

ФЕРМЕНТЫ И БЕЛКОВЫЕ ПРЕПАРАТЫ В МЕДИЦИНЕ

Н. Ф. Казанская, Н. И. Ларионова, В. П. Торчилин

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Всесоюзный кардиологический научный центр АМН СССР

Применение ферментов и других физиологически активных веществ (ФАВ) белковой природы в терапии имеет давние традиции. Современная медицина все шире использует высокоочищенные препараты ФАВ белковой природы в самых различных отраслях клинической медицины в качестве перспективных средств медикаментозного лечения вследствие их исключительно высокой активности и специфичности [7]. В настоящее время наметились следующие основные направления энзимотерапии: 1) устранение дефицита ферментов с целью компенсации врожденной или приобретенной функциональной недостаточности; 2) удаление нежизнеспособных, денатурированных структур, клеточных и тканевых осколков; 3) лизис тромбов; 4) комплексная терапия злокачественных новообразований; 5) детоксикация организма. Все эти аспекты более или менее широко рассматривались в течение последних десяти лет как в оригинальных статьях, так и в обзорных работах [15, 30, 31, 45]. В настоящей работе мы остановимся на современном состоянии и перспективах использования ФАВ белковой природы в терапевтических целях, исключая из рассмотрения их применение в клиническом анализе.

Применение ферментов для заместительной терапии практикуется уже давно, причем необходимого увеличения количества фермента во внеклеточных жидкостях и пищеварительных соках достигают сравнительно легко. Для лечения расстройств пищеварения предложено множество препаратов, содержащих смесь ферментов животного и растительного происхождения, расщепляющих белки, жиры, углеводы, и другие компоненты. Мы не имеем возможности охватить обширную область расстройств пищеварения и обмена веществ, рассмотреть разнообразные показания для заместительной терапии и перечислить имеющиеся препараты. Эти вопросы подробно освещены [30], приведем лишь некоторые примеры. При эндокринной недостаточности поджелудочной железы особое значение придается введению панкреатических ферментов, а для предупреждения появления неприятных симптомов после еды рекомендуются препараты, содержащие, кроме того, желчные соли, кислоты, целлюлазы. Гидролитические ферменты (чаще всего папаин, бромелайн, панкреатические ферменты в сочетании с целлюлазами) с успехом применяются последние годы для растворения желчных безжировых камней. Главным фактором, влияющим на эффективность оральной ферментной терапии, является инактивация панкреатических ферментов под действием желудочного сока. С целью повышения локального рН в желудке до 4,0 рекомендуется сочетать

применение протеаз с бикарбонатом натрия или гидроокисью алюминия. Другим подходом, позволяющим уменьшить вредное воздействие содержимого желудка на протеазы, является получение препаратов ферментов в кишечнорастворимой оболочке.

Лечение врожденных энзимопатий, которых за последние два десятилетия описано более 150, является важной проблемой заместительной терапии. Такие наследственные заболевания, как гликогенозы, липидозы, мукополисахаридозы и другие «лизосомальные» болезни, пытались лечить внутривенным введением соответствующих нативных ферментов, выделенных из биологических жидкостей и тканей человека [31, 32]. Однако получить удовлетворительные результаты не удалось, особенно для лизосомальных болезней, характеризующихся патологическим накоплением субстрата в нервных клетках. Причина неудач в быстром выведении нативных ферментов из кровотока и захвате печенью и в основном в непреодолимости гематоэнцефалического барьера и невозможности проникновения ферментов в лизосомы нейронов. Клиническое применение ферментов (протеазы, коллагеназы и гиалуронидазы) для лечения различных гнойно-воспалительных процессов основано на их некролитическом, муколитическом и противоотечном действии, на способности снижать антибиотикорезистентность микробной флоры [5]. Протеазы животного и бактериального происхождения используются в хирургии [17] при лечении гнойных заболеваний мягких тканей, костей (при остеомиелитах и гнойных артритах), легких и плевры, при туберкулезе [3]. Одной из важнейших областей применения протеиназ являются термические ожоги. Местная энзимотерапия при глубоких ожогах позволяет снизить летальность в токсемическом периоде, ускорить очищение и заживление раны, в большинстве случаев избегать пересадки кожи [17]. Ферментная терапия эффективна в травматологии и ортопедии, она способствует сокращению сроков лечения переломов, вывихов, растяжения связок, разрывов мышц [7, 17]. Довольно широко в ортопедической клинике для лечения рубцов различного происхождения, контрактур и т. д. применяется гиалуронидаза. Весьма активно энзимотерапия используется в отоларингологии для лечения дифтерии, тонзиллита, ларингита, отита и т. д. [5]. В стоматологической практике протеазы являются многообещающими в гнойной хирургии челюстно-лицевой области, в лечении тканей пародонта [9]. Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о том, что области применения протеиназ для лечения воспалительной реакции практически безграничны.

В медицинской энзимологии вряд ли существует проблема, которая исследовалась бы так же всесторонне и интенсивно, как проблема лизиса тромбов. Острые тромбоэмболии сосудов по-прежнему остаются основной причиной заболеваемости и смертности людей зрелого возраста. Мы не будем останавливаться на рассмотрении современных представлений о механизмах свертывания крови и фибринолиза, литература в этой области огромна [1, 7, 25]. Укажем лишь, что образование и лизис тромба представляют собой

весьма сложный каскад протеолитических процессов, в котором ключевые позиции отводятся плазмину, тромбину и фибрину. Возможны два основных подхода к тромболитической терапии: 1) использование активаторов превращения плазминогена в плазмин, таких, как, стрептокиназа и урокиназа; 2) использование протеаз, оказывающих прямое фибринолитическое действие, таких, как сам плазмин, трипсин, химотрипсин. Во многих случаях рекомендуется сочетать ферментную и антикоагулянтную терапию [17]. В последние годы как перспективные указываются ферменты трипсиноподобного типа, выделенные из яда змей, в присутствии которых образуются сгустки фибрина, механически менее прочные, и поэтому более чувствительные к лизису — гемотромбиновый сгусток [30]. Применение стрептокиназы и урокиназы при лечении инфаркта миокарда и легочной эмболии приводило к быстрому и стойкому улучшению, однако после парентерального введения стрептокиназы возникали аллергические симптомы [7, 30]. Протеолитические ферменты различного происхождения оказались эффективными при различных заболеваниях сосудов, таких, как артериальные тромбозы (периферические и мозговые), поверхностный и глубокий тромбоз флебит [7, 17, 30]. Механизм действия трипсина и химотрипсина в случаях патологического внутрисосудистого тромбообразования определяется их противовоспалительным и противоотечным действием и способностью активировать антисвертывающую систему крови, что выражается в повышении фибринолитической активности плазмы в условиях практической неизменности показателей свертывающей системы.

В связи с рассмотрением разнообразных примеров медицинского применения протеолитических ферментов весьма уместно упомянуть о широком использовании их белковых ингибиторов. Показаниями к их применению являются: 1) врожденный дефицит ингибиторов протеиназ, в частности α_1 -антитрипсина; 2) патологическая активация протеолитических процессов, связанных с индуцированным нефизиологическим «выбросом» протеаз или действием экзогенных ферментов при микробной патологии. Наибольшее распространение получили природные ингибиторы протеаз, выделенные из поджелудочной и околушной желез, легких крупного рогатого скота. Эти ингибиторы эффективно ингибируют плазмин, активаторы плазмина, факторы свертывания крови, калликреин, трипсин, химотрипсин, тканевые и лейкоцитарные протеиназы [44]. Поливалентные ингибиторы протеаз применяют в клинической практике при фибринолитических кровотечениях, возникающих после хирургических вмешательств, поскольку наряду с плазминовой активностью они тормозят тромбопластинообразование [5, 18]. Названные белковые ингибиторы протеаз используют при лечении сепсиса, бактериального (эндотоксического) шока, аллергических реакций, острого и послеоперационного панкреатита, механических и термических травм, артрозо-артритов [5, 18, 22, 33]. При инфаркте миокарда ингибиторы протеолиза оказывают антиишемическое действие, уменьшая некротическую зону и улучшая коллатеральное кровообраще-

ние [2]. В последние годы установлена эффективность противовирусного действия ингибиторов протеолиза в клинике и эксперименте [14]. Однако для расширения области применения ингибиторов ферментов следует искать ингибиторы с более широким спектром действия, в частности способных тормозить нейтральные, щелочные и лизосомальные протеиназы.

Особое место занимает использование ферментов в онкологии. Предприняты попытки применить протеазы, нуклеазы, мукополисахариды с целью непосредственного лизирующего действия на раковые клетки [7, 30]. Введение их в опухоль дает выраженный эффект, парэнтеральное введение оказывает более слабое действие из-за наличия ингибиторов протеаз в сыворотке больных раком. Более перспективной в настоящее время считается область энзимотерапии неоплазии, основанная на учете особенностей в метаболизме раковых клеток и предполагающая применение ферментов, снижающих концентрацию метаболитов и питательных веществ в кровотоке и опухолевых клетках. Наиболее известным цитостатическим ферментным веществом такого типа является L-аспарагиназа. Этот фермент стал стандартным лекарственным средством для лечения лимфобластных лейкозов [30]. Однако токсичность, особенно аллергенность, и быстрое развитие резистентности к ферменту ограничивают его применение. Открытие специфического влияния L-аспарагиназы на раковые клетки побудило к исследованию других ферментов, расщепляющих заменимые и незаменимые аминокислоты. Была обнаружена противоопухолевая активность глутаминазы, аргиназы, аргининдекарбоксилазы [28, 30], а также ферментов, снижающих уровень отдельных незаменимых аминокислот, таких, как α -гидроксилаза, лизиноксидаза, гистидидаза, фенилаланинаммиаклиаза [30]. Действие указанных ферментов усиливается в присутствии антиметаболитов аминокислот путем ингибирования биосинтетических путей и изменения концентрации аминокислот. В терапии рака описано использование ферментов, принимающих участие в катаболизме фолиевой кислоты, фолатных коэнзимов или фолатных антагонистов. Фолатные коферменты необходимы для биосинтеза пуринов и тимина. Наиболее многообещающим для деградации фолиевой кислоты является использование карбоксипептидазы G. Несмотря на заметную иммуногенность, фермент в эксперименте обнаруживает противоопухолевую активность, кроме того, он эффективен для предотвращения токсичности известного ингибитора дигидрофолатредуктазы-метотрексата при лечении лейкемии и рака мозга [30].

Таким образом, мы видим, что лекарственные препараты, представляющие собой природные физиологически активные белковые соединения (ферменты, их ингибиторы и активаторы, гормоны), обрели достойное место среди средств практической медицины.

К сожалению, повседневное клиническое использование ферментов ограничено как экономическими факторами — их высокой стоимостью и малой доступностью, так и их быстрой инактивацией в условиях организма и вызываемыми ими как чужеродными белка-

ми различными побочными реакциями (антигенность, аллергенность, токсичность и т. п.) В значительной мере перечисленные препятствия могут быть устранены благодаря использованию ферментов в стабилизированном, иммобилизованном виде, тем более что усилиями инженерной энзимологии на сегодняшний день разработано значительное количество методов ковалентной и нековалентной фиксации ферментов на нерастворимых и растворимых носителях самой разной природы [4].

В настоящее время принято выделять два принципиальных подхода к получению иммобилизованных терапевтических ферментов [13]. При различных системных поражениях, когда присутствие терапевтического фермента необходимо в разных органах и тканях, целесообразно использовать тем или иным способом стабилизированные водорастворимые препараты иммобилизованных ферментов, обладающие повышенной стабильностью в физиологических условиях и замедленным выведением из организма. Сюда же будут относиться и различные ферментсодержащие «искусственные клетки» типа микрокапсул, теней эритроцитов или липосом. С другой стороны, для терапии локальных поражений, когда присутствие фермента требуется лишь в месте поражения, целесообразно создание биосовместимых ферментсодержащих полимерных частиц (биодegradируемых или просто временно имплантируемых), которые могут быть локализованы в определенном месте и оставаться там заданное время, непрерывно выделяя в окружающую среду терапевтический фермент, предпочтительно дополнительно стабилизированный. Самостоятельный случай представляет собой использование иммобилизованных ферментов в аппаратах для экстракорпоральной перфузии типа искусственной почки, в перевязочных и дренирующих материалах для ускорения заживления ран и ожогов и для модификации внутренней поверхности протезов кровеносных сосудов с целью понижения тромбообразования.

Стабилизация терапевтических ферментов в ряде случаев может осуществляться без использования полимерных носителей, просто за счет целенаправленной химической модификации белковой глобулы низкомолекулярными реагентами или за счет введения в глобулу внутримолекулярных «скобок» из бифункциональных реагентов, затрудняющих денатурационное разворачивание молекулы белка [43]. Этот подход особенно важен, если терапевтический фермент для осуществления своей функции должен взаимодействовать с рецептором клеточной мембраны (например, пара тромбин — тромбоцит) или проникнуть внутрь клетки (ферменты, применяемые для терапии многочисленных наследственных ферментных недостаточностей печени), а наличие полимерного носителя может резко снизить эффективность ферментного препарата.

В ряде случаев применяют межмолекулярное сшивание ферментов бифункциональными реагентами типа глутарового альдегида, что можно также рассматривать как иммобилизацию одной молекулы фермента на другой. В ряде случаев такая модификация фермента приводит к повышению его стабильности и эффективности,

например, таким образом удалось стабилизировать α -галактозидазу, применяемую для лечения болезни Фабри. Связывание ферментов с другими белками также дает выраженный эффект — конъюгаты уриказы или гемоглобина с альбумином способны в несколько раз дольше циркулировать в активном состоянии в кровотоке, чем соответствующие нативные белки [13]. Следует, однако, иметь в виду, что крупные белковые образования, имеющие большое количество участков, взаимодействующих с рецепторами различных клеток, могут в некоторых случаях захватываться, например, клетками печени с повышенной интенсивностью.

Наиболее распространенным способом получения растворимых стабилизированных ферментных препаратов является их модификация растворимыми полимерами [13, 41]. Наиболее удобны в качестве носителей полисахариды, в частности декстраны, из-за их высокой биосовместимости [20, 38]. Для иммобилизации терапевтических ферментов могут использоваться и некоторые нетоксичные и неиммуногенные синтетические полимеры, например реакционноспособные производные поливинилпирролидона, полиэтиленгликоля, поливинилового спирта и др.

Определенные перспективы открывает использование в качестве носителей природных соединений, которые сами по себе обладают полезной физиологической активностью или способны усиливать действие связанного с ними фермента. Так, для иммобилизации тромболитических ферментов может использоваться антикоагулянт гепарин [42].

При использовании подобных препаратов следует учитывать, что их молекулярная масса не должна превышать 80—100 000, поскольку в противном случае будет затруднено их выведение из организма после выполнения ими своей функции, а накопление полимерных носителей в организме может вызвать непредсказуемые осложнения. С этой целью в последние годы ведется разработка реакционноспособных синтетических полимеров, содержащих связи, способные к биодegradации, а значит, не накапливающихся в организме даже при большой молекулярной массе [35].

Связывание терапевтических ферментов с растворимыми носителями осуществляют традиционными химическими методами иммобилизации, которые подробно разработаны [4]. При этом сами по себе связи полимер—носитель могут быть как бионеразрушаемыми — амидные, эфирные, так и биоразрушаемыми — уретановые, азометиновые и др.

Принципиальные эффекты, достигаемые благодаря связыванию терапевтического фермента или другого белкового соединения, например гормона — инсулина, сводятся к следующим: повышение конформационной стабильности и устойчивости к действию эндогенных протеаз; увеличение времени циркуляции в кровотоке за счет увеличения молекулярной массы конъюгата и замедления его выведения; возможность регуляции иммунного ответа организма на белковый препарат; наконец, возможность получать препараты комплексного терапевтического действия.

Возможность регуляции иммунного ответа организма на введение терапевтического фермента представляется чрезвычайно важной, поскольку многие перспективные ферментные препараты не могут применяться из-за вызываемых ими как чужеродными белками реакций организма. В то же время иммобилизация таких ферментов на природных или синтетических полимерах, например на полисахаридах или полиэтиленгликоле [23, 39], резко понижает иммунологические и аллергические реакции организма, по-видимому, за счет создаваемых матрицей носителя стерических препятствий взаимодействию антиген—антитело. С другой стороны, показано, что некоторые синтетические полиэлектролиты усиливают иммунный ответ на связанное с ними белковое соединение [10], что открывает возможности создания синтетических вакцин нового типа.

Как уже отмечалось, наиболее широко применяемыми в клинической практике являются протеолитические ферменты. Поэтому неудивительно, что большое количество исследований посвящено получению их иммобилизованных производных. Показано, что конъюгаты с растворимыми носителями протеаз — субтилизина, трипсина, α -химотрипсина, терилитина и др. [12] могут сохранять практически неизменной свою специфическую активность по низко- и высокомолекулярным субстратам, в то же время обладая более высокой по сравнению с нативными предшественниками стабильностью по отношению к различным денатурирующим воздействиям и увеличенным временем жизни в кровотоке. Препараты подобного типа уже нашли клиническое применение: в СССР впервые в мире в практику внедрена иммобилизованная на полисахаридном носителе стрептокиназа, успешно применяемая при лечении различных тромболитических заболеваний [19] и не вызывающая побочных реакций. Из других гидролитических ферментов следует назвать лизосомальную β -D-N-ацетилгексозаминидазу, применяемую при лечении болезни Тея — Сакса, для которой было показано, что ее иммобилизация на поливинилпирролидоне [34] приводит к стабилизации по отношению к экзогенным протеиназам и к увеличению времени ее действия в кровотоке экспериментальных животных. Потенциальные противоопухолевые препараты — нуклеазы, обладающие также и противовирусной активностью, резко улучшают свои свойства — стабильность и биологическую активность — при связывании с растворимыми аминопроизводными декстрана методом азосочетания [11].

Растворимые препараты иммобилизованных ферментов могут применяться не только для внутривенного введения; так, модифицированные декстраном карбоксипептидаза G и аргиназа [40] при внутрибрюшинном введении мышам с привитой мастоцитомой обладают способностью создавать более высокую и длительно действующую концентрацию активного начала в кровотоке, чем нативные ферменты.

Можно было бы привести еще много примеров подобного рода, но все они сводились бы к одному — иммобилизация ферментов на

растворимых полимерных носителей позволяет получать более стабильные, активные и безопасные терапевтические препараты. Более того, методы, выработанные при иммобилизации ферментов, могут быть успешно перенесены и на другие препараты белковой природы — различные физиологически активные полипептиды типа панкреатического ингибитора трипсина и, что особенно важно, гормона инсулина.

Еще один перспективный метод применения модифицированных форм ферментов для лечения — это создание различного типа искусственных клеток. Исторически первым подходом к этой проблеме было микрокапсулирование ферментов, т. е. их включение в полимерные микрокапсулы, обеспечивающие надежное удержание и защиту фермента и свободное проникновение относительно низкомолекулярных субстратов и продуктов ферментативной реакции. Основные преимущества микрокапсулирования следующие: микрокапсула исключает контакт фермента с биологическими жидкостями; в микрокапсулу могут быть включены относительно высокие концентрации фермента, достижение которых в кровотоке при использовании фермента в нативном виде невозможно; в микрокапсулу могут включаться различные ферменты одновременно; фермент в микрокапсулах может быть дополнительно стабилизирован внутри- или межмолекулярным сшиванием или модификацией растворимыми полимерами. Учитывая к тому же, что сейчас имеются подходы к получению микрокапсул не только из синтетических полимеров (полиамидов, полиуретанов и т. п.), но и из природных или их аналогов (полимолекулярной кислоты и т. п.), т. е. снимается проблема утилизации материала оболочек микрокапсул в организме, подобного рода ферментные препараты представляются в высшей степени перспективными. Следует подчеркнуть, однако, что их применение ограничено случаем, когда терапевтический фермент должен действовать на растворимый субстрат относительно невысокого молекулярного веса.

Первые успешные эксперименты по применению микрокапсулированных ферментов на животных были проведены с использованием уреазы (для понижения содержания мочевины в крови), каталазы (для лечения животных с каталазной недостаточностью) и аспарагиназы (для подавления роста аспарагинзависимых опухолей) [12]. Первым примером использования микрокапсулированных ферментов в клинической практике является описанное в работе [26] применение микрокапсулированной каталазы для лечения в ротовой полости человека ран, образующихся при акаталаземии в результате накопления выделяемой бактериями перекиси водорода.

Вторым по старшинству методом создания искусственных клеток является включение ферментов в липосомы — искусственные фосфолипидные микропузырьки. Ферменты, включенные в липосомы, также предохранены от инактивирующего воздействия внешней среды, а сами липосомы, состоящие из природных соединений, полностью утилизируются в организме. В отличие от микрокапсул,

однако, липосомы обладают уникальной способностью доставлять включений в них препарат внутрь клеток, с которыми они взаимодействуют по механизму слияния или эндоцитоза. Если учесть упомянутый ранее ряд заболеваний, связанных с недостаточностью внутриклеточных лизосомальных ферментов, то значение этого факта трудно переоценить. В липосомы с той или иной эффективностью включали подавляющее большинство применяемых в клинике ферментов — данные такого рода исчерпывающе описаны в монографии [37]. Там же приведены данные по первым успешным экспериментам с липосомально инкапсулированными ферментами в клинике: включенная в липосомы глюкоцереброзидаза в отличие от нативного фермента, который не способен проникнуть в клетки, оказалась весьма эффективна для лечения пациента с болезнью Гоше, связанной с нарушением нормального метаболизма глюкоцереброзидов, накапливающихся в клетках ретикуло-эндотелиальной системы. Включенная в липосомы амилоглюкозидаза была успешно применена для лечения пациента с гликогенолизом II типа. Если учесть, что клетки ретикуло-эндотелиальной системы, в частности печени, представляют собой природную мишень для липосом, то ясно, что включенные в липосомы ферменты могут оказаться весьма эффективны в лечении различных ферментных недостаточностей печени.

Липосомы, поверхность которых поддается различным модификациям, могут использоваться в качестве контейнеров для направленного транспорта лекарств, под которым сейчас принято понимать способность введенного лекарственного препарата накапливаться именно в зоне поражения. В ряде экспериментальных работ показано [21], что липосомы, во внутреннюю полость которых включены различные препараты, а к наружной мембране химически присоединено «векторное» соединение, способное опознавать и специфически связываться с зоной поражения (например, антитело против специфического компонента зоны-мишени), действительно избирательно концентрируются в заданном месте. Этот подход может еще более расширить арсенал методов ферментной терапии.

В качестве контейнеров для включения ферментов могут применяться и оболочки клеток крови, например мембраны или «тени» эритроцитов [24]. Путем частичного гемолиза эритроцитов и их последующего заполнения желаемым содержанием с полным восстановлением целостности мембраны в них были включены самые разнообразные ферменты, и при этом было показано, что включенные ферменты значительно повышают время своего нахождения в кровотоке в активном состоянии (эксперименты проводили на мышах и обезьянах). Описана также попытка использования включенной в эритроциты глюкоцереброзидазы для лечения пациента с болезнью Гоше [29].

Для лечения локальных, а не системных заболеваний, по-видимому, нужно создавать препараты иммобилизованных ферментов, которые могут быть локализованы в требуемом месте и способны к выделению в окружающую среду активного фермента с заданной

скоростью. Таким образом может быть создано локальное депо ферментного препарата в организме. В результате можно достичь высокой местной концентрации препарата, тогда как его общая доза будет ничтожна по сравнению со случаем применения нативного фермента в виде раствора. Такие препараты могут быть получены несколькими способами. Во-первых, они могут быть включены в раствор синтетического биосовместимого полимера, из которого затем будут отформованы таблетки или гранулы, предназначенные для имплантации и способные медленно выделять включенный белковый препарат (опыты проводились с трипсином, лизоцимом, щелочной фосфатазой, каталазой и др.) [36]. Скорость выхода фермента может регулироваться «плотностью» полимерной матрицы. Находясь в полимерной матрице, фермент защищен от воздействия агрессивной биологической среды, в результате чего подобные системы могут быть длительно функционирующими. В этом случае нерешенной проблемой остается судьба полимерного имплантата после полного выхода активного начала. Во-вторых, ферменты могут быть включены в процессе формирования в структуру различных волокон и пленок, применяемых в хирургии в качестве шовных, перевязочных или дренирующих материалов. Благодаря принципу постепенного выделения материалы с включенными протеолитическими ферментами обладают высокой и длительной очищающей, дренирующей и некролитической активностью, способны служить без смены в течение длительного времени и в несколько раз ускорять процессы заживления по сравнению с традиционными методами терапии [8].

Препараты иммобилизованных ферментов для локального применения могут быть получены как на основе нерастворимых полимеров, при этом фермент осуществляет свою функцию в связанном с носителем состоянии, а затем механически удаляется из очага поражения [16], так и на основе биodeградируемых носителей, когда скорость выхода фермента в окружающую среду определяется скоростью разрушения носителя, с которым фермент связан ковалентно. С использованием микрогранул сшитого декстрана — сефадекса — были получены препараты тромболитических ферментов с заданной скоростью биodeградации и было показано, что иммобилизованные таким образом фибринолизин, стрептокиназа или урокиназа могут быть использованы для локального депонирования при терапии тромбозов [27]. Эффективная тромболитическая терапия при этом в эксперименте на животных достигалась при использовании общих доз фермента, на два порядка меньших, чем при традиционных методах терапии. Подобного рода препараты могут быть депонированы практически в любом органе и несомненно перспективны для клинического применения.

Еще одна большая область применения ферментов в медицине, которая открылась только в результате разработки методов их иммобилизации, — это использование иммобилизованных ферментов в различных экстракорпоральных аппаратах для перфузионной очистки различных биологических жидкостей. Частным случаем

этого общего подхода является создание ферментных реакторов, которые могут использовать как тромбобезопасные протезы кровеносных сосудов.

Основными преимуществами реакторов на основе иммобилизованных ферментов являются следующие: возможность избежать непосредственного контакта организма с чужеродным белком и таким образом уменьшить нежелательные реакции на этот белок; возможность многократного использования реактора; возможность проведения длительного лечения. К недостаткам таких реакторов следует отнести не до конца решенные проблемы тромбообразования или сорбции белков крови на чужеродных поверхностях.

Экстракорпоральная перфузия с использованием ферментных реакторов уже применяется достаточно широко. Наиболее подробно описано применение аспарагиназы, включенной в самые разнообразные реакторы и используемой для терапии аспарагинзависимых твердых опухолей. В экспериментах на животных и на человеке показано, что включение иммобилизованной аспарагиназы в систему циркуляции позволяет быстро и количественно удалить из крови аспарагин. Подобные же системы с иммобилизованной уриказой или L-фенилаланин-аммиак-лиазой могут применяться для общей детоксикации организма благодаря способности понижать уровень мочевой кислоты в крови животных с гиперурикемией и уровень фенилаланина при фенилкетонурии [12, 13].

В заключение следует отметить, что возможности и перспективы использования в медицине ферментов в иммобилизованном состоянии гораздо шире, чем достигнутые на сегодняшний день, и можно не сомневаться, что именно на этом пути медицину ждет создание новых и высокоэффективных методов лечения. Даже из краткой сводки приведенных данных видно, что применительно к получению лекарственных препаратов белковой природы биотехнология (в частности, такой ее раздел, как инженерная энзимология) уже играет важную роль, а ее потенциальные возможности просто безграничны.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Андреевко Г. В.* Фибринолиз, химия и физиология процесса. М.: Медицина, 1967. 248 с.
2. *Андрека В., Шипош Е., Алекси М.* О дополнении терапии остроо инфаркта миокарда калликреин-трипсиновым ингибитором.— Венг. фармакотерапия, 1976, № 3, с. 94—100.
3. *Богущ Л. К., Шварцман Л. Я.* Применение протеолитических ферментов при туберкулезе легких. М.: Медицина, 1970. 128 с.
4. Введение в прикладную энзимологию/Под ред. И. В. Березина, К. Мартиника. М.: Изд-во МГУ, 1982. 384 с.
5. *Веремеенко К. Н.* Ферменты протеолиза и их ингибиторы в медицинской практике. Киев: Здоровье, 1971. 216 с.
6. *Веремеенко К. Н., Карпенко Г. Ф.* Перспективы применения иммобилизованных ферментов в медицине.— Укр. биохим. журн., 1979, 51, с. 409—419.
7. *Вольф М., Рансбергер К.* Лечение ферментами. М.: Мир, 1976. 231 с.
8. *Григорян А. В., Толстых П. И., Василькова З. Ф.* и др. Синтетический шовный материал и протеолитические ферменты в профилактике нарушения заживления асептических и лечении инфицированных ран мягких тканей.— В кн.: Асептика и антисептика. М.: Медицина, 1979, с. 73—76.

9. Данилевский Н. Ф., Хоменко Л. А. Применение ферментов в стоматологии. Киев: Здоровье, 1972, 188 с.
10. Кабанов В. А., Петров Р. В., Хаитов Р. М. Новый принцип создания искусственных иммуногенов.—Журн. ВХО им. Д. И. Менделеева, 1982, т. 27, с. 417—428.
11. Куриченко Б. М., Калачева Н. В., Пензикова Г. А., Скокова И. Ф. Модификация нуклеодеполимераз растворимыми производными полисахаридов.—Биохимия, 1978, 43, № 1, с. 1996—2001.
12. Ларионова Н. И., Торчилин В. П. Применение иммобилизованных физиологически активных веществ белковой природы в медицине.— В кн.: Введение в прикладную энзимологию/Под ред. И. В. Березина, К. Мартиника. М.: Изд-во МГУ, 1982, с. 284—305.
13. Ларионова Н. И., Торчилин В. П. Современное состояние и перспективы использования в медицине иммобилизованных физиологически активных веществ белковой природы.— Хим. фарм. журн., 1980, 4, с. 21—36.
14. Лоцицкий В. П., Поляк Р. Я. Роль протеолиза в репродукции вирусов животных и человека и антивирусная активность ингибиторов протеаз.— Усп. соврем. биологии, 1982, 93, с. 352—362.
15. Мардашев С. Р. Некоторые проблемы медицинской энзимологии.— В кн.: Проблемы медицинской энзимологии. М.: Медицина, 1970, с. 5—26.
16. Иммобилизованные протеолитические ферменты в лечении гнойно-некротических процессов/Под ред. Р. И. Салганик, А. С. Коган. Новосибирск: Наука, 1981. 139 с.
17. Стручков В. И., Григорян А. В., Гостинцев В. К. и др. Протеолитические ферменты в гнойной хирургии. М.: Медицина, 1970. 408 с.
18. Сыновец А. С., Левицкий А. П. Ингибиторы протеолитических ферментов в медицине. Киев: Здоровье, 1979. 78 с.
19. Торчилин В. П., Воронков Ю. И., Махаев А. В. Использование иммобилизованной стрептокиназы (стрептодеказы) для лечения тромбозов.—Терапевт. архив, 1982, 54, № 11, с. 21—25.
20. Торчилин В. П., Рейзер И. Л., Смирнов В. Н., Чазов Е. И. Иммобилизация ферментов на биосовместимых носителях. II. Иммобилизация α -химотрипсина на растворимых декстранах.—Биоорганич. химия, 1976, 2, с. 1252—1258.
21. Торчилин В. П., Смирнов В. Н., Чазов Е. И. Проблемы и перспективы использования липосом для направленного транспорта лекарств.— Вопр. мед. химии, 1982, 28, № 1, с. 3—14.
22. Яровая Г. А., Доценко В. Л., Агапова Э. И. и др. Эффективность действия коммерческих поливалентных ингибиторов протениаз. Применение гордокса при хирургических вмешательствах по поводу патологии сосудов.— Вопр. мед. химии, 1980, 26, с. 837—843.
23. Abuchowski A., McCoy J R., Palczuk N. C. et al. Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase.— J. Biol. Chem., 1977, 252, p. 3582—3586.
24. Ang E., Glew R., Ihler G. Enzyme loading of nucleated chicken erythrocytes.— Exp. Cell Res., 1977, 104, p. 430—434.
25. Barlow G. H. Enzymes of clot lysis.— In: Methods in enzymology. N. Y. etc., 1976, vol. 45, p. 239—280.
26. Chang T. M. S. Effects of local applications of microencapsulated catalase on the response of oral lesions to hydrogen peroxide in acatalasemia.— J Dent. Res., 1972, 51, p. 319—321.
27. Chazov E. I., Mazaev A. V., Lebedev B. S. et al. Experimental study of biosoluble drugs.— Thrombus lysis with biosoluble immobilized fibrinolysin in experiment.— Thrombosis Res., 1978, 12, p. 809—816.
28. Cooney D. A., Rosenbluth R. J. Enzymes as therapeutic agents.— In: Advances in pharmacology and chemotherapy. N. Y., 1975, vol. 12, p. 200—263.
29. Dale G. L., Beutler E. Enzyme replacement therapy in Gaucher's disease: A rapid, high-yield method for purification of glucocerebrosidase.— Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1976, 73, p. 4672—4674.
30. Enzymes as drugs/Ed. J. S. Holcenberg, J. Roberts. N. Y. etc.: Wiley and sons, 1981. 455 p.
31. Enzyme therapy in genetic diseases/Ed. R. J. Desnick. N. Y.: Alan Liss, 1980. Vol. 2. 450 p.

32. Enzyme therapy of lysosomal storage diseases/Ed. J. M. Tager et al. Amsterdam: North-Holland, 1974.
33. *Fritz H.* Proteinase inhibitors in severe inflammatory processes (septic shock and experimental endotoxaemia): Biochemical, pathophysiological and therapeutic aspects.— In: Protein degradation in health and disease. Amsterdam: Excerpta Medica, 1980, p. 351—379.
34. *Geiger B., Specht B. U. von, Arnon R.* Stabilization of human β -D-N-Acetylhexosaminidase A towards proteolytic inactivation by coupling it to poly(N-vinylpyrrolidone).— *Europ. J. Biochem.*, 1977, 73, p. 141—147.
35. *Kopeček J.* Biodegradation of polymers for biomedical use.— In: IUPAC Macromolecules. Oxford; New York, 1982. 320 p.
36. *Langer R., Folkman J.* Polymers for the sustained release of proteins.— *Nature*, 1976, 263, p. 797—799.
37. Liposomes in biological systems/Ed. G. Gregoriadis, A. C. Allison. N. Y.: Wiley and sons, 1980. 360 p.
38. *Marshall J. J., Rabinowitz M. L.* Enzyme stabilization by covalent attachment of carbohydrate.— *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1975, 167, p. 777—779.
39. *Newmark J., Abuchowski A., Murano G.* Preparation and properties of adducts of streptokinase and streptokinase-plasmin complex with polyethylene glycol and pluronic polyol F38.— *J Appl Biochem.*, 1982, 4, p. 185—189.
40. *Sherwood R. F., Baird J. K., Atkinson T.* et al. Enhanced plasma persistence of therapeutic enzymes by coupling to soluble dextran.— *Biochem. J.*, 1977, 164, p. 461—464.
41. *Torchilin V. P.* Immobilized enzymes and the use of immobilization principles for drug targeting.— In: Targeted drugs. N. Y. etc., 1983, p. 127—152.
42. *Torchilin V. P., Il'ina E. V., Streltsova Z. A.* et al. Enzyme immobilization on heparin.— *J. Biomed. Mater. Res.*, 1978, 12, p. 585—590.
43. *Torchilin V. P., Martinek K.* Enzyme stabilization without carriers.— *Enzyme Microbiol. Technol.*, 1979, 1, p. 74—82.
44. *Vogel R., Trautschold I., Werle E.* Natural proteinase inhibitors. N. Y.: Acad. press, 1958. 112 p.
45. *Wiseman A.* Enzymes in therapy — theory and practice.— In: Topics in enzyme and fermentation biotechnology. N. Y. etc., 1980, vol. 4, p. 9—24.