогеназа	Сефароза	АМФ	Bachman B. K., Lee C., 1976
Гидроксипростагландиндегидрогеназа	Сефароза ЧВ	НАД	Ho Peter P. K., Townner R. D., 1976
Аминооксидаза	»	Аминооксиан	Togaya T. et al., 1976
Гистаминаза	»	Кадаверин	Baylin S. B., Margolin S., 1975 г.
Глутатионредуктаза	»	АДФ	Mahnevik B. et al., 1976

тщательная промывка колонки (90% метиловым спиртом и 5% раствором альбумина) со специфическим адсорбентом перед введением в нее исследуемого материала для удаления следов стероидов, которые могут маскировать присутствие рецепторной активности в элюируемом растворе. Выполнены работы по выделению цитоплазматических, связывающих стероиды белков. Так, при помощи агарозы, ковалентно связанной с гемисукцинаткортизоном, выделили транскортин из плазмы крови (см. табл. 3). Le Gaillard и соавт. (1974) применили аффинную хроматографию для выделения транскортина из сыворотки человека с использованием сефарозы ЧВ, а Р. Hampl и соавт. (1974) — для выделения из сыворотки глобулина, связывающего половые гормоны. Выделение стероидсвязывающих белков оксистероиддегидрогеназы и оксистероидизомеразы осуществлено при помощи аффинной хроматографии на сефарозе ЧВ с пришитой через вставку этилендиамина гликохолевой кислотой в качестве лиганда, а также на полиэтиленоксиде с ковалентно связанным с ним эстрадиолом. Макромолекулярные вставки обеспечивают повышение количества лиганда на единицу поверхности носителя. За счет большого числа функциональных групп на вставке, способных связываться с лигандом, уменьшается неспецифическая адсорбция белков, что способствует увеличению взаимодействия с извлекаемым биополимером. Ввиду расположения лиганда на значительном расстоянии от поверхности носителя (до 15 нм) вставки способствуют большим контактам между лигандом и выделяемым белком.

При помощи аффинной хроматографии из плазмы крови были выделены белки, связывающие витамин В₁₂. Эти белки (транскобаламины) содержатся в плазме в очень незначительных концентрациях (20—80 мг на 1000 л плазмы человека). Для их очистки применяли витамин В₁₂, ковалентно присоединенный к сефарозе (Allen R. H., Mehlman C. S., 1973). Представляют интерес выделение и очистка α -фетопротенна, белка эмбрионального происхождения, находящегося в сыворотке больных гепатоцеллюлозным раком печени (Абелев Г. И., 1963—1972). В качестве носителя использовалась сефароза, связанная с гамма-глобулином из антисыворотки к α -фетопротенну.

С помощью аффинной хроматографии можно полу-

чить моноспецифическую сыворотку к α -фетопротейну. Используя сродство этого белка к эстрадиолу, сыворотку, содержащую α -фетопротейн, пропускают через колонку эстрадиол-гамисукциниламинонилагарозой и после промывания колонки с адсорбентом агарозу со связанным с ней α -фетопротейном применяют для иммунизации кроликов (Arnon R. et al., 1973).

A. Wichman и L. O. Andersson (1974) показали возможность очистки сывороточного альбумина человека. В качестве носителя авторы использовали диаминогексансефарозу, к которой ковалентно были присоединены ангидриды тетрадецилсукцината, гексадецилсукцината, актилсукцината. Метод основан на способности альбумина связывать жирные кислоты. Степень очистки получаемого альбумина достигала 99%.

Показана возможность успешного удаления вируса гепатита и поверхностного вирусного антигена (HBsAg) путем адсорбции на сефарозной матрице, связанной с углеводами, обладающими длинным углеродным скелетом. Приведена также очистка иммуноглобулина М человека при помощи аффинной хроматографии на сефарозе. Сефароза ковалентно связана с протамином. Препараты IgM были получены с хорошим выходом.

D. F. Krieger и соавт. (1976) применили аффинную хроматографию для очистки синтетических пептидов. Метод заключается в специфическом модифицировании свободных аминогрупп пептидов после их твердофазного синтеза. Синтетические пептиды все шире используются для получения различных веществ в фармацевтической промышленности.

ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ БИОПРЕПАРАТОВ В ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Использование иммобилизованных биопрепаратов в химико-фармацевтической промышленности имеет большое значение для синтеза ряда лекарственных соединений. Особенно необходимо отметить получение 6-аминопенициллановой кислоты для производства различных полусинтетических пенициллинов. 6-аминопенициллановая кислота (6-АПК) является исходным сырьем для получения всех новых пенициллинов, в том числе пенициллинов широкого спектра действия. Получение 6-АПК различными химическими способами (ацилиро-

вание натриевой соли 6-АПК хлорангидридами карбоновых кислот, действие карбодимидов на смесь 6-АПК и соответствующей кислоты, ацилирование 6-АПК смешанными ангидридами кислот и др.) связано с большими препаративными и технологическими трудностями. Наиболее перспективным методом является ферментативный гидролиз 6-АПК при помощи пенициллинамидазы. Однако обычный ферментативный гидролиз имеет существенные недостатки, связанные с необходимостью разделения смеси продуктов после гидролиза. Различные примеси (белковые вещества, аминокислоты и т. д.) значительно снижают выход основного продукта и, кроме того, могут быть причиной аллергических реакций при введении синтезируемых пенициллинов в организм. Эти недостатки могут быть устранены путем использования для ферментативного гидролиза иммобилизованной пенициллинамидазы. Иммобилизованную пенициллинамидазу высокой активности получили при использовании в качестве носителя различных ионообменных смол (Ныс П. С., Савицкая Е. М., 1974). Авторами изучены зависимость эффективности сорбции от чистоты использованной пенициллинамидазы, а также стабильность полученных препаратов и распределение субстрата и продуктов реакции между носителем-иононом и раствором. Препарат иммобилизованной пенициллинамидазы с успехом получили также путем включения фермента в полиакриламидный гель М. О. Мандель и соавт. (1975). Иммобилизация пенициллинамидазы в полиакриламидном геле сохраняла специфичность и активность фермента. Этой группой исследователей 6-аминопенициллановая кислота была получена при помощи иммобилизованной пенициллинамидазы в проточном реакторе с последующим выделением кристаллической 6-АПК (Мандель М. О. и др., 1974). Полученный продукт обладал высокой степенью чистоты (до 95%). Иммобилизованная пенициллинамидаза имела и высокую стабильность: за 10 циклов гидролиза активность фермента уменьшилась на 40% от первоначальной. Авторами изучались также кинетические аспекты действия иммобилизованной пенициллинамидазы. Она может быть использована не только для ферментативного синтеза новых пенициллинов, но также для синтеза цефалоспоринов и получения L-аминокислот из рацематов их фенацетильных производных (Са-

вицкая Е. М. и др., 1974). Недавно был предложен ферментативный метод синтеза пенициллинов и цефалоспоринов с использованием 6-АПК при помощи пенициллинамидазы, иммобилизованной в волокнах триацетилцеллюлозы (Magsoni W. et al., 1975). В предложенном виде ацелирующими агентами являются обычно амиды органических кислот, чаще всего фенилглицина и *p*-оксифенилглицина. Этим методом были синтезированы цефалексин, ампициллин, амоксициллин. После достижения максимальной концентрации антибиотиков в растворе равновесие смещалось в сторону обратной реакции — ферментативного гидролиза с образованием исходных продуктов, 6-аминопенициллановой кислоты или 7-амино-3-дезацетоксицефалоспориновой кислоты.

В синтезе лекарственных веществ большое значение имеет избирательность химических превращений, исключение или сведение к минимуму возможности протекания побочных реакций. Продукты побочных реакций часто являются токсическими веществами. Использование сильных кислот и щелочей, а также высоких температур при синтезе лекарственных веществ также крайне нежелательно, поскольку сложная структура лекарственных веществ и продуктов синтеза требует проведения реакции в мягких условиях. Особенно перспективны в этом отношении ферменты, иммобилизованные на твердых матрицах. Твердофазный синтез лекарственных глюкуронидов с применением иммобилизованной в зернах агарозы глюкуронозилтрансферазы позволяет отделить целевой продукт от побочных продуктов и примесей, получить высокочистый препарат. В качестве субстратов были использованы *p*-нитрофенил, барнеол, диэтилстильбэстрол, мепробамат, бензойная кислота и билирубин. В работе этих авторов исследовалось ингибирующее действие органических растворителей (таких, как этанол, диоксан, пропиленгликоль и др.) и некоторых эмульгаторов (твин-30 и др.). Показано, что при использовании этанола в качестве растворителя активность фермента уменьшается на 17%, пропиленгликоля — на 11%, тогда как диоксан и диметилформамид снижают активность глюкуронозилсинтетазы только на 2 и 6% соответственно.

**ПРИМЕНЕНИЕ
ИММОБИЛИЗОВАННЫХ БИОПРЕПАРАТОВ
В КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ**

Успехи в применении иммобилизованных биопрепаратов в практической медицине связаны в основном с иммобилизованными ферментами. Использование иммобилизованных (главным образом протеолитических) ферментов в качестве лечебных препаратов началось сравнительно недавно. Однако уже первые результаты применения иммобилизованных ферментов с терапевтическими целями позволяют говорить о перспективности этого направления в будущем (табл. 4). Дальнейшее развитие этого направления связано с деятельным изучением механизма действия ферментов в организме, расшифровкой их молекулярной структуры, изучением особенностей взаимодействия ферментов с субстратом в организме больного, получением высокоочищенных ферментов из доступных источников, разработкой синтеза водорастворимых (со)полимерных матриц для (со)иммобилизации ферментов, ферментов и антибиотиков, ферментов и антисептиков. В табл. 4 представлены данные об иммобилизованных ферментах, используемых в настоящее время в медицине и фармацевтической промышленности.

ТРОМБОЛИТИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ ФЕРМЕНТНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ

Применению тромболитических ферментов посвящена обстоятельная работа М. Вольфа и К. Рансберге-ра (1976). В нашей стране это направление успешно развивается благодаря исследованиям Е. Л. Чазова, В. П. Торчилина и соавт. Препараты протеолитических ферментов наиболее часто применяют в терапии болезней сердечно-сосудистой системы. Для лечения некоторых заболеваний, таких, как ревматизм, инфаркт миокарда, с успехом используются препараты протеиназ, в

Таблица 4
 Применение иммобилизованных ферментных препаратов в медицине

Фермент	Носитель	Метод иммобилизации	Применение	Автор и год
1	2	3	4	5
Алкогольдегидрогеназа	Нейлон	Ковалентный	Определение этанола в биологических средах	Hornby W. F., et al., 1972
То же	Целлюлоза	»	То же	Cremonesi P., Bovara R., 1976
Малатдегидрогеназа	Нейлон	»	Определение щавелевоуксусной кислоты в биологических жидкостях	Hornby W. F. et al., 1972
То же	Полиакриламид	Включение в гель	Компонент полиферментной системы	Sgere P. A. et al., 1973
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	Сефароза ЧВ, а также сополимер акриламида и акриловой кислоты	Ковалентный	Компонент полиферментной системы	Mosbach K., Mattiasson B., 1970
β-окси-стероиддегидрогеназа	Целлюлоза	»	Определение тестостерона	Cremonesi P., Bovara R., 1976
Лактатдегидрогеназа	Полиакриламид	Включение в структуру геля	Определение молочной кислоты в крови	Hicks G. P., Urdike S. J., 1966

Фермент	Носитель	Метод иммобилизации	Применение	Автор и год
1	2	3	4	5
Лактатдегидрогеназа	Нейлон	Ковалентный	Определение пировиноградной кислоты в биологических жидкостях	Hornby W. F. et al., 1972
То же	Полиакриламид	Включение в структуру геля	Компонент в полиферментной системе	Stere P. A. et al., 1973
Глюкозооксидаза	»	То же	Определение глюкозы в крови	Hicks G. P., Urdike S. J., 1966
»	Пористое стекло	Ковалентный	Определение глюкозы в крови и биологических жидкостях	Weibel M. K. et al., 1973
»	Нейлоновые трубки	»	То же	Leon L. P. et al., 1976
»	Целлюлоза	»	Определение глюкозы при помощи колоночных реакторов	Cremonesi P., Bovara R., 1976
»	Пористый титан	»	Компонент в полиферментной системе	Messing R. A., 1974
Оксидаза аминокислот	Полнакриламид	Включение в структуру геля	Определение аминокислот (фенилаланина) при помощи ферментных электродов	Guilbault G. G., Nagy G., 1973

Уратоксидаза	Нейлон	Ковалентный	Определение мочевой кислоты	Filippusson H. et al., 1972
Каталаза	Пористый титан	»	Компонент в полиферментной системе	Messing R. A., 1974
»	Алюмосиликат, импрегнированный никелем	Ковалентный	То же	Bopin J. C. et al., 1976
Пероксидаза	Целлюлоза	Ковалентный	Определение следов фенола	Cremonesi P., Bovara R., 1976
Тирозиназа	Полнакриламид	Включение в структуру геля	Определение фенола	Schiller J. G., Liu C. C., 1976
Гексокиназа	Пористое стекло	Ковалентный	Определение глюкозы по изменению энтальпии анализируемой системы	Bowers L. D., Cagg P. W., 1976
»	Серофароза ЧВ	»	Компонент в полиферментной системе	Mosbach K., Mattiasson B., 1970
Стрептокиназа	Полимерные материалы	»	Лечение гнойно-воспалительных процессов	Веремеенко К. Н., 1971
Рибонуклеаза	То же	»	То же	Он же

Фермент	Носитель	Метод иммобилизации	Применение	Автор и год
1	2	3	4	5
Холнэстераза	Крахмальный гель	Включение в крахмальный гель	Оценка загрязнения окружающей среды фосфорорганическими соединениями	Guilbault G. G., Kramer D. N., 1965
Щелочная фосфатаза	Гидроокись алюминия	Сорбция	Определение токсических веществ в воде	Goodson L. H. et al., 1973
Дезоксирибонуклеаза	Сефароза ЧВ	Ковалентный	Оценка пищеварительной активности слизистой оболочки тонкого кишечника	Wursch P., 1977
β-амилаза	Полимерные материалы	»	Лечение гнойно-воспалительных процессов	Веремеенко К. Н., 1971
Глюкоамилаза	Сополимер акриламида и акриловой кислоты	»	Компонент в полиферментной системе	Marlensson K., 1974
Лизоцим	Сефадекс	3	Индикаторный фермент для определения инсулина	Ichikawa F., 1973
	Карбоксиметилцелюлоза	»	Индикаторный фермент для определения морфина	Rubenstein K. F. et al., 1972

β-глюкозидаза	Полнакриламидный гель	Включение в структуру геля	Определение амигдалин при помощи ферментного электрода	Rechnitz G. A., Lecnado R., 1971
β-галактозидаза	ДЕАЕ-целлюлоза	Ковалентный	Контроль количества лактозы в биологических жидкостях	Stasiw R. O. et al., 1972
Трипсин	ДЭАЭ-сефадекс А-50	Сорбция	Активирование калийкрепногена в крови человека	Яровая Г. А. и др., 1974
»	Аминополистирольная смола	Ковалентный	Активирование проферментов в крови	Зубаилов Д. М., Зинкевич О. Д., 1976
Химотрипсин	Полвинилпирролидон	Включение в структуру геля	Пролонгирование действия биопрепаратов в органазме	Торчилин В. П., Бобкова А. С. и др., 1976
»	Альдегидпронзводные сефадексы	Ковалентный	То же	Торчилин В. П., Тищенко Е. Г. и др., 1976
Папаин	Аминополистирольная смола	»	Активирование проферментов в организме	Зубаилов Д. М., Зинкевич О. Д., 1976

Фермент	Носитель	Метод иммобилизации	Применение	Автор и год
1	2	3	4	5
Тромбин	Аминополистирольная смола	Ковалентный	Активирование проферментов в организме	Зубаиров Д. М., Зинкевич О. Д., 1976
Фибринолизин	То же	»	То же	Зубаиров Д. М., Зинкевич О. Д., 1976
Аспарагиназа	Нейлон или коллоидный	Микрокапсулирование	Введение в организм в качестве противопопухолевого препарата	Chang T. M. S. et al., 1967
»	Коллаген	Включение в структуру коллагена	Очистка крови для понижения содержания аспарагина в крови	Olanoff L. S. et al., 1975
»	Реактор с полиэфирными (дакроновыми) волокнами	Ковалентный (сшивка глутаровым альдегидом)	То же	Ko R. I. C., Hercsh L. S., 1976
Уреаза	Нейлон или коллоидный	Микрокапсулирование	Для понижения содержания мочевины в крови	Chang T. M. S. et al., 1967
»	Нейлон, силкагель, пористое стекло, поллакриламид, сефароза	Ковалентный	Определение мочевины в биологических жидкостях	Filippusson H. et al., 1972

»	Гидроокись алюминия	»	Определение мочевины в сыворотке крови	Watson B., Koyes M. H., 1976
Уреаза	Производные целлюлозы	Ковалентный	Обработка цитратной плазмы доноров для разложения мочевины	Мельник И. П. и др., 1977
Пенициллин-аза	Ионообменные целлюлозы	Сорбция	В фармацевтической промышленности для получения аммопеницилла-новой кислоты в качестве исходного сырья	Ныс П. С., Савицкая Е. М., 1974
»	Поллакриламидный гель	Включение в структуру геля	То же	Мандель М. О. и др., 1975
»	Целлюлозы, силхром, энзакрил	Ковалентный	В фармацевтической промышленности для получения новых пенициллинов, цефалоспоринов, а также α -аминокислот	Савицкая Е. М. и др., 1974
»	Триацетилцеллюлоза	»	Синтез антибиотиков	Magsoni W. et al., 1975

Фермент	Носитель	Метод иммобилизации	Применение	Автор в год
1	2	3	4	5
Пенициллиназа	Пористое стекло	Ковалентный	Определение пенициллина в фармацевтических препаратах	Rusling I. F. et al., 1976
Цитратсинтаза	Полиакриламид	Включение в структуру геля	Компонент в полиферментной системе	Sgere P. A. et al., 1973
Террилитин	Гель катионита КМТ	То же	Препарат, содержащий протеазы микробного происхождения	Тимаковская А. Ф. и др., 1976

том числе калликреины. Подкожное введение этих ферментов вызывает повышение проницаемости капилляров, а при внутривенном введении препаратов наблюдается расширение коронарных и периферических сосудов, снижение артериального давления. В связи с таким механизмом действия иммобилизованный калликреин, полученный из поджелудочной железы свиньи, нашел применение для лечения гипертонической болезни, инфаркта миокарда и заболеваний периферических сосудов. Показано, например, что лечение калликреином больных с различными поражениями периферических кровеносных сосудов дало положительные результаты в 70%, и только у 10% больных результат терапии был отрицательным (Пасхина Т. С., 1970).

Применение протеолитических ферментов в качестве тромболитических препаратов имеет широкие перспективы. Трипсин, химотрипсин, плазмин, препараты стрептокиназы уже сейчас с успехом используются в терапии тромбозов (Вольф М. и Рансбергер К., 1976). Все исследователи подчеркивают, однако, что наилучший результат достигается в том случае, если лечение ферментами начинается не позже чем через 2—3 дня после образования тромба. В дальнейшем тромб становится менее доступным для ферментативного воздействия. Однако эффект использования немобилизованных форм тромболитических ферментов резко снижался вследствие их быстрого разрушения или инактивации различными системами организма (иммунные ответы, действие ингибиторов и эндогенных протеаз). Иммобилизованные же ферменты сохраняют свою активность в десятки и сотни раз дольше. Кроме того, благодаря целенаправленному выбору соответствующего носителя они могут быть строго локализованы в нужном месте (например, месте нахождения тромба) в течение заданного времени. Не менее важно, что терапевтическая доза иммобилизованного препарата снижается в сотни раз; при этом количество используемого носителя по отношению к иммобилизованному ферменту незначительно (от 1 : 10 до 1 : 100). Так, удачно выбранный носитель (модифицированный сефадекс) и метод иммобилизации позволил с помощью иммобилизованных ферментов (фибринолизин, стрептокиназа, урокиназа и др.) получить необходимую концентрацию фибринолитического фермента непосредственно на поверхности тромба.

С другой стороны, имеются данные о потере активности ферментов вследствие неудачного выбора носителя или метода иммобилизации. Так, Д. М. Зубанров и О. Д. Зинкевич (1976) изучали гемокоагуляционные свойства иммобилизованных протеаз: трипсины, химотрипсин, папаин, тромбин и плазмин. Папаин и химотрипсин в результате иммобилизации теряли способность растворять фибрин; фибринолитическая активность сохранялась после иммобилизации только у трипсина и плазмينا. В связи с этим необходимо дальнейшее изучение механизмов взаимодействия иммобилизации и поиск новых, более эффективных носителей. Особый интерес в этом плане представляют работы по использованию природных носителей. Известно, что обычно тромболитическую терапию проводят на фоне введения гепарина для предупреждения повторных тромбозов. В связи с этим попытки некоторых авторов (Togchilin V. P., Пина Е. V. et al., 1978) использовать гепарин в качестве носителя тромболитических ферментов представляют несомненный интерес.

Большие преимущества по сравнению с ферментативной монотерапией имеет сочетанное применение протеолитических ферментов. М. Вольф и К. Рансбергер (1976) использовали мультиферментные препараты, содержащие смесь животных и растительных протеиназ. Лечение этими препаратами 245 больных у 85—92% привело к положительным результатам и показало, что использованные ферментные смеси обладают хорошим противовоспалительными, фибринолитическими и противоотечными свойствами. В ряде случаев, например при тромбофлебитах различной локализации, большие перспективы могут иметь сочетания ферментов, обладающих тромболитической активностью, с препаратами антибактериального действия. При создании такого рода комбинаций необходимо строго учитывать совместимость применяемых препаратов.

ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ БИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ФЕРМЕНТОВ В ОРГАНИЗМЕ И ДЛЯ АКТИВАЦИИ ПРОФЕРМЕНТОВ

Иногда в организме человека в силу различных причин может возникать недостаточность того или иного фермента. Это может быть результатом нарушения ме-

таболлизма и генетически обусловленных изменений структуры и активности фермента. Недостаточность ферментов в организме может быть вызвана отсутствием кофакторов, необходимых для проявления активности ферментов, или присутствием ингибиторов ферментов. В таких случаях нужно активировать ферменты, присутствующие в организме, или превратить проферменты в ферменты. Часто ферментная недостаточность возникает у больных в послеоперационном периоде или после инфекционного заболевания. Во всех этих случаях с успехом можно применить лечение иммобилизованными ферментами. В частности, благодаря введению иммобилизованной микроинкапсулированной каталазы была успешно восполнена недостаточность этого фермента в организме мышей (Feinstein et al., 1966). В работе исследователей использовалась мутантная линия мышей с каталазной недостаточностью. Инъекцию 50% водной суспензии микроинкапсулированной каталазы (0,5 ммоль на 1 г массы тела животного) производили после подкожного введения субстрата (0,014 ммоль пербората натрия на 1 г массы тела). Через 20 мин активность каталазы в крови экспериментальных животных увеличивалась на 50%, причем никаких нежелательных иммунных реакций не развивалось.

Стимулировать и активировать ферменты можно с помощью иммобилизованных ферментов. Хорошо известно, что протеолитический фермент плазминоген находится в плазме крови в неактивном состоянии и может быть превращен в активный фермент — плазмин — при помощи стрептокиназы. Активация плазминогена изучалась при использовании иммобилизованной стрептокиназы, которую получали путем химической иммобилизации на сополимере β -фенилаланина и лейцина. Активация лучше всего проходила в присутствии казеина. Другие белки (γ -глобулин, альбумин, фибриноген) оказались менее эффективны в этом отношении. Лиофилизация иммобилизованной стрептокиназы сохраняет активность био-препарата в течение нескольких недель.

В последние годы появилось большое число работ, освещающих клинические аспекты изучения кининовой системы, которая играет большую роль при различных патологических процессах в организме. Вместе с тем многие аспекты этого вопроса остаются еще не решенными, в частности, мало изучены условия активирования

компонентов системы. В работе Г. А. Яровой и соавт. (1974) показана возможность успешного активирования калликреиногена иммобилизованным трипсином. Трипсин предварительно модифицировали сополимером малеинового ангидрида и акриловой кислоты. Иммобилизацию такого фермента осуществляли путем сорбции на ДЭАЭ-сефадексе А-50. Трансформацию калликреиногена плазмы крови человека в калликреин иммобилизованным трипсином проводили в 0,01 М фосфатном буфере при рН 8,2 и 25°C в течение 15 мин. Активация калликреиногена в этих условиях дает лучший результат, чем активация свободным трипсином. Предложенный метод позволяет проводить быстрое отделение иммобилизованного трипсина от калликреина, что, как известно, в обычных условиях представляет определенные трудности, поскольку трипсин и калликреин близки по субстратной специфичности.

Применение ферментных препаратов для коррекции гипо- и дисферментозов желудочно-кишечного тракта является неременным условием успешного лечения заболеваний органов пищеварения. В частности, ахилия, сопровождающая некоторые хронические гастриты, сопутствующая болезням кишечника, печени, поджелудочной железы, а также возникающая при интоксикациях и стрессах различного генеза, в большой степени нивелируется систематическим приемом пепсина, обычно в сочетании с хлористоводородной кислотой (ацидинпепсин, пепсидил, бетацид, аципепсол, пепсамин, пепсацид, ацидолпепсин, сальпепсин) или в виде натурального желудочного сока. Последний содержит, кроме пепсина, все остальные ферменты нормального желудочного сока, в том числе гастромукопротеин. Полиферментным протеолитическим препаратом является также абомин, получаемый из слизистой оболочки желудка телят и ягнят молочного возраста и высокоэффективный при нарушениях переваривающей способности секретов желудка, тонкой кишки и поджелудочной железы. Снижение внешнесекреторной функции поджелудочной железы и связанные с этим нарушения пищеварения весьма успешно и достаточно надежно корригируются назначением панкреатина, содержащего главным образом трипсин и амилазу, а также другими полиферментативными препаратами. Из них наибольший интерес представляют холензим, полизим, фестал, панзинорм, мексаза.

Кроме панкреатитов, показаниями к назначению этих препаратов являются истощение ферментных систем при хронических, в том числе постдизентерийных, энтероколитах, нарушение функций печени в результате острых и хронических вирусных гепатитов и циррозов печени, угнетение активности ферментов желудочно-кишечного тракта в условиях длительной антибиотикотерапии, гипокинезии (например, у тяжело больных инфарктом миокарда, инсультами, в послеоперационном периоде и т. д.).

Полизим содержит пепсин, трипсин, амилазу, липазу, целлюлазу и гемицеллюлазу, а также желчные кислоты; панзинорм — липазу, трипсин, химотрипсин, амилазу, экстракт желчи, аминокислоты. Ценность обоих препаратов состоит не только в высокой замещающей способности комплекса содержащихся в них компонентов, но и в стимуляции выделения собственных ферментов железистыми клетками органов пищеварения. Например, желчные кислоты возбуждают выделение панкреатической липазы, активируют ее и стимулируют отделение желчи; аминокислоты стимулируют секрецию желудочного сока и ферментов кишечника и поджелудочной железы.

Почти всеми достоинствами полизима и панзинорма обладает мексаза, содержащая смесь растительных протеолитических ферментов (в виде бромелина), панкреатин и дегидрохолевую кислоту, оказывающую желчегонное действие и стимулирующую экскреторную функцию поджелудочной железы.

Уникальность препарата создает присутствие в нем производных 8-оксихинолина и фенантролинхинона, что придает мексазе свойства кишечного эубиотика и расширяет показания к ее применению.

Эффективность названных выше препаратов может быть увеличена при помощи создания их иммобилизованных форм.

ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ В КАЧЕСТВЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Протеолитические ферменты давно использовались для лечения злокачественных опухолей. История этого вопроса довольно подробно излагается в монографии М. Вольфа и К. Ранбергера (1976).

В настоящее время для ферментной терапии опухолей наиболее перспективными следует признать, по-видимому, аспарагиназу и аргиназу. L-аспарагиназа — фермент, расщепляющий аспарагин на аспарагиновую кислоту и аммиак.

Аспарагин является незаменимым фактором для опухолевых клеток, поэтому разрушение его тормозит рост новообразования. Установлено, что L-аспарагиназа подавляет размножение опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*.

L-аспарагиназа, выделенная из *E. coli* и очищенная при помощи хроматографии на гидроксилалатите, значительно замедляет рост опухолей Типог В. W. 5147 и Р 1534 у мышей. Дальнейшие исследования подтвердили значительную противоопухолевую и антилейкозную активность аспарагиназы. Введение подопытным мышам аспарагиназы в инкапсулированной форме эффективно подавляет рост трансплантированной лимфосаркомы и задерживает ее развитие больше, чем при инъекции обычного раствора иммобилизованной аспарагиназы.

Согласно имеющимся данным, аспарагиназа (как в капсулах, так и без них) задерживает рост имплантированной лимфосаркомы в эксперименте *in vivo*. Показано, что введение больших доз аспарагиназы в инкапсулированном виде переносится организмом значительно легче, чем введение свободного фермента в растворе.

Еще в 1964 г. была показана возможность обработки крови *in vitro* с помощью иммобилизованных (инкапсулированных) ферментов. Позднее для обработки крови вне организма было предложено использовать особые реакторы с иммобилизованными биопрепаратами. Показана, например, возможность перфузии крови через реактор с иммобилизованной L-аспарагиназой (Olanoff L. B. et al., 1975). В качестве носителя применяли коллаген. Набухший коллаген суспендировали в водном растворе фермента, гомогенизировали, смесь высушивали, измельчали и обрабатывали глутаровым альдегидом. Иммобилизованную L-аспарагиназу (2,7 г) помещали в сосуд из пластика, через который прокачивали кровь подопытной собаки. В результате 2-часовой перфузии содержание аспарагина в крови снижалось на 36—47%.

Активность иммобилизованного фермента практически не менялась в течение 4 мес работы реактора. Показано, что коллаген как носитель является вполне биосовместимым материалом и может иметь практическое применение.

Разработан также реактор, в котором в качестве носителя используются полиэфирные (дакроновые) волокна. Реактор содержит стационарный слой дакроновых волокон, на которых с помощью аминопропилтриэтоксисилана и глутарового альдегида иммобилизована L-аспарагиназа. Использование такого реактора позволяет достигнуть значительного снижения содержания аспарагина в плазме крови. Иммобилизованная аспарагиназа, как и находящийся в свободном состоянии в растворе фермент, имеет оптимум рН 7,5. Представляет также интерес применение реактора с L-аспарагиназой, иммобилизованной на коллагеновых мембранах. Иммобилизованный таким образом фермент сохранял свою активность длительное время (Venkatasubramanian K. et al., 1974).

ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ В АКУШЕРСТВЕ И ГИНЕКОЛОГИИ

Протеолитические ферменты, а также их иммобилизованные формы с успехом используются в гинекологии. Парентеральное введение трипсина и химотрипсина дает хорошие результаты при лечении ряда острых и хронических гинекологических заболеваний. Иногда рекомендуется введение этих ферментов при помощи электрофореза, что способствует быстрому рассасыванию послеоперационных инфильтратов и улучшению общего состояния больных.

Наибольший интерес представляет использование в акушерстве и гинекологии иммобилизованных на ПВС препаратов йода (йодинолы). Имеются данные об эффективном использовании йодинола как средства профилактики маститов в послеродовом периоде, при терапии трихомониаза половых органов женщины, а также средства обеззараживания рук в акушерском стационаре.

Начиная с 1959 г. в I ЛМИ проводилось клиническое изучение антисептических свойств йодинолов в акушерско-гинекологической практике (Хечинашвили Г. Г.

и др., 1979). На основании многолетних наблюдений была установлена высокая антимикробная, фунгицидная и протистоцидная активность и нетоксичность водных и водно-глицериновых растворов йодиола. Аналогичные результаты были получены при использовании других иммобилизованных препаратов йода, а именно йодистого крахмала. Большим преимуществом указанных препаратов перед другими антисептиками является также их дешевизна и большая стойкость при длительном хранении. Любой из указанных препаратов в случае необходимости может быть легко приготовлен из доступных ингредиентов в условиях аптеки.

Йодсодержащие (со)полимеры успешно применялись амбулаторно и в стационаре для лечения кольпитов у беременных и небеременных женщин, послеродовых инфицированных ран и язв промежности, трещин сосков, для профилактики маститов. Эффективность йодиолбората была показана при санации влагалища у беременных женщин, подлежащих досрочному родоразрешению по медицинским показаниям путем преждевременной амниотомии. Большим преимуществом йодиолбората перед другими йодполимерами является то, что он содержит два мощных антисептика — йод и борную кислоту, которые при иммобилизации теряют свою токсичность и раздражающее действие на ткани. Санация влагалища иммобилизованными препаратами йода совершенно безвредна для матери и плода, позволяет предупреждать возможные септические осложнения в послеродовом периоде.

Клинические наблюдения показали, что в результате местного применения йодполимеров происходит быстрое купирование воспалительного процесса, улучшаются трофика тканей и эпителизация раневых поверхностей, а при кольпитах ускоряется исчезновение патологических элементов в выделениях из влагалища.

В ряде акушерских клиник йодсодержащие полимеры нашли широкое применение в качестве средства профилактики офтальмобленнорей у новорожденных.

Несомненным преимуществом йодполимеров перед азотнокислым серебром и некоторыми антибиотиками, используемыми для профилактики бленнорей, является то, что их активность сохраняется длительное время, и поэтому отпадает необходимость в ежедневном приготовлении свежих растворов.

Персоналу акушерского стационара в течение рабочей смены приходится прибегать к неоднократной обработке рук. Частое мытье рук с применением дезинфицирующих средств нередко приводит к заболеваниям кожи. То, что йодиол не оказывает раздражающего действия на ткани, побудило использовать его для дезинфекции рук персонала родильного и детского отделений. После обычного мытья (водой и мылом) руки опускали на 1—2 мин в тазик с 1% водным раствором йодиола. В течение всей рабочей смены раствор йодиола в тазике не меняли. Регулярные бактериологические исследования смывов с рук после их обработки йодиолом роста бактериальной флоры не обнаруживали.

Для усиления антисептического действия йода и создания более удобной в применении лекарственной формы были исследованы препараты J=ПВС в виде пленки (Хечинашвили Г. Г. и др., 1979). Пленки получали по известной методике йодированием чистых ПВС-пленок в насыщенном растворе хлорида натрия. Кроме того, был разработан метод получения этих пленок из водных растворов J=ПВС. Для улучшения механических свойств пленок и их физиологического действия в состав пленок добавляли глицерин. Применение глицериновых J=ПВС пленок в клинике дало положительные результаты.

ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ В СТОМАТОЛОГИИ, ОТОРИНОЛАРИНГОЛОГИИ И ОФТАЛЬМОЛОГИИ

Протеолитические ферменты оказались весьма эффективным средством для лечения пульпитов, пародонтоза, периодонтитов и других заболеваний зубов и полости рта. Кариозную полость рекомендуют обрабатывать растворами трипсина или химотрипсина (в отношении 1:5000), желательнее вместе с антибиотиками. Химотрипсин, а также дезоксирибонуклеаза с антибиотиками могут применяться для освобождения от некротических очагов пульпы, что способствует предупреждению воспалительного процесса (Веремеенко К. Н., 1971). Для лечения периодонтитов применяют смесь протеолитических ферментов, антибиотиков и витамина Е. Целесообразно включать в состав различных стоматологических материалов (поверхностные слои базисных

протезов, пломбировочные пасты) биологически активные соединения (Макаров К. А., 1979; Ботовский В. И. и др., 1979). Пломбировать зубные каналы рекомендуется пастой с иммобилизованными в ее структуру протеолитическими ферментами. В стоматологической практике ферменты применяют также в виде полосканий и аэрозолей.

Используются обычно протенназы животного происхождения, но нередко применяют также протеолитические ферменты, выделенные из микроорганизмов (проназа).

В настоящее время остро стоит проблема уменьшения осложнений, возникающих в результате инфицирования в области наложения металлических каркасов на челюсти и при внутрикостном внедрении металлических имплантатов. Решение этой задачи связано с возможностью получения нетоксичных, дающих антисептический эффект пленок на поверхности используемых в стоматологии имплантатов из металла. Разработаны методы совместной иммобилизации антисептиков, антибиотиков, анестетиков, ферментов и ряда других лекарственных соединений на поверхности стоматологических протезов (Макаров К. А., 1977).

В эксперименте показана возможность иммобилизации новокаина и морфоциклина путем их включения в структуру геля ПВС. Формирование геля на поверхности стоматологического имплантата проводили под влиянием γ -облучения. Были подобраны условия, позволяющие совместить процесс образования геля на поверхности стоматологического имплантата с процессом его стерилизации. Совместную иммобилизацию фурацилина и новокаина осуществляли путем включения их в структуру гелей из (со)полимеров винилового спирта, винилпирролидона и виналамина, полученных под влиянием стерилизующих доз γ -радиации. Токсикологические исследования, проведенные путем подкожной имплантации крысам и кроликам препаратов ПВС, содержащих новокаин и морфоциклин, показали, что они не оказывают токсического действия на животных. Установлена эффективность использования этих препаратов при создании дренажей, изготовлении тампонов и шовных материалов (Хацкевич Г. А. и др., 1977). Электрохимическая иммобилизация биоактивных веществ в структуре ПВС методом его катодного осаждения основана на

свойстве ПВС образовывать нерастворимое соединение с борной кислотой.

Для создания антисептических поливинилспиртовых покрытий необходимо ввести различные антимикробные вещества (фурацилин, мономицин и т. д.). В полученный раствор опускают металлический имплантат и присоединяют его к отрицательному полюсу источника постоянного тока. Антимикробное вещество включается в структуру поливинилспиртового покрытия, образуя его на поверхности металлического имплантата.

Содержание в покрытиях антимикробного вещества зависит от его концентрации в объеме раствора и толщины покрытия, которая определяется составом раствора, плотностью тока и продолжительностью процесса. Например, при плотности тока 5 mA/cm^2 в течение 15 с из насыщенного водного раствора фурацилина, содержащего поливинилловый спирт (10%) и борную кислоту (0,5%), на поверхности металлической шины из титана образуется поливинилспиртовое покрытие толщиной 0,1 мм, в котором находится фурацилин.

Полученные антисептические поливинилспиртовые покрытия прошли микробиологические испытания и исследования в эксперименте на животных, давшем хорошие результаты.

Модификация стоматологических имплантатов из титана и стали проводилась также путем иммобилизации фурацилина в структуру силоксановых гелей, получаемых методом сшивки низкомолекулярных силоксановых олигомеров (типа КГЖ) в хлороформе (Макаров К. А., Зытнер Я. Д., 1979). Необходимо отметить, что иммобилизуемый антисептик — фурацилин — выступает также в роли катализатора отверждения.

В оториноларингологии используются почти исключительно протеолитические ферменты. Они нашли применение при заболеваниях верхнечелюстной пазухи, среднего уха (как острых, так и хронических), а также в комплексной терапии рака гортани (Веремеенко К. Н., 1971). Ферментные препараты используются в виде аэрозольных ингаляций, аппликаций, а также внутримышечно. Хорошие результаты дали трипсин и α -химотрипсин при терапии воспалительных процессов полости носа. Установлено, что трипсин и химотрипсин способствуют быстрому очищению верхнечелюстной пазухи от гнойных экссудатов. Иммобилизованные препараты про-

теолитических ферментов с успехом применяются для лечения гнойных отитов в виде эмульсии в глицерине. Эмульсии протеолитических ферментов обладают высокой стабильностью. Протеолитические ферменты поджелудочной железы успешно используются в терапии отосклероза. Очень эффективно применение протеолитических ферментов для лечения стенозирующих трахенитов (Веремеенко К. Н., 1971). Препараты протеолитических ферментов используются и при лечении острых невритов лицевого нерва, а также в терапии острых ларингитов как у взрослых, так и у детей.

Широкое применение в оториноларингологии находят препараты иммобилизованного йода. 4—5-кратное промывание йодином лакун миндалин и супратонзиллярного пространства, как правило, купирует обострение воспалительного процесса. Положительный эффект йодиола получен и в терапии гнойных отитов. В зависимости от стадии болезни проводят закапывание 5—8 капель 1% водного раствора препарата или промывание наружного слухового прохода. Длительное (в течение 2—3 мес) орошение слизистой оболочки носа йодином улучшает самочувствие больных хроническим атрофическим ринитом, в том числе оzenой.

В офтальмологии протеолитические ферменты используются при гнойно-воспалительных заболеваниях глаз. Ферменты вводят в виде капель, субконъюнктивальных инъекций или глазных ванночек, что облегчает течение конъюнктивитов, кератитов, травм глазного яблока. Часто и в этих случаях ферменты вводят совместно с антибиотиками. Результаты клинических наблюдений над 400 больными приводят к выводу, что применение α -химотрипсина при катаракте дает положительный эффект (Веремеенко К. Н., 1971).

Внутримышечные инъекции протеолитических ферментов рекомендованы при воспалительных заболеваниях глаз, а также для облегчения послеоперационного процесса: ликвидации отеков, уменьшения кровоизлияний в среды глаза. Внутримышечное и внутривенное введение тромболитина совместно с антикоагулянтами дает хороший результат при лечении острого тромбоза сосудов сетчатки глаз (Веремеенко К. Н., 1971).

Широкое применение в офтальмологии нашли иммобилизованные препараты на основе ПВС. Предложено применять ПВС с молекулярной массой 76 000 в качест-

ве носителя пилокарпина для глазных капель. На основе 5 и 10% раствора ПВС готовили 2% раствор пилокарпина. Он оказался стойким, легко стерилизовался кипячением в водной бане. При инстилляции в конъюнктивальный мешок раствор ПВС хорошо смешивается со слезной жидкостью и постепенно освобождает растворенный в нем пилокарпин. Одна молекула ПВС удерживает несколько молекул пилокарпина, тем самым доставляя в межклеточные пространства роговицы больше лекарственного вещества, чем молекулы воды. Исследования здоровых лиц показали, что растворы ПВС не вызывают неприятных ощущений, не раздражают слизистую оболочку глаза, не повреждают эпителий роговицы. Установлено, что ПВС хорошо растворяет сульфаниламиды (этазол-натрий, сульфацил-натрий, сульфацил-пиримидин-натрий), антибиотики, атропин, хлорид кальция, сульфат цинка, дикаин и дионин (при подогревании). Клинические и экспериментальные данные о действии растворов антибиотиков, иммобилизованных на основе ПВС (Майчук Ю. Ф., Тишина И. Ф., 1971), подтвердили нетоксичность ПВС для сред глаза. Преимуществом является то, что растворы на ПВС после инстилляции в конъюнктивальный мешок в отличие от мазевой основы создают прозрачную пленку, не вызывая даже кратковременных нарушений зрения. Благодаря этим же экспериментальным исследованиям установлено, что в качестве пролонгирующей полимерной основы для антибиотиков и сульфаниламидов может применяться 1% раствор полнакриламида.

Успешное использование поливинилового спирта как пролонгатора действия антибиотиков позволило разработать в глазной практике метод применения антибиотиков в пленках ПВС (Майчук Ю. Ф., 1964, 1973). Пленки готовили из 10% раствора ПВС и вводили в конъюнктивальный мешок под нижнее веко. При смачивании слезной жидкостью пленка становится мягкой, больные вскоре перестают чувствовать инородное тело в глазу. Через 3 ч либо удаляют ее пинцетом, либо она самопроизвольно собирается у внутреннего угла глаза в виде слизистого комочка. Иммобилизация антибиотиков в растворах и пленках ПВС приводит к выраженному пролонгированию действия антибиотика и в значительной степени увеличивает проникновение препарата в ткани и жидкости глаз, обеспечивая необходимую те-

рапевтическую концентрацию в течение суток. В этом отношении пленки ПВС имеют значительное преимущество перед другими способами введения антибиотиков. Недостатком пленок является необходимость их удаления из конъюнктивального мешка. Глазные лекарственные пленки, созданные на полимерной основе, включающей акриламид и его сополимеры, имеют те же пролонгирующие свойства, что и пленки ПВС, но отличаются способностью рассасываться в конъюнктивальном мешке (Майчук Ю. Ф., Тишина И. Ф., 1971). В эксперименте была показана возможность получения более эластичных иммобилизованных препаратов пилокарпина на ПВС путем введения в состав композиции глицерина (Джалнашвили О. А. и др., 1979). Одновременно в эксперименте на кроликах была показана возможность совместной иммобилизации пилокарпина и атропина. Изучено миотическое и мидриатическое действие иммобилизованных препаратов на основе пленок ПВС.

ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ

В терапии некоторых острых и хронических бронхолегочных заболеваний, особенно в тех случаях, когда необходимо быстрое разжижение вязких секретов и экссудатов, широко используются протеолитические ферменты (Веремеенко К. Н., 1971). Лечение этими ферментами эффективно при острых и хронических ларингитах, бронхитах, пневмониях.

Протеолитические ферменты нашли применение при лечении заболеваний дыхательных путей в тех случаях, когда имеется скопление гнойных масс и нарушена проходимость бронхов (Тараненко М. И., Голосюк Д. И., 1970). При бронхитах парентеральное лечение ферментами приводит к уменьшению отека слизистой оболочки бронхов, разжижению мокроты, что облегчает ее удаление, и к ослаблению кашля. Протеолитические ферменты (трипсин, химотрипсин) или их смесь применялись также при гнойных заболеваниях плевры. После пункции в плевральную полость вводят 5—20 мг протеолитических ферментов ежедневно в течение 10—30 дней. Под действием ферментов экссудат разжижается и его легко удалить из плевральной полости.

Эффективно местное применение протеолитических

ферментов для лечения послеоперационных осложнений. Часто препараты протеолитических ферментов используют для профилактики. Так, в группе больных, которым назначали ферменты с профилактической целью, послеоперационных осложнений наблюдалось в 2—4 раза реже по сравнению с больными, не получавшими эти препараты. Протеолитические ферменты улучшают результаты лечения туберкулеза. Были сообщения об успешном применении трипсина и химотрипсина более чем у 2000 больных туберкулезом легких (Богуш Л. К. и Шварцман Л. Я., 1970). Ферментные препараты использовали вместе с антибиотиками. Повышая проницаемость тканей, ферменты способствуют проникновению антибиотиков в очаг поражения. С помощью ферментов удавалось добиться обратного развития туберкулезного процесса и сокращения сроков лечения. Необходимо учитывать, что при назначении протеолитических ферментов наблюдаются иногда аллергические явления. Однако в целом протеолитические ферменты служат эффективными вспомогательными терапевтическими средствами, особенно если туберкулез сопровождается хроническим бронхитом.

В эксперименте нами изучалась возможность иммобилизации названных выше ферментов в структуре различных синтетических и природных сополимеров. Выбор метода иммобилизации и природы (со)полимерного носителя основывался на данных о свойстве фермента и способах его дальнейшего использования. В эксперименте на животных была показана эффективность иммобилизации протеолитических ферментов на сополимерах — плазмозаменителях, а также в структуре слабосшитых гидрогелей на основе ПВС и ПВП.

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ПРЕПАРАТЫ В ТЕРАПИИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Перспективы и возможности применения иммобилизованных препаратов, особенно с антимикробным, противовирусным и антипротозойным действием, в клинике инфекционных болезней весьма велики, но используются в настоящее время недостаточно полно. Наиболее изучены иммобилизованные препараты йода, которые применяются в комплексном лечении больных с инфекционными поражениями желудочно-кишечного тракта.

В терапии острых кишечных инфекций иммобилизованные на крахмале препараты йода впервые применил В. О. Мохнач в 1942 г. В дальнейшем была изучена антимикробная активность этого препарата и выявлен его бактериальный эффект в отношении микробов кишечной группы, грибов рода *Candida*, многих грамположительных бактерий, а также определенная противовирусная активность. Последующие наблюдения показали нетоксичность препарата, отсутствие серьезных побочных эффектов при его применении, успешное бактериальное очищение кишечника и небольшое снижение сроков пребывания больных в стационаре.

Такого же рода полезные свойства проявил и йодполивинилалкоголь, сначала в форме йодиола, а затем полийодина (повилор-2). Оказалось, что йодполивинилалкоголь неантигенен, нетоксичен и не вызывает пирогенных реакций при любом способе введения в организм животных и, кроме антимикробных свойств, обладает также способностью стимулировать фагоцитарную активность лейкоцитов.

Обстоятельное клинико-иммунологическое изучение йодиола в комплексной терапии дизентерии у детей и взрослых выявило положительное влияние его на течение острой дизентерии, а также на процессы саногенеза при этой инфекции (Шувалова Е. П., 1961, 1964). Детям препарат назначали в дозе 5—10 мл 1% раствора, взрослым — по 30 мл перорально и 50 мл в клизме. В группе больных, получавших йодиол, наблюдалась более быстрая нормализация стула, ускорялась репарация слизистой оболочки толстой кишки. Было показано также, что после проведенного курса терапии антибиотиками повторное выделение дизентерийных бактерий имело место у 15% больных, а при лечении больных антибиотиками и йодиолом — у 11%. Одновременно было выявлено важное обстоятельство: в случае сочетанного применения антибиотиков с йодиолом наблюдалось снижение процента высеваемости резистентных к антибиотикам культур шигелл и пределов колебаний устойчивости (в 44% случаев с пределами колебаний устойчивости 0,2—250 мкг/мл против 73% с пределами колебаний устойчивости 0,06—1000 мкг/мл при лечении только антибиотиками). Под влиянием терапии йодиолом происходило также нарастание общего количества лейкоцитов, в том числе палочкоядерных, в перифе-

рической крови, более часто отмечались высокие титры комплемента в сыворотке крови больных дизентерией. Результаты этих исследований позволили отнести йодиол к группе препаратов неспецифического стимулирующего действия.

В последние годы в Ленинградском институте гематологии и переливания крови Министерства здравоохранения РСФСР и в Институте высокомолекулярных соединений АН СССР был создан более устойчивый для перорального применения таблетированный препарат йодполивинилалкоголя, предложенный, главным образом как средство профилактики и терапии начальных стадий атеросклероза и тромбооблитерирующих поражений сосудов. Наибольший интерес в клинике инфекционных болезней представляют результаты терапии ИПВС затяжных и субклинических форм дизентерии и сальмонеллеза с длительным бактериовыделением (Шувалова Е. П., 1975; Фаворский М. С. и др., 1975). Препарат назначали по 1 таблетке 3 раза в день в течение 14—20 дней. Авторами показано, что в контрольной группе больных, не получавших таблеток йодполивинилалкоголя, повторное бактериовыделение микробов кишечной группы после проведенного курса лечения наблюдалось у 43%, главным образом у бактериовыделителей сальмонелл. В группе больных, получавших наряду с другими препаратами стимулирующего действия I-ПВС, санации не удалось достигнуть у 20,6% больных. Подавляющее большинство случаев неэффективности терапии наблюдалось среди больных с затяжными и субклиническими формами сальмонеллеза, но следует подчеркнуть, что I-ПВС назначался бактериовыделителям сальмонеллезной группы бактерий, как правило, после повторных и безуспешных курсов терапии антибиотиками, нитрофуранами, оксихинолинами и сальмонеллезным бактериофагом. Это позволяет рассматривать полученные результаты терапии сальмонеллеза препаратами I-ПВС как весьма положительные.

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ПРЕПАРАТЫ В НЕФРОЛОГИИ

Лечение больных хронической и острой почечной недостаточностью с помощью искусственной почки становится обычным. Только в Европе в 1978 г. этот вид терапии получило 75 000 больных. Однако работы по

усовершенствованию этого метода активно продолжают. Одним из факторов повышения эффективности работы искусственной почки является совершенствование сорбционной очистки диализирующего раствора от продуктов метаболизма, что позволяет снизить общий объем диализата, время проведения гемодиализа и уменьшить выделение из организма больного некоторых жизненно важных веществ (витамины, гормоны, аминокислоты).

Успешное решение этой задачи зависит от правильного выбора сорбента. Наиболее целесообразно сочетать несколько типов сорбционных материалов, так как универсального сорбента для поглощения и органических и неорганических составляющих диализирующего раствора не существует. Нами (Макаров К. А., Сахарова Е. А. и др., 1979) получены результаты испытаний *in vitro* системы колонок для очистки диализирующего раствора аппарата типа «Sasko»: 1) колонка с активированным углем СКТ-2А; 2) колонка с иммобилизованной уреазой; 3) колонка с неорганическим фосфорносурьмяным катионитом PSb—27. Колонка с иммобилизованной уреазой предназначалась для ферментативного разложения мочевины с образованием ионов аммония. Иммобилизация уреазы на сетчатом полимере позволяет проводить разложение мочевины без введения уреазы непосредственно в диализующий раствор. Колонка с фосфорносурьмяным катионитом была предназначена для сорбции избытка калия, а также ионов аммония, выделяющихся при ферментативном разложении мочевины. Выбор неорганического фосфорносурьмяного катионита определялся его селективными свойствами и отсутствием сорбции органических ионов и молекул. Данный катионит разработан специально для очистки биологических сред от электролитов. Он применяется в виде композиционного материала (порошок катионита с тромборезистентным связующим — фторопластом Ф-26), который может быть получен в форме пластин, трубок, нитей. В данной работе использовали колонки с нитевидными композициями.

Исследование концентрации электролитов, мочевины, креатинина и осмолярности диализата на входе и выходе АИП проводилось биохимическими методами, применяемыми при анализе крови больных, находящихся на лечении с помощью программного гемодиализа.

Подключение колонок в стендовых испытаниях было двух типов: 1) колонка с активированным углем, колонка с иммобилизованной уреазой, колонка с катионитом; 2) колонка с иммобилизованной уреазой, колонка с активированным углем, колонка с катионитом. Первая схема включения предпочтительнее, так как активированный уголь в этом случае играет роль не только адсорбента, но и механического фильтра непосредственно перед колонкой с ферментом. Данные показали, что при пропускании диализующего раствора через активированный уголь происходит практически полная сорбция креатинина и частичная сорбция мочевины (снижение концентрации в растворе от 58 до 4,3 ммоль/л); сорбции K^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} не наблюдается.

После колонки с активированным углем диализат поступал в колонку с иммобилизованной уреазой, в результате чего концентрация мочевины в суммарном объеме снижалась до 3,4 ммоль/л. В результате ферментативного разложения мочевины в растворе появился ион аммония. Наибольшее разложение мочевины наблюдалось в первых порциях фильтрата. Сорбции калия не происходило, концентрация кальция уменьшалась, по-видимому, за счет сорбции сетчатым полимером, на котором была иммобилизована уреазы.

После колонки с уреазой раствор с содержанием аммония был пропущен через колонку с катионитом. В результате содержание аммония в растворе резко упало.

На основании проведенных опытов можно сделать заключение о принципиальной возможности очистки диализующего раствора АИП сочетанием разложения мочевины иммобилизованной уреазой с сорбцией отдельно органических и неорганических компонентов раствора.

Исследовались также условия очистки диализата от мочевины (Uг), креатинина (Сг), а также контролировался электролитный сплав диализата с помощью сорбентов на основе производных целлюлозы и многокомпонентных сополимеров. При изучении режимов очистки диализата статистическим и динамическим методами подтверждено, что наиболее эффективное удаление Uг и Сг достигается в динамическом режиме. При исследовании сорбентов производных целлюлозы и (со) полимеров на основе винилпирролидона и акрилатов

было установлено, что скорость пропускания диализата, количество сорбента, размер колонок существенно влияют на полноту очистки диализата. Показано, что насыщение сорбента U_g и S_g зависит от количества пропущенного через него диализата; для сополимеров винилпирролидона с акрилатами эта величина равна 10 л на 1 кг сорбента, для производных целлюлозы — 4 л на 1 кг сорбента.

ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ БИОПРЕПАРАТОВ В ХИРУРГИИ

Развитие современной хирургии, реализация перспективных идей во многом зависят от правильного выбора методов создания и применения синтетических материалов. В их число, кроме органических полимеров, уже прочно вошли материалы неорганической природы (стекло, керамика), различные металлы и их сплавы. Возникла необходимость создания сложных композиций, сочетающих высокую механическую прочность металлов, эластичность органических полимеров и содержащих вместе с тем в поверхностном слое биологически активные молекулы (антикоагулянты, ферменты, антибиотики, антисептики). Включение биологически активных, в том числе лекарственных, препаратов в поверхностные слои медицинских материалов успешно осуществляется путем их иммобилизации на поверхностях искусственных протезов (кровеносных сосудов, клапанов сердца), а также других медицинских изделий и инструментов — катетеров, хирургических волокон, перевязочных материалов, противоожоговых повязок и стоматологических протезов (Макаров К. А., 1978).

Наиболее широкое применение методы иммобилизации нашли в создании материалов, контактирующих с кровью. К этим материалам, кроме обычных требований (нетоксичность, неканцерогенность, устойчивость к воздействию биологических сред и стерилизации), предъявляют и специфические требования, а именно тромборезистентность. Получение тромборезистентных материалов в значительной степени определяет успехи в создании искусственного сердца с автономным источником питания, в совершенствовании аппаратов искусственного кровообращения (АИК), искусственной почки (АИП),

протезов кровеносных сосудов и искусственных клапанов сердца. Изучение процессов тромбообразования на поверхностях различных материалов позволило определить материалы, обладающие наибольшей тромборезистентностью. К ним относятся различные виды силиконовых резин, фторопласты, полиуретаны, разновидности углерода (пироуглерод, стеклоуглерод и др.). Изучение влияния различных факторов, характеризующих поверхностные свойства материалов (текстуры и микронеровностей; критического поверхностного натяжения; величины Z-потенциала, образующегося при контакте поверхности материала с кровью и т. д.), показало, что ни один из них в отдельности не коррелирует с тромборезистентными свойствами материалов. Оказалось, что тромборезистентные свойства поверхности материалов определяются преимущественно характером сорбируемых этой поверхностью (в первый момент ее контакта с кровью) различных компонентов крови, в основном белков и мукополисахаридов.

В связи с этим крайне перспективной для создания тромборезистентных поверхностей представляется иммобилизация на них антикоагулянтов, белков и ферментов, которые препятствуют адгезии и агрегации тромбоцитов или катализируют гидролитическое расщепление фибрина, приводящее к лизису тромба. Обращает на себя внимание тот факт, что различные белки плазмы крови обладают неодинаковой коагуляционной способностью. Известно, что если на гидрофобном полимерном покрытии провести предварительную сорбцию альбумина, то на такую поверхность тромбоциты практически не оседают. Наоборот, если на поверхности полимерного покрытия адсорбирован γ -глобулин или фибриноген, то такая поверхность обладает большими тромбогенными свойствами (Смурова Е. В., Доброва Н. Б., 1976). Исследования этих же авторов показали, что сравнительно нетромбогенные поверхности давали более высокую степень адсорбции альбуминов по сравнению с другими белками, чем это происходит на тромбогенных материалах.

Наиболее перспективным в создании тромборезистентных материалов является метод, учитывающий электрохимические взаимодействия, происходящие при контакте поверхности материалов с кровью. Электрохимические подходы к созданию тромборезистентных материалов

основаны на предположении, что клеточные элементы крови, участвующие в тромбообразовании (тромбоциты), заряжены отрицательно и что, отталкивая их, поверхность материала препятствует свертыванию крови. Исследования показали, что анионные группы (COOH , SO_3H) мукополисахаридов, содержащихся в интима кровеносных сосудов, придают поверхности этих сосудов заряд от 12 до 15 мВ (Смурова Е. В., Добрава Н. Б., 1976). В связи с этим были проведены обширные исследования по созданию тромборезистентных материалов путем иммобилизации на поверхности этих материалов гепарина.

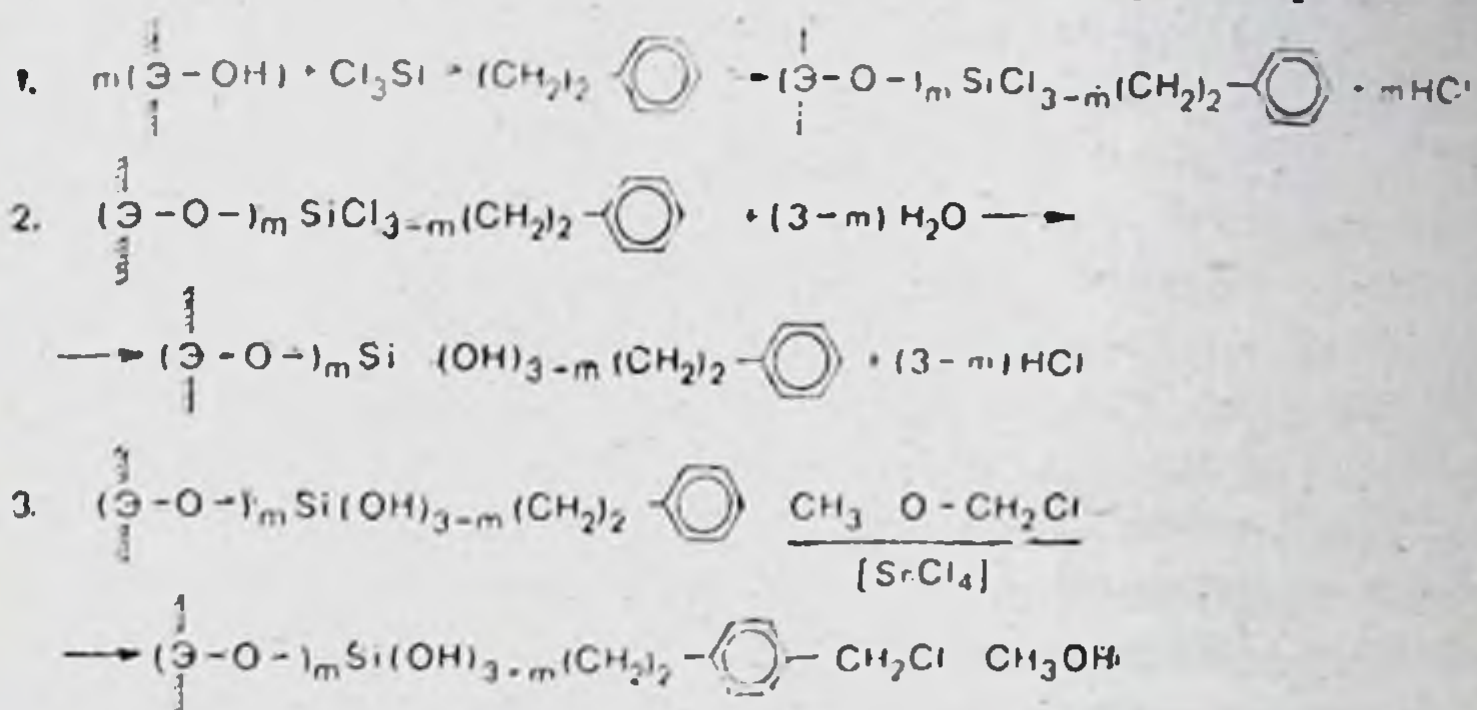
Иммобилизация гепарина на поверхность изделий, контактирующих с кровью *in vitro* (шприцы, катетеры, системы переливания крови, АИК, АИП и т. д.) и *in vivo* (протезы кровеносных сосудов, искусственные клапаны сердца), осуществляется физическими, химическими и электрохимическими методами. Первые тромборезистентные материалы получил Gott в 1969 г. путем физико-химической иммобилизации гепарина на графитированных поверхностях органических полимеров. По данным этого автора, кольцо из графитированного поликарбоната, на поверхности которого был адсорбирован комплекс гепаринбензалконийхлорид (ГБ), после имплантации в вену собаки оставалось проходимым 2½ года.

Были разработаны химические методы иммобилизации гепарина на поверхности неорганических и органических материалов (Березин И. В., 1976).

Разработанные нами (Постнов В. Н., Макаров К. А. и др., 1977) методы иммобилизации гепарина на кремнийсодержащих и титановых поверхностях использованы для иммобилизации гепарина на стеклянных фильтрах для службы крови, на поверхностях титановых протезов и других изделий медицинского назначения (рис. 1).

Изучались также методы предотвращения тромбообразования в полости искусственных желудочков сердца путем применения ГБ-комплекса. Для этой цели готовили адгезионную смесь, состоящую из коллоидного графита марки УТ-8 (размер частиц 0,5—1 мкм) и полихлорвинила, растворенного в тетрагидрофуране. После трехслойного покрытия и высушивания в течение 48 ч при температуре 50° С покрытие подвергали дальнейшей

обработке диметилдодецилбензиламмонием и гепарином по методу Готта. Модифицированное покрытие, нанесенное на отдельные части искусственного желудочка сердца (штуцеры из титана, клапаны из полиметилметакрилата и пр.), обладало более выраженной тромборезистен-



где Э = Ti, Zr, W, Si, Cr

Рис. 1. Синтез реакционноспособных центров для иммобилизации биологически активных веществ на поверхности медицинских изделий из неорганических материалов (титан, стекло, кварц).

тностью по сравнению с обычными покрытиями, например силиконовыми.

Успехи, достигнутые при гепаринизации поверхностей, позволили предположить, что с помощью гепарина, связанного сорбционно с поверхностью полимера, можно создать нетромбогенные материалы. Gott разработал также химические методы прививки четвертичных групп на некоторых полимерных поверхностях с тем, чтобы при последующем образовании комплекса этими группами с гепарином получить нетромбогенные поверхности. Простой контакт полученной таким образом поверхности достаточен для получения гепаринизированной поверхности.

Другой метод получения гепаринизированной поверхности состоит в предварительной обработке этих поверхностей различными поверхностно-активными веществами. Для этой цели использовались трубки из различных пластмасс, как покрытые полисилоксаном или коллоидным графитом, так и без покрытий. Испытуемые трубочки помещали в в. сава собак и наблюдали за образованием тромбов в течение 1 и 2 ч. Этот метод дает до-

статочно точную информацию о свойствах того или иного пластика образовывать тромбы. Время тромбообразования в трубках, покрытых графитом и обработанных любым из поверхностно-активных веществ, было немногим больше, чем время тромбообразования в стеклянных трубках, но меньше, чем в трубках, покрытых только графитом. Разработаны также методы иммобилизации гепарина радиационной прививкой (Березин И. В., 1976), электрохимической иммобилизацией и включением в структуру синтетических гидрогелей (Макаров К. А., Зытнер Я. Д., 1979). Комплекс гепарина — основание можно использовать в виде пленки или растворов в коллоидии или в каких-либо других полимерах. Эти комплексы легко растворяются в ацетоне, монометиловом эфире этиленгликоля, метилизобутилкетоне и других кислородсодержащих растворителях.

Было найдено, что растворы комплексов в монометиловом эфире гликоля совместимы с растворами целлюлозы. При нанесении смешанных растворов нитроцеллюлозы и комплекса основание — гепарин на полиэфирную пленку и другие субстраты с последующим выпариванием образовались прозрачные вязкие пленки, содержащие указанный комплекс, диспергированный в нитроцеллюлозе. ГБ-комплексы вводили в различные пленкообразующие полимерные материалы, которые исследовали на противосвертывающую активность.

Пленки изготовили из следующих полимеров: нейлона, тройного сополимера винилхлорида, винилацетата и малеинового ангидрида, полиакрилового эфира, ацетобутирата целлюлозы, сополимера винилхлорида с винилацетатом. Все пленки имели среднюю толщину 3,8 мкм и содержали приблизительно 0,3% ГБ-комплекса в полимерной матрице. Последние из указанных выше полимеров ослабляли противосвертывающее действие поверхности бензалконий — гепарин.

Иммобилизованный гепарин может быть использован при изготовлении тромборезистентных целлюлозных мембран для диализа крови. Было показано, что гепарин может адсорбироваться на аминированной целлюлозной ионообменной смоле. Аминирование поверхности целлюлозы производилось этиленимином с последующей обработкой пленок хлористоводородной кислотой. При контакте аминированной поверхности целлюлозы с раствором гепарина происходит его быстрая ад-

сорбция. Полученные результаты интересны тем, что связанный гепарин не смывается с пленки плазмой крови. Время образования сгустков крови на аминированной поверхности целлюлозы было равно 32 мин (для стекла 6 мин и для исходной целлюлозы 20 мин). Из аминированной целлюлозы изготавливают сосуды для хранения свежей крови и трубки для диализа.

Нами (Макаров К. А. и др., 1979) проведены опыты по иммобилизации гепарина, альбумина и трипсина на поверхность стеклянных микрофильтров крови для использования их в АИК. С целью закрепления биологически активных веществ на поверхности микрофильтров применялся ПВС. Процесс иммобилизации проводился следующим образом. В 0,2% водном растворе ПВС отдельно растворяли гепарин (10 мг/мл), альбумин (1 мг/мл) и трипсин (2 мг/мл). Затем в раствор ПВС, содержащей биологически активное вещество, опускали на сутки тщательно обезжиренные микрофильтры и поддерживали температуру 3° С. За процессом сорбции биологически активных веществ следили по уменьшению их концентрации в растворе ПВС, которая определялась спектрофотометрически.

После иммобилизации образцы высушивали при температуре 3° С до постоянной массы, затем подвергали действию стерилизующих доз γ -облучением для сшивки ПВС.

Качественные реакции на белок с применением амидошварца показали, что последний содержится в пленке ПВС на поверхности микрофильтров крови. Окраска образцов сохранялась даже после многократной отмывки от красителя 7% уксусной кислотой. В то же время образцы микрофильтров, полученные после выдерживания в водном растворе белка в отсутствие ПВС, имели менее интенсивную окраску. Это говорит о том, что белок прочнее фиксируется на поверхности микрофильтров, когда он входит в структуру пленки ПВС. Для микрофильтров крови с иммобилизованными биологически активными соединениями были определены гидродинамические характеристики и оценены тромборезистентные свойства поверхности по индексу адгезии тромбоцитов (ИАТ).

Полученные данные показывают, что иммобилизация некоторых биологически активных соединений, как и следовало ожидать, снижает адгезию тромбоцитов. Од-

нако уже после пропускания 200 мл крови наблюдается некоторое снижение производительности микрофильтров, что, по-видимому, связано с вымыванием биологически активных соединений током крови или с уменьшением их активности.

Полученные результаты говорят о принципиальной возможности использовать иммобилизованные биологически активные соединения для повышения тромборезистентности различных деталей, применяемых в АИК. Дальнейшие исследования должны быть направлены на поиск способов иммобилизации, позволяющих более прочно закреплять биологически активные соединения на поверхности деталей АИК, контактирующих с кровью.

Иммобилизация тромболизирующих ферментов является перспективным направлением в создании тромборезистентных материалов. Проводятся работы по иммобилизации, как ферментов протеолитического (в частности, фибринолитического) действия, так и препятствующих адгезии и агрегации тромбоцитов. Имеются первые положительные результаты в эксперименте по иммобилизации таких ферментов на внутренней поверхности кровеносных сосудов, поверхности искусственных клапанов сердца. Для химической иммобилизации на полимерных или металлических протезах тромболизирующих ферментов необходимо создать на поверхности этих материалов активные центры. С этой целью может быть использован метод твердофазного синтеза пептидов на этих поверхностях. Разработанный Меррифилдом метод твердофазного синтеза пептидов позволяет создать на поверхности различных органических полимеров биологически активные группы, которые могут быть использованы для иммобилизации различных биологически активных и лекарственных соединений. Показано, что расстояние между ферментом и поверхностью матрицы влияет на активность иммобилизованных ферментов.

V. Gottfal (1972) удалось на полистирольной матрице синтезировать полипептидные цепи, имеющие до десяти аминокислот. К свободному концу полипептидных цепей присоединяли молекулы трипсина. Активность таких иммобилизованных ферментов в значительной степени определялась длиной полипептидных цепей («ножек»).

Метод твердофазного синтеза пептидов может быть

использован для создания на поверхностях материалов (полимеры, металлы), контактирующих с кровью, биоспецифических (аффинных) лигандов, способных избирательно сорбировать определенные компоненты крови (гепарин, альбумин и др.), или для иммобилизации на поверхности тромболизирующих ферментов.

Иммобилизация тромболизирующих ферментов также может быть осуществлена методом включения этих ферментов в структуры гидрогелей, сформированных на поверхностях протезов, контактирующих с кровью. Нами проводилась иммобилизация альбумина, трипсина и гепарина в структуре гелей сополимеров винилового спирта и полисиликсанов, сформированных на поверхности изделий из титана (искусственные клапаны сердца, элементы макета искусственного сердца) (Макаров К. А. и др., 1979).

Для придания тромборезистентных свойств поверхностям различных материалов была использована иммобилизация на этой поверхности фибринолитического фермента урокиназы (Березин И. В., 1976).

Показано, что поверхности поликарбонатов, поливинилхлоридов и полиметилметакрилата, содержащие урокиназу, обладают тромборезистентной и фибринолитической активностью. Для увеличения сцепления фермента с поверхностью полимера проводились предварительное графирование ее и последующая сшивка адсорбированной урокиназы глутаровым альдегидом.

Разработанные нами схемы (рис. 2) синтеза пептидных группировок на кремнийсодержащих и титановых

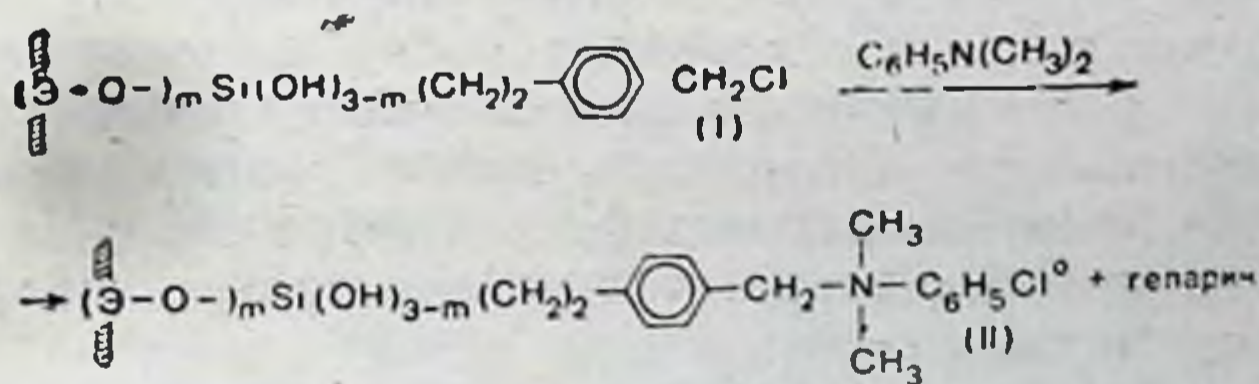


Рис. 2. Синтез активных центров на неорганических медицинских материалах для создания пептидных группировок (I) и иммобилизации гепарина (II).

поверхностях были использованы для синтеза биоспецифических лигандов, способных сорбировать альбумин, и для иммобилизации тромболизирующего фермента урокиназы на поверхности искусственных клапанов из ти-

тана (Алесковский В. Б. и др., 1979). Показано, что при контакте с кровью имплантационных материалов с иммобилизованными ферментами немедленно происходит сорбция различных белков крови на поверхности материалов: возможны также адсорбция липидов из крови и активация коагулирующих факторов. Имеются данные, указывающие на ингибирующую способность ряда других тромболизирующих ферментов, адгезии и агрегации тромбоцитов (Березин И. В., 1976).

Получение сердечно-сосудистых протезов с иммобилизованными тромболизирующими ферментами лимитировано трудностями разработки методов связывания фермента с поверхностью протеза и его стерилизации без потери активности фермента. Необходимо также исключить возможность растворения швов под действием фермента и ухудшения процессов вживания протезов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итоги краткого рассмотрения использования иммобилизованных биопрепаратов в медицине можно отметить следующее:

1. Наиболее широко и эффективно процессы иммобилизации применяются для создания более стабильных форм легко разрушающихся и теряющих свою активность медицинских препаратов.

Так иммобилизация медицинских ферментов позволяет значительно увеличить сроки их хранения, делает их более устойчивыми к воздействию внутренних сред организма, позволяет сохранить начальную активность фермента в течение продолжительного времени.

Процессы иммобилизации весьма эффективны для создания более стабильных форм быстро разрушающихся в организме лекарственных препаратов, например, для ряда антибиотиков.

Целесообразна иммобилизация лекарственных соединений, принимаемых в значительных дозах. Например в случае γ -аминокислотной и γ -аминосалициловой кислот.

2. Успех использования иммобилизованных препаратов в значительной мере определяется правильным выбором матрицы (носителя) для иммобилизации и метода иммобилизации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение природных (производные целлюлозы, декстрана, агарозы) сополимерных матриц для иммобилизации биологически активных соединений позволяет создать эффективные препараты.

Иммобилизация различных лекарственных соединений на полипептидных и белковых матрицах оказалась наиболее эффективной в случае создания ряда психотропных и противоопухолевых препаратов.

Из синтетических (со)полимеров наиболее широкое применение на сегодняшний день нашли водорастворимые сополимеры винилового спирта, акриловых кислот, ванилина. Эти матрицы успешно применяются для создания иммобилизованных форм лекарственных соединений. Отмечено, что при пероральном применении синтетических сополимеров не наблюдалось проявления токсичности даже для больших доз используемых сополимеров. Варьируя природу используемого для иммобилизации сополимера, можно в значительной степени повышать или снижать растворимость лекарственных препаратов. Эффекты пролонгации, наблюдаемые в случае использования сополимерных матриц, позволяют длительное время поддерживать терапевтические концентрации лекарственных препаратов во внутренних средах и тканях организма.

Иммобилизация лекарственных соединений на синтетических и природных матрицах уменьшает дозы и частоту введения лекарств. Защищает ткани от раздражающего действия лекарственных препаратов. С другой стороны иммобилизованные препараты благодаря наличию сополимерной матрицы способны адсорбировать токсические вещества, а в ряде случаев индуцировать выработку интерферона.

3. Разработанные методы иммобилизации биологически активных соединений на неорганических матрицах (металлы, стекло) позволяют проводить процессы модификации ряда хирургических инструментов и аппаратов, а также поверхностей различных эндопротезов.

В результате такой модификации на поверхностях различных неорганических и органических материалов могут быть закреплены антисептики, антибиотики, антикоагулянты.

Включение биологически активных соединений в поверхностные слои медицинских материалов позволяет

придать этим поверхностям различные свойства — антисептические, антикоагуляционные и т. д.

4. Процессы иммобилизации широко используются в медицине для аналитических и препаративных целей. На основе иммобилизации ферментов на электрохимических датчиках созданы высокочувствительные методы определения аминокислот, глюкозы, молочной кислоты, мочевины, пенициллина и других веществ в биологических средах.

Процессы иммобилизации лежат в основе выделения и очистки ценных биологически активных соединений методами биоспецифической аффинной хроматографии, используя те же носители, что и для иммобилизации биологически активных соединений, аффинная хроматография позволяет выделить и очистить различные ферменты, нуклеотиды, коферменты, гормоны, антитела, синтетические полипептиды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алесковский В. Б., Постнов В. Н., Кольцов С. И., Макаров К. А.* Химическая сборка биомедицинских материалов и сорбентов. — В кн.: Применение новых биополимерных материалов в медицине. — Л., 1979.
- Алюшин М. Т., Артемьев А. И., Тракман Ю. Г.* Синтетические полимеры в отечественной фармакологической практике. — М.: Медицина, 1976.
- Аркадьева Г. Е., Страшнов В. И., Михайлова Т. С. и др.* О возможности иммобилизации анестетиков в структуру сополимерных гидрогелей в процессе их формирования в живые ткани. — В кн.: Применение новых биополимерных материалов в медицине. — Л., 1979.
- Батовский В. И., Штейнгарт М. З., Зайцев А. Г. и др.* Создание и методы совершенствования базисных материалов. — В кн.: Применение новых биополимерных материалов в медицине. — Л., 1979.
- Березин И. В., Кершенгольц Б. М., Угарова Н. Н.* Микроокружение ферментов как один из факторов, определяющих стабильность ферментов. — Докл. АН СССР, 1975, № 5, с. 1256—1259.
- Березин И. В., Клесов А. А.* Ферментные электроды. — Успехи химии, 1976, № 2, с. 180—201.
- Березин И. В., Антонов В. К., Мартынек К.* Иммобилизованные ферменты. Т. 1, 2. — М., Изд-во МГУ, 1976.
- Бессмертная Л. Я., Козлов Л. В., Антонов В. К.* Свойства α -химнотрипсина, модифицированного сополимером малеиновой и акриловой кислоты. — Биохимия, 1974, № 4, с. 793—799.
- Валюлис Ф. А., Глемжа А. А., Тракимене В. В.* Способ очистки глюкозооксидазы методом аффинной хроматографии на иммуносорбенте. — Биохимия, 1975, № 4, с. 890—892.
- Веремеенко К. Н.* Ферменты протеолиза и их ингибиторы в медицинской практике. — Киев: Здоров'я, 1971.
- Вирник А. Д.* Биологически активные производные целлюлозы. — Успехи химии, 1973, № 3, с. 547—567.
- Джалишвили О. А., Шабунина Т. В., Сивенков Э. С.* Миотическое и мидрнатическое действие глазных лекарственных пленок, приготовленных на основе ПВС. — В кн.: Применение новых биополимерных материалов в медицине. — Л., 1979.
- Дубовик Б. В., Шадурский К. С., Этлис В. С.* Поливинилпирридин-N-оксид. — Фармакол. и токсикол., 1969, № 2, с. 226—231.
- Жагат Ф. А., Карсакович А. С.* Иммобилизованные ферменты на

- силикатных носителях. — В кн.: Успехи биологической химии. — М., 1977, т. 18, с. 140—161.
- Зубаиров Д. М., Зинкевич О. Д.* Гемокоагуляционные свойства иммобилизованных протеаз. — *Вопр. мед. химии*, 1976, № 2, с. 187—190.
- Зубаиров Д. М., Попова Л. Г., Зинкевич О. Д.* и др. Влияние иммобилизованного порадrenalина на контактную фазу свертывания крови. — *Вопр. мед. химии*, 1977, № 4, с. 473—477.
- Илиев И., Георгиева М., Кабаиванов В.* Полимерные химиотерапевтические свойства с канцеролитической активностью. — *Успехи химии*, 1974, № 1, с. 134—147.
- Интерферон* и другие противовирусные агенты, их применение при гриппе: выводы и рекомендации. — *Бюлл. ВОЗ*, 1978, № 2, с. 169—182.
- Карасев В. А., Макаров К. А., Кольцов С. И., Алесковский В. Б.* Модель биохимической сборки твердых матриц для иммобилизации ферментов. — Всесоюзная конференция «Разработка новых технологических процессов производства антибиотиков и микробных ферментов медицинского назначения». Тезисы докладов. — Л., 1976, с. 19—20.
- Кестнер А. И.* Иммобилизованные ферменты. — *Успехи химии*, 1974, № 8, с. 1480—1511.
- Кибардин С. А., Макаров К. А.* Тонкослойная хроматография в органической химии. — М.: Химия, 1978.
- Клесов А. А., Швядас В. Ю., Ныс П. С.* и др. Изучение кинетики и механизма реакции гидролиза, катализируемой растворимой и иммобилизованной пенициллинамидазой. — В кн.: Всесоюзный симпозиум по получению и применению иммобилизованных ферментов. 1-й. Тезисы. — Таллин, 1974, с. 81—82.
- Кляшицкий Б. А., Шапот В. С.* Биоспецифическая адсорбционная хроматография («аффинная» хроматография). — В кн.: Успехи биологической химии. — М., 1976, т. 17, с. 234—267.
- Кулис Ю. Ю., Панова Б. С.* Разработка чувствительных к глюкозе и мочевины электродов на основе иммобилизованных ферментов. — В кн.: Всесоюзный симпозиум по получению и применению иммобилизованных ферментов. 1-й. Тезисы. — Таллин, 1974, с. 102.
- Лидак М. Ю., Паэгле Р. А., Гиллер С. А.* Изыскание новых противоопухолевых веществ среди биополимеров и их синтетических аналогов. — *Хим.-фарм. журн.*, 1976, № 8, с. 28—35.
- Майчук Ю. Ф.* Антибиотики в офтальмологии. — М.: Медицина, 1973.
- Майчук Ю. Ф., Тишина И. Ф.* Полиакриламид — пролонгирующий растворитель для глазных капель. — *Вестн. офтальмол.*, 1971, № 6, с. 60—63.
- Майчук Ю. Ф., Анджелов В. О., Поздняков В. И.* и др. Полиакриламид в лечении вирусной инфекции глаз. — В кн.: Всесоюзная конференция «Химиотерапия инфекций и лекарственная устойчивость патогенных микроорганизмов». Тезисы. — М., 1973, с. 152—154.
- Макаров К. А.* Некоторые закономерности синтеза и модификации стоматологических материалов. — В кн.: Применение полимеров медицинского назначения в стоматологии. — Л., 1977, с. 5—15.
- Макаров К. А., Томашевская Г. М.* Расчет констант сополимеризации с применением ЭВМ. — В кн.: Высокомолекулярные соединения. — Л., т. 13, 1971, с. 2739—2742.

- Макаров К. А., Кольцов С. И., Зытнер Я. Д. и др. Иммунизация биологически активных соединений на поверхности элементов АИК. — В кн.: Применение новых биополимерных материалов в медицине. — Л., 1979.
- Макаров К. А., Кравцов И. А., Романчук Л. А. и др. Иммунизация антитромбогенных веществ на поверхности искусственных клапанов сердца. — В кн.: Применение новых биополимерных материалов в медицине. — Л., 1979.
- Макаров К. А., Сахарова И. А., Рябов С. И. и др. Применение биосорбента иммобилизованной уреазы, активированных углей и неорганических ионообменников для регенерации диализирующего раствора в АИП. — В кн.: Применение новых биополимерных материалов в медицине. — Л., 1979.
- Макаров К. А., Терещенко Г. П., Башкович А. П. Иммунизация медицинских ферментов и антисептиков на поверхности пленочных материалов. — В кн.: Применение новых биополимерных материалов в медицине. — Л., 1979.
- Макаров К. А., Зытнер Я. Д. Синтез биополимерных материалов и препаратов методами электрохимической (со) полимеризации и (со) иммобилизации. — В кн.: Применение новых биополимерных материалов в медицине. — Л., 1979.
- Мандель М. О., Кестнер А. И., Елизаровская Л. М. и др. Получение 6-аминопенициллановой кислоты при помощи иммобилизованной пенициллинамидазы. — Всесоюзный симпозиум по получению и применению иммобилизованных ферментов. 1-й. Тезисы. — Таллин, 1974, с. 79—80.
- Мендель М. О., Кестнер А. И., Сиймер Э. Х. и др. Получение и свойства иммобилизованной бензилпенициллинамидазы. — Прикладная биохим., 1975, № 2, с. 219—225.
- Мельник И. П., Молоденков М. Н., Мошков О. А. и др. Исследование возможности использования иммобилизованной уреазы для разложения мочевины в плазме крови. — Бюлл. экспер. биол., 1977, № 4, с. 425—427.
- Мохнач В. О. Иод и проблемы жизни. — Л.: Наука, 1974.
- Ныс П. С., Савицкая Е. И. Получение иммобилизованной пенициллинамидазы с использованием ионитов разной природы. — В кн.: Всесоюзный симпозиум по получению и применению иммобилизованных ферментов. 1-й. Тезисы. — Таллин, 1974, с. 76.
- Орлиевская О. В., Морозова Э. Н., Пономарева Р. В., Самсонов Г. В. Иммунизация уреазы в порах сшитых карбоксильных полиэлектролитов. — Коллоид. журн., 1976, № 6, с. 1182—1184.
- Полевая О. Ю., Башарова Л. А., Шайдров В. В. и др. Ковалентное связывание этаперазина с белком для получения антител, нейтрализующих физиологическое действие этаперазина. — Хим.-фарм. журн., 1976, № 9, с. 15—19.
- Постнов В. Н., Макаров К. А., Кольцов С. И., Алесковский В. Б. Свойства неорганических матриц для твердофазного синтеза пептидов. — Докл. АН СССР, 1977, № 3, с. 599—600.
- Разводовский Е. Ф. Фармакологически активные полимерные вещества. — Химия и технол. высокомолекулярных соединений, 1976, с. 61—95.
- Родина Л. Б., Баев В. В., Софьина З. П. и др. Синтез и изучение противоопухолевой активности коротких фрагментов гистона H₂ и рибонуклеазы, модифицированных сарколизинном. — Хим.-фарм. журн., 1976, № 8, с. 6—11.

Савицкая Е. М., Ныс П. С., Шелленберг Н. Н. и др. Свойства пептилламинадазы, иммобилизованной ковалентным связыванием с носителями разной природы. — В кн.: Всесоюзный симпозиум по получению и применению иммобилизованных ферментов. 1-й. Тезисы. — Таллин, 1974, с. 83—84.

Синтетические полимеры медицинского назначения. Всесоюзный симпозиум. Тезисы докладов. — Ташкент, Фан, 1973, 85 с.

Скрябин Г. К., Коцесенко К. А., Могильницкий Г. М. и др. Изучение жизнеспособности и ферментативной активности иммобилизованных клеток микроорганизмов, трансформирующих стероиды. — Изв. АН СССР. Серия биол., 1974, № 6, с. 857—866.

Смурова Е. В., Доброва Н. Б. Создание полимерных материалов с тромборезистентными свойствами. — Химия и технология высокомолекулярных соединений, 1976, т. 10, с. 30—60.

Суровцев В. И. Иммобилизованные ферменты и клетки. — Успехи соврем. биол., 1975, т. 80, вып. 3, с. 370—381.

Тараненко М. И., Голосюк Д. И. Протеолитические ферменты в комплексной терапии туберкулеза легких. — М.: Медицина, 1970.

Тенцова А. И., Ажгихин Н. С. Лекарственная форма и терапевтическая эффективность лекарств. — М.: Медицина, 1974.

Терещенко Г. П., Пастернак Т. А. Синтез и исследование антисептических полимерных комплексов. — В кн.: Применение новых биополимерных материалов в медицине. — Л., 1979.

Тимаковская А. Ф., Миргородская О. А., Селезнева А. А. и др. Стабильность терриллина, иммобилизованного включением в гель катионита КМТ. — Прикладная биохим., 1976, № 6, с. 886—889.

Торчилин В. П., Бобкова А. С., Чазов Е. И. Иммобилизация ферментов на биосовместимых носителях. — Биоорганическая химия, 1976, № 2, с. 116—124.

Торчилин В. П., Тищенко Е. Г., Чазов Е. И. и др. Иммобилизация ферментов на биосовместимых носителях. — Биоорганическая химия, 1976, № 3, с. 399—405.

Угарова Н. Н., Кершенгольц Б. М. Влияние иммобилизации на стабильность окислительных ферментов. — В кн.: Всесоюзный симпозиум по получению и применению иммобилизованных ферментов. 1-й. Тезисы. — Таллин, 1974, с. 31—32.

Фаворский М. С., Неверова Т. В., Рафикова Г. М. Клинико-бактериологические данные при комплексной терапии, включающей полийодин, субклинических и затяжных кишечных инфекций. — В кн.: Острые кишечные инфекции. — Л., 1975, с. 17—19.

Хацкевич Г. А., Орлов В. С., Соловьев М. М. и др. Токсикологическое исследование модифицированных поливинилспиртовых волокон с заданными свойствами, используемых для создания дренажей, тампонов и шовных материалов. — В кн.: Применение полимеров медицинского назначения в стоматологии. — Л., 1977, с. 61—65.

Хечинашвили Г. Г., Новиков Ю. И., Макаров К. А. и др. Применение (со)иммобилизованных препаратов в акушерстве и гинекологии. — В кн.: Применение новых биополимерных материалов в медицине. — Л., 1979.

Чазов Е. И., Торчилин В. П., Лебедев Б. С. и др. О возможности использования биосовместимых препаратов иммобилизованных ферментов для лечения заболеваний сердечно-сосудистой систе-

мы. — В кн.: Актуальные проблемы общей патологии и патофизиологии. — М., 1976, с. 151—162.

Чернов Г. А., Шевченко А. Н., Хомяков К. П. и др. Токсические и радиозащитные свойства производства декстрана, содержащих серотонин. — Фармакол. и токсикол. — 1971, № 3, с. 323—330.

Шувалова Е. П. Клинический опыт применения препаратов неспецифического действия (сывороточного полиглобулина, альбумина, метилурацила, полифепана, полийодина) в комплексной терапии острых кишечных инфекций. — В кн.: Острые кишечные инфекции. — Л., 1975, с. 62—68.

Шувалова Е. П. Клинико-экспериментальное обоснование применения полимерных лекарственных комплексов при острых кишечных инфекциях. — В кн.: Новые направления в области патогенеза и разработка методов диагностики, лечения и профилактики кишечных и вирусных инфекций. Тезисы докладов. — Рига, 1979, с. 68—69.

Шувалова Е. П. Эффективность лечения дизентерии антибиотиками с йодиолом. — Антибиотики, 1961, № 12, с. 1111—1114.

Яровая Г. А., Гулянская Т. Н., Доценко В. П. и др. Получение иммобилизованного трипсина и его использование для активирования калликреиногена. — В кн.: Всесоюзный симпозиум по получению и применению иммобилизованных ферментов. 1-й. Тезисы. — Таллин, 1974, с. 86.

Allen R., Mehlman C. Isolation of gastric vitamin B₁₂ — binding proteins using affinity chromatography. — J. biol. Chem., 1973, v. 248, p. 3660—3669.

Ambrus P. Insolubilized enzymes and other proteins. — J. Med., 1975, v. 6, p. 217—241.

Andersson L., Jorvall H., Mosbach K. Preparative purification of homogenous steroid-active isozyme of horse liver alcohol dehydrogenase by affinity chromatography on an immobilized AMP-analog. — Analyt. biochem., 1975, v. 69, p. 401—409.

Arnon R., Teicher F., Rustin M., Sela M. Preparation of antisera to α -fetoprotein making use of estradiol affinity column. — FEBS Letter, 1973, v. 32, p. 335—338.

Aukrust L., Norum K., Skalhegg B. Affinity chromatography of 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase from pseudomonas testosteronei. — Biochim. biophys. Acta, 1976, v. 438, p. 13—22.

Bachman B., Lee C. Purification of human lactate dehydrogenases by general ligand affinity chromatography. — Analyt. biochem., 1976, v. 72, p. 153—160.

Barker S., Somers P. Cross-linked polyalkylamide derivatives (Enzacryls) as water-soluble carriers of amylolytic enzymes. — Carbohydr. Res., 1970, v. 14, p. 287—296.

Baylin S., Margolis S. Purification of histaminase (diamine oxidase) from human pregnancy plasma by affinity chromatography. — Biochim. biophys. Acta, 1975, v. 397, p. 294—306.

Bonin J., Dudgeon P., Hultin H. Effect of enzyme ratio and Ph on the efficiency of an immobilized dual catalyst of

- glucose oxidase and catalase. — *J. Food Sci.*, 1976, v. 41, p. 886—890.
- Bowers L., Carr P.* An immobilized enzyme flow-enthalpimetric analyzes. — *Clin. Chem.*, 1976, v. 22, p. 1427—1433.
- Brenna O., Parella M., Pace M., Piella F. G.* Affinity chromatography purification of alkaline phosphatase from calf intestine. — *Biochem. J.*, 1975, v. 151, p. 291—296.
- Brown F., Joyeau R.* Enzymes immobilisees. Preparation d'Invertase et de glucose oxydase immobilises sur les vanacryls. — *Makromol. Chem.*, 1974, v. 175, p. 1961—1978.
- Bruck S.* Biomedical applications of polymeric materials and their interactions with blood components: a critical review of current developments. — *Polymer*, 1975, v. 16, p. 409—417.
- Burgisser F., Fauchere J.-L.* One-step Purification of bovine adrenal glucose-6-phosphate dehydrogenase by affinity chromatography. — *Helv. chir. Acta*, 1976, v. 59, p. 760—765.
- Choy P., Vance D.* Purification of cholinephosphate cytidyl transferase from rat liver by affinity chromatography. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1976, v. 72, p. 714—719.
- Cittanova N., Grigorova A., Benassayag C. et al.* Affinity chromatography purification of rat α -foetoprotein. — *FEBS Letter*, 1974, v. 41, p. 21—24.
- Cottreau D., Kahn A., Bovin P.* Human granulocyte phosphoglycerate kinase. Purification by double affinity elution and immunological study. — *Enzyme*, 1976, v. 21, p. 427—435.
- Cremonesi P., Bovaga R.* High performance enzyme reactors. — *Biotechn. bioeng.*, 1976, v. 18, p. 1487—1491.
- Dawson R., Crone H.* Affinity chromatography of triton-solubkilled brain acetylcholinesterase. — *J. Chromatogr.*, 1974, v. 92, p. 349—354.
- Dean P., Harvey M.* Applications of affinity chromatography. — *Proc. Biochem.*, 1975, v. 10, p. 5—10.
- Engvall F., Perlman P.* Enzyme-linked immunosorbent assay. — *J. Immunol.*, 1972, v. 109, p. 129—135.
- Filippusson H., Hornby W., McDonald A.* The use of immobilised derivatives of urease and urate oxidase in automated analysis. — *FEBS Letter*, 1972, v. 20, p. 291—293.
- Gabel D., Porath U.* Molecular properties of immobilized proteins. — *Biochem. J.*, 1972, v. 127, p. 13P—14P.
- Goodson L., Jacobs V., Dawis A.* An immobilized cholinesterase product for use in the rapid detection of enzyme inhibitors in air or water. — *Analyt. Biochem.*, 1973, v. 51, p. 362—367.
- Greene R. A.* Slow road to success for immobilized enzymes. — *Chem. Engin.*, 1978, v. 85, p. 78—80.
- Grossmann H., Lieflander M.* Affinitats chromatographische Reinigung der Acetylcholinesterase aus Menschlichen Erythrozyten. — *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.*, 1975, Bd 356, S. 663—669.
- Gubensek F., Barstow L., Kregar J., Turk V.* Rapid isolation of catherisin D by affinity chromatography on immobilized synthetic inhibitor. — *FEBS Letter*, 1976, v. 71, p. 42—44.
- Guilbault G., Kramer D.* Fluorometric system employing immobilized cholinesterase for assaying anticholinesterase compounds. — *Analyt. Chem.*, 1965, v. 37, p. 1675—1680.
- Guilbault G., Hrabankova F.* An electrode for determination of amino acids. — *Analyt. Chem.*, 1970, v. 42, p. 1779—1783.

- Guilbault G., Hrabankova F.* New enzyme electrode probes for D-amino acids and asparagine. — *Analyt. Chim. Acta*, 1971, v. 56, p. 285—290.
- Guilbault G., Lubrano G.* Enzyme electrode for glucose. — *Analyt. Chim. Acta*, 1972, v. 60, p. 254—256.
- Guilbault G., Lubrano G.* A enzyme electrode for the emperometric determination of glucose. — *Analyt. Chim. Acta*, 1973, v. 64, p. 439—455.
- Guilbault G., Montalvo J.* A urea-specific enzyme electrode. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1969, v. 91, p. 2164—2165.
- Guilbault G., Nagy G.* Improved urea electrode. — *Analyt. Chim.*, 1973, v. 45, p. 417—419.
- Guilbault G., Shu F.* An electrode for the determination of glutamine. — *Analyt. Chim. Acta*, 1971, v. 56, p. 333—338.
- Hampl P., Taboraky O., Musil J., Starka I.* The use of an enzaeryl AA derivative for affinity chromatography of sex hormone binding globulin. — *J. Chromatogr.*, 1974, v. 97, p. 57—63.
- Haugen T., Ishaque A., Chatterjee A., Preiss J.* Purification of escherichia coli ADP-glucose pyrophosphorylase by affinity chromatography. — *FEBS Letter*, 1974, v. 42, p. 205—208.
- Heimer Y., Krashin S., Riklis F.* The use of affinity chromatography for the purification of nitrate reductase. — *FEBS Letter*, 1976, v. 62, p. 30—32.
- Herzog V., Fahimi H.* The effect of glutaraldehyde on catalase. — *J. Cell Biol.*, 1974, v. 60, p. 303—311.
- Holmberg L., Bladh B., Astedt B.* Purification of urokinase by affinity chromatography. — *Biochim. biophys. Acta*, 1976, v. 445, p. 215—222.
- Ho Peter P., Towner R.* Affinity chromatography of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase from dor lung. — *Prep. biochem.*, 1976, v. 6, p. 215—222.
- Hornby W., Inman D., McDonald A.* The preparation of some immobilized dehydrogenases and their use in auromated analysis. — *FEBS Letter*, 1972, v. 23, p. 114—116.
- Hoschke A., Laszlo E., Hollo J.* Application of cycloamylase ligand affine chromatography for analysis of amylolytic enzymes. — *Starke*, 1976, v. 28, p. 426—432.
- Hubert P., Dellacherie F., Neel J., Baulieu F.* Affinity partitioning of steroid — binding proteins. — *FEBS Letter*, 1976, v. 65, p. 169—174.
- Hue D., Corvol P., Menard J., Sicard P. J.* Affinity chromatography in the purification of diagnostic enzymes. — *Proc. Biochem.*, 1976, v. 11, p. 20—24.
- Ichikawa F.* Enzyme-immunoassay of insulin by fluorimetry of the insulin-glucoamylase complex. — *Biochem. J.*, 1973, v. 73, p. 1319—1321.
- Ida S., Kobayakawa K., Morita V.* Ferredoxin-sepharosa affinity chromatography for the purification of assimilatory nitrite reductase. — *FEBS Letter*, 1976, v. 65, p. 305—308.
- Jacoby W., Wilchek M.* Affinity techniques enzyme purification. — *Methods in Enzymol.*, 1974, v. 34, p. 810.
- Jervis L., Pettit N.* Purification of ribonuclease T on porous glass affinity adsorbents. — *J. Chromatogr.*, 1974, v. 97, p. 33—38.
- Kato K., Hamaguchi V., Fukui H., Ischikawa F.* Enzyme-linked immunoassy. — *J. Biochem.*, 1975, v. 78, p. 235—237.

- Kedar F., Landazuri M., Bonavida B.* Cellular immunoadsorbents: A simplified technique for separation of lymphoid cell populations. — *J. Immunol.*, 1974, v. 112, p. 1231—1243.
- Kettner C., Rodriguez J., Glover G., Prescott J. M.* The purification of aeromonas aminopeptidase by affinity chromatography. — *Arch. biochem. biophys.*, 1974, v. 162, p. 56—63.
- Knights R., Light A.* Sepharose-bound trypsin and activated sepharose-bound trypsinogen. — *Arch. biochem. biophys.*, 1974, v. 160, p. 377—386.
- Ko R., Hercsh L.* A dacron wool packed-bed extracorporeal reactor. — *J. Biomed. Mat. Res.*, 1976, v. 10, p. 249—258.
- Krieger D., Erickson B., Merrifield R.* Affinity purification of synthetic peptides. — *Proc. nat. Acad. Sci.*, 1976, v. 73, p. 3160—3164.
- Lacko A., Chen T.* Enzym purification by affinity chromatography using non-covalently bound adsorbent. — *J. Chromatogra.*, 1977, v. 130, p. 446—450.
- Leenado R., Rechnitz G.* Improved enzyme electrode for amygdalin. — *Analyt. Chem.*, 1971, v. 43, p. 1457—1461.
- Lee C., Lazarus L., Kabakoff D., Russell P.* Purification of kinases by general ligand. — *Arch. biochem. biophys.*, 1977, v. 178, p. 8—18.
- Le Gaillard F., Racadot A., Racadot-Leroy N., Dautrevaux N.* Isolement de la transcortine humaine par chromatographie d'affinite. — *Biochimie*, 1974, v. 56, p. 99—108.
- Leon L., Narayanan S., Dellonbach R., Horvath C.* Immobilized glucose oxidase used in the continuous — flow determination of serum glucose. — *Clin. chem.*, 1976, v. 22, p. 1017—1023.
- Maeda H., Suzuki H.* Preparation of immobilized invertase. — *Biotechn. bioeng.*, 1973, v. 15, p. 403—412.
- Mannervik B., Jacobsson K., Boggaram V.* Purification of glutathione reductase from erythrocytes by the use of affinity chromatography. — *FEBS Letter*, 1976, v. 66, p. 221—224.
- Marconi W., Bartoli F., Cesere F. et al.* Synthesis of penicillins and cephalosporins by penicillin acylase entrapped in fibres. — *Agric. biol. Chem.*, 1975, v. 39, p. 277—279.
- Martensson K.* Preparation of an immobilized two-enzyme system, β -amylase-pullulanase to an acrylic copolymer for the conversion of starch to maltose. — *Biotechn. bioeng.*, 1974, v. 16, p. 579—582.
- Mattiasson B., Mosbach K.* Studies on a matrix bound threenzyme system. — *Biochim. biophys. Acta*, 1971, v. 235, p. 253—257.
- Messing R.* Immobilized RNAase by adsorption on porous glass. — *Enzymologia*, 1970, v. 38, p. 370—372.
- Messing R.* Simultaneously immobilized glucose oxidase and catalase in controlled-pore titania. — *Biotechn. bioeng.*, 1974, v. 16, p. 897—908.
- Mosbach K., Mattiasson B.* Matrix-Bound enzymes. — *Acta chem. scand., Sec. A. B.*, 1970, v. 24, p. 2093—2100.
- Naoi M., Lee V.* A fluorometric measurement of ligands incorporated into BrCN-activated Polysaccharides. — *Analyt. Biochem.*, 1974, v. 57, p. 640—644.
- Nwokoro N., Schachter H.* L-fucose metabolism in mammals. — *J. biol. Chem.*, 1975, v. 250, p. 6185—6190.
- Olanoff L., Bernath F., Venkatasubramanian K., Joyouse R.* Perfu-

- sion trials with a collagen immobilized enzyme in an extracorporeal reactor. — *Am. Chem. Soc.*, 1975, v. 16, p. 203—208.
- O'Madley J., Ulmer R.* Thermal stability of glucose oxidase and its admixtures with synthetic polymers. — *Biotechn. bioeng.*, 1973, v. 15, p. 917—925.
- Papariello G., Mukherji A., Shearrer C.* A penicillin selective enzyme electrode. — *Analyt. Chem.*, 1973, v. 45, p. 790—792.
- Picard J.* Purification de la cholinesterase du serum humani par affinite. — *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1976, v. 282, p. 235—236.
- Pitha P., Carter W.* Antiviral activity produced by the polycytidylic acid hexainosinate system. — *Nature, New Biol.*, 1971, v. 234, p. 105—106.
- Rase B., Bartjai T., Ernster L.* Purification of DT-diaphorase by affinity chromatography. — *Arch. Biochem. biophys.*, 1976, v. 172, p. 380—386.
- Rechnitz G., Lecnado R.* Enzyme electrode for amygdalin. — *Analyt. Chem.*, 1971, v. 43, p. 283—288.
- Rubenstein K., Schneider R., Ullman F.* Hemogeneous enzyme immunoassay a new immunochemical technique. — *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1972, v. 47, p. 846—851.
- Rusling J., Luttrell G., Cullen L., Papariello G.* Immobilized enzyme-based flowing-stream analyser for measurement of penicillin in fermentation broths. — *Analyt. Chem.*, 1976, v. 48, p. 1211—1215.
- Schiller J., Liu C.* Immobilization of tyrosinase within polyacrylamide gels. — *Biotechn. bioeng.*, 1976, v. 18, p. 1405—1412.
- Schrader W., Stacy A., Pollara B.* Purification of human erythrocyte adenosine deaminase by affinity column chromatography. — *J. Biol. Chem.*, 1976, v. 251, p. 4026—4032.
- Schwabe C.* Leucine aminopeptidase a calcium phosphate gel complex. — *Biochemistry*, 1969, v. 8, p. 795—802.
- Shaltiel S., Henderson G., Snell F.* Specific ion effects in affinity chromatography. — *Biochemistry*, 1974, v. 13, p. 4330—4335.
- Slavik K., Rode W., Slavikova V.* Purification of thymidylate synthetase from enzym poor sources by affinity chromatography. — *Biochemistry*, 1976, v. 15, p. 4222—4227.
- Szere P., Malliasson B., Mosbach K.* An immobilised threenzyme system. — *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 1973, v. 70, p. 2534—2538.
- Stasiw R., Patel A., Brown H.* Utilization of bound lactase in clinical chemistry. — *Biotechn. bioeng.*, 1972, v. 14, p. 629—635.
- Sundoram P., Crook F.* Preparation and properties of solidsupported urease. — *Canad. J. Biochem.*, 1971, v. 49, p. 1388—1394.
- Taylor J., Swaisgood H.* A kinetic study on effect of coupling distance between insoluble trypsin, and its carrier matrix. — *Biochem. biophys. Acta*, 1972, v. 284, p. 268—277.
- Toraya T., Fujimura M., Ikeda S. J. et al.* Affinity chromatography of amine oxidase from aspergillus niger. — *Biochim. biophys. Acta*, 1976, v. 420, p. 316—322.
- Turkova J., Hubalkova M., Krivakova M. et al.* Affinity chromatography on hydroxyalkyl methacrylate. — *Biochim. biophys. Acta*, 1973, v. 322, p. 1—9.
- Updike S., Hicks G.* The Enzyme electrode. — *Nature*, 1967, v. 214, p. 986—988.

- Venkatasubramhian K., Vieth W., Bernath F.* Use of collagen immobilized enzymes in blood treatment. — *Enzyme*, 1974, v. 2, p. 439—445.
- Viadutiu G., Carmody P., Rattazzi M.* Immunoaffinity chromatography of human β -hexosaminidase. — *Prep. Biochem.*, 1975, v. 5, p. 147—159.
- Vieth W., Wang S., Saini R.* Immobilisation of whole cells in a membranous form. — *Biotechn. bioeng.*, 1973, v. 15, p. 565—569.
- Watson B., Koyes M.* A dedicated instrument for the analysis of blood urea nitrogen using an immobilized enzyme reagent. — *Analyt. Letter*, 1976, v. 9, p. 713—725.
- Wectall H., Mason R.* Studies on immobilized papain. — *Biotechn. bioeng.*, 1973, v. 15, p. 455—466.
- Weibel M., Dritschilo W., Bright H., Humphrey A.* Immobilized enzyme: a prototype apparatus for oxidase enzymes in chemical analysis utilizing covalently bound glucose oxidase. — *Analyt. Biochem.*, 1973, v. 52, p. 402—414.
- Whitney P.* Affinity chromatography of carbonic anhydrase. — *Analyt. Biochem.*, 1974, v. 57, p. 467—476.
- Wichman A., Andersson L.-O.* Purification of human serum albumin by affinity chromatography. — *Biochim. biophys. Acta*, 1974, v. 372, p. 218—224.
- Wolf M., Ransberger K.* (Вольф М., Рансбергер К.) Лечение ферментами. Пер. с англ. /Под ред. В. З. Горкина. — М.: Мир, 1976.
- Worthy W.* Immobilized organelles aid cell chemistry study. — *Chem. Engin. News*, 1976, v. 54, p. 17—18.
- Wursch P.* Immobilization of human intestinal mucose enzymes on sepharose. — *Analyt. Biochem.*, 1977, v. 77, p. 265—273.
- Yoshida A.* Purification of human red cell glucose 6-phosphate dehydrogenase by affinity chromatography. — *J. Chromatogr.*, 1975, v. 114, p. 321—327.

О Г Л А В Л Е Н И Е

Введение	3
Глава 1. Методы получения иммобилизованных медицинских биопрепаратов	5
Носители (матрицы) для иммобилизации биологически активных веществ	5
Органические носители	6
Неорганические носители	8
Методы иммобилизации	9
Адсорбция	9
Включение в структуру гелей	12
Микрокапсулирование	14
Химические методы иммобилизации	18
Создание растворимых стабилизированных препаратов	18
Иммобилизация на природных (со)полимерах	20
Иммобилизация лекарственных соединений	24
Иммобилизация на синтетических (со)полимерах	27
Макромолекулярная фармакотерапия	28
Совместная иммобилизация	37
Глава 2. Особенности иммобилизованных биопрепаратов	42
Влияние природы матрицы на свойства иммобилизованных ферментов	46
Глава 3. Применение иммобилизованных биопрепаратов для аналитических и препаративных целей в медицине	50
Применение иммобилизованных биопрепаратов в биохимической диагностике и для определения токсических веществ	50
Применение ферментных электродов в биомедицинских исследованиях	56
Имуноферментные методы анализа	59
Применение иммобилизованных соединений в медицине для препаративных целей	65
Аффинная хроматография медицинских ферментов	67
Аффинная хроматография других белковых соединений	69
Применение иммобилизованных биопрепаратов в химико-фармацевтической промышленности	73
Глава 4. Применение иммобилизованных биопрепаратов в клинической медицине	76
Тромболитическая терапия ферментными препаратами	76
Применение иммобилизованных биопрепаратов для коррек-	

ции недостаточности ферментов в организме и для активации проферментов	86
Применение иммобилизованных ферментов в качестве противоопухолевых препаратов	89
Применение иммобилизованных препаратов в акушерстве и гинекологии	91
Применение иммобилизованных препаратов в стоматологии, оториноларингологии и офтальмологии	93
Применение ферментных препаратов для лечения заболеваний органов дыхания	98
Иммобилизованные препараты в терапии инфекционных заболеваний	99
Иммобилизованные препараты в нефрологии	101
Применение иммобилизованных биопрепаратов в хирургии	104
Заключение	112
Список литературы	115

ИБ—1691

Константин Алексеевич Макаров
Сергей Алексеевич Кибардин

**ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ БИОПРЕПАРАТЫ
В МЕДИЦИНЕ**

Редактор *С. В. Кузьмина*

Художественный редактор *В. А. Григоревская*
Технический редактор *О. И. Афонкина*
Корректор *Л. В. Кудряшова*

Сдано в набор 04.09.79 Подписано к печати 16.11.79
Т-17672 Формат бумаги 84×108¹/₃₂ Бум. типограф-
ская № 2 гарн. Литературная Печать высокая
Усл. печ. л. 6,72 Уч.-изд. л. 6,90 Тираж 6.000 экз.
Заказ 2820. Цена 70 к.

Ордена Трудового Красного Знамени издательство
«Медицина», Москва Петроверигский пер., 6/8
г. Калинин. Областная типография.

70 коп.

МЕДИЦИНА – 1980