

УДК 541.64:577.15

**ВЛИЯНИЕ СПОСОБОВ ИММОБИЛИЗАЦИИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ
ФЕРМЕНТОВ В ПОЛИМЕРНЫХ ГИДРОГЕЛЯХ
НА ГЕМОСОВМЕСТИМОСТЬ МОДИФИЦИРОВАННЫХ
ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ**

Платэ Н. А., Валуев Л. И., Чупов В. В.

Изучены возможности повышения гемосовместимости полимерных материалов путем иммобилизации на их поверхности ряда протеолитических ферментов: трипсина, химотрипсина, фибринолизина и протеазы из актиномицетов. Разработаны способы иммобилизации ферментов на полимерных материалах. Показано, что использование фибринолизина и протеазы, иммобилизованных путем прививки к полимерам модифицированных хлорангидридом акриловой кислоты ферментов в присутствии гидрофильного сомономера, приводит к получению высокоактивных и стабильных препаратов, отличающихся высокой гемосовместимостью.

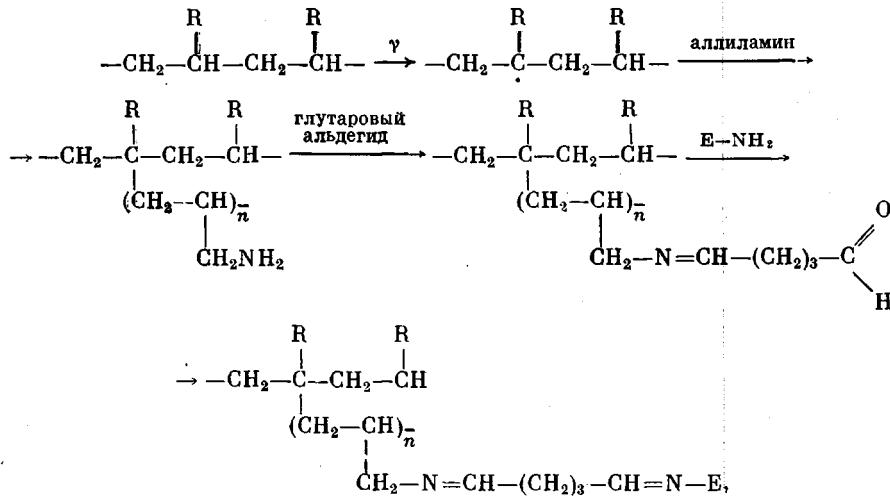
Одним из перспективных методов повышения гемосовместимости полимерных материалов является модификация их поверхности различного рода ферментами, воздействующими на процессы тромбообразования или фибринолиза. При этом наибольший интерес представляют ферменты протеолитического, в частности фибринолитического действия, а также ферменты, препятствующие адгезии и агрегации тромбоцитов. Известно, что модификация поверхности искусственных кровеносных сосудов на основе цоликарбонатов, ПВХ и ПММА урокиназой приводит к существенному повышению гемосовместимости этих материалов [1]. Иммобилизованные трипсин, уреазы и стрептокиназы способны превращать присутствующий в живом организме неактивный профибринолизин в фибринолизин — фермент, катализирующий гидролитическое расщепление фибрина, которое в свою очередь приводит к растворению тромба [2].

Цель настоящей работы — исследование возможностей повышения гемосовместимости полимерных материалов с использованием двух фибринолитических ферментов — фибринолизина и протеазы из *Actinomyces Sphaeroides* [3]. Преимуществами этих ферментов являются, во-первых, прямое действие на фибрин в отличие от других протеаз, которые лишь активируют превращение профибринолизина в фибринолизин, и, во-вторых, высокая фибринолитическая активность. Ранее нами была показана перспективность использования этих ферментов с точки зрения решения двух основных задач, возникающих при использовании протеаз для повышения гемосовместимости, а именно преодоление трудностей, связанных с препятствиями для нормального срастания протеза с естественной тканью (так как не исключено растворение шва под действием протеаз), а также трудностей, обусловленных возможной денатурацией ферментов при стерилизации готовых изделий [4—7].

В качестве полимерных носителей использовали ПЭ, ПП и лавсан — полимеры, которые широко применяются для изготовления различных искусственных органов. Модификацию полимеров проводили с использованием специально разработанных способов иммобилизации, позволяющих модифицировать широкий круг полимерных материалов и получать ма-

териалы как для кратковременного, так и для долговременного контакта с кровью [8–11]. Последнее обеспечивается изменением природы химической связи между макромолекулами полимера и фермента, т. е. различной скоростью отщепления молекул фермента от полимера.

Первый способ заключается в модификации поверхности полимера введением первичных аминогрупп за счет привитой сополимеризации аллиламина и в последующей обработке привитого сополимера глутаровым альдегидом и раствором фермента



где $n=2-5$, E – остаток фермента.

Инициирование привитой сополимеризации осуществляли γ -облучением [12]. Известно, что аллиламин чрезвычайно плохо полимеризуется по радикальному механизму [13], и поэтому степень полимеризации привитого компонента не превышает 2–5 звеньев.

Из зависимости протеолитической активности конечного продукта от дозы облучения (рис. 1) видно, что увеличение последней приводит к пропорциональному возрастанию активности. Такая зависимость, вероятно, обусловлена увеличением количества привитого аллиламина и, как следствие, увеличением количества иммобилизованного фермента. Оценка количества фермента, иммобилизованного на полипропиленовой пленке при дозе облучения 60 Мрад в предположении, что при иммобилизации активность ферментов существенно не меняется, свидетельствует о полном заполнении полимерной поверхности по крайней мере одинократным слоем фермента.

Из этих результатов следует, что для достижения большей активности препаратов следует увеличивать дозу облучения при прививке. Однако при больших дозах в полимерах протекают различные деструкционные процессы, приводящие к ухудшению их физико-механических свойств. Для снижения дозы и одновременно для сохранения высокой степени прививки сополимеризацию проводили в присутствии фосфорной кислоты, которая является активатором радикальной гомополимеризации аллиламина [13]. Оказалось, что и в случае привитой сополимеризации фосфорная кислота выполняет роль активатора и введение ее в реакционную смесь приводит к существенному увеличению степени прививки аллиламина [10]. Так, активность протеазы на пленке, полученной привитой сополимеризацией с использованием 70%-ной фосфорной кислоты (мольное отношение фосфорная кислота : аллиламин = 2 : 1), при дозе облучения 1 Мрад составляет 3,2–3,5 μg тирозина/мин \cdot 10 cm^2 , в то время как активность аналогичных образцов, полученных в отсутствие фосфорной кислоты, при дозе облучения 60 Мрад равна 1,9–2,1 μg тирозина/мин \cdot 10 cm^2 . Исследование фибринолитической активности препаратов показало, что при нанесении

сении на поверхность полимерной ткани, содержащей иммобилизованный фибринолизин или протеазу, растворов фибриногена и тромбина образования сгустка фибрина не происходит, а при нанесении на поверхность такой модифицированной ткани уже сформировавшегося сгустка фибрина зона лизина образуется при 37° в течение 5–10 мин.

Результаты исследования устойчивости иммобилизованных ферментов при хранении в различных условиях приведены в табл. 1.

Из таблицы видно, что наименее устойчивыми оказываются препараты, хранящиеся в растворе. Резкое уменьшение активности в этом случае, вероятно, обусловлено уменьшением концентрации фермента на поверх-

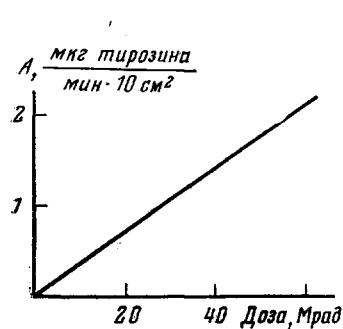


Рис. 1

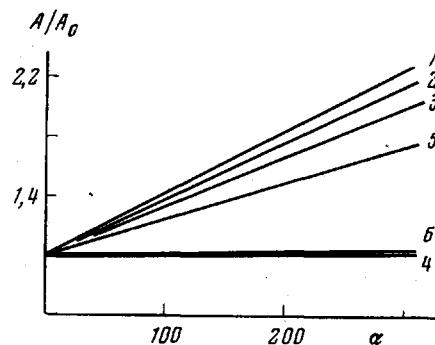


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость протеолитической активности полипропиленовой пленки ($S=10 \text{ см}^2$) от дозы γ -облучения

Рис. 2. Зависимость относительных активностей ферментов от мольного соотношения хлорангидрида акриловой кислоты:фермент

1—4 — протеолитическая активность трипсина (1), химотрипсина (2), протеазы (3) и фибринолизина (4); 5, 6 — фибринолитическая активность протеазы (5) и фибринолизина (6)

ности полимера за счет гидролиза связи $C=N$, посредством которой фермент связан с полимером [14]. В отсутствие гидролизующего агента препараты с иммобилизованными ферментами могут храниться при комнатной температуре достаточно долго, подвергаясь лишь небольшому изменению активности. Аналогичные результаты получены качественно при исследовании препаратов с иммобилизованным фибринолизином.

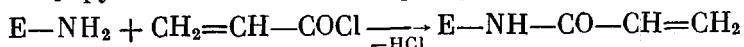
Модифицированные полимерные материалы можно стерилизовать УФ-или ионизирующими излучениями, поскольку существующие способы стерилизации изделий медицинского назначения, например с использованием перегретого водяного пара, оказываются неподходящими, так как вызывают денатурацию иммобилизованного фермента [15].

Таким образом, способ иммобилизации ферментов, заключающийся во введении первичных аминогрупп на поверхность полимера и в последующем сшивании с ними макромолекул фермента глутаровым альдегидом, является удобным для модификации полимерных изделий, время контакта которых с кровью непродолжительно (порядка нескольких часов).

Другой подход к решению задачи получения полимерных материалов с иммобилизованными ферментами заключается в прививке на поверхность полимера фермента, в молекулы которого введены реакционноспособные двойные связи $C=C$. При таком способе иммобилизация осуществляется ковалентным связыванием полимера-подложки с ферментом посредством устойчивой к гидролизу углерод-углеродной связи, что позволяет ожидать высокой стабильности препаратов с иммобилизованными ферментами.

Введение в молекулы фермента ненасыщенной связи $C=C$ можно осуществить путем реакции ацилирования фермента ангидридами или гало-

иангиридами соответствующих кислот либо по концевым NH_2 -группам, либо по NH_2 -группам остатков лизина [8, 9] по схеме



Такая реакция, однако, может протекать с участием и других реакционноспособных групп молекулы белка, например по остаткам серина, тирозина, цистеина, что в принципе может привести к существенному изменению ферментативной активности. Для выяснения влияния ацилирования на ферментативную активность при «активации» нами был исследован с этой точки зрения ряд ферментов, в том числе протеаза и фибринолизин.

Таблица 1

Зависимость протеолитической активности иммобилизованной протеазы от времени хранения

Фермент	Протеолитическая активность протеазы (%) после хранения в течение				
	5 суток	8 суток	11 суток	48 суток	56 суток
Раствор нативной протеазы (рН 9,1; 4°; 0,5 мг/мл)	90	80	75	—	—
Иммобилизованная протеаза (рН 9,1; 4°)	20	10	0	0	0
Иммобилизованная протеаза в сухом состоянии (20°)	100	100	100	70	50

нолизин, а также α -химотрипсин и трипсин. Данные по изменению активности некоторых ферментов при ацилировании представлены на рис. 2. Оказалось, что при степени ацилирования $\alpha=300$ относительная активность трипсина и α -химотрипсина не только не уменьшается по сравнению с нативным, но и превосходит ее в ~ 2 раза.

С учетом данных рис. 2 следует, что ацилирование всех исследованных ферментов не приводит к уменьшению их активности, как, впрочем, и в случае реакции ацилирования трипсина уксусным ангидридом [16]. Кроме того, ацилирование не снижает ферментативной активности фибринолизина, что свидетельствует о том, что при ацилировании, по-видимому, не затрагиваются остатки серина, входящие в активный центр ферментов.

Наличие в молекулах ацилированных ферментов ненасыщенной связи $\text{C}=\text{C}$ обеспечивает возможность вступления их в реакции гомо- и сополимеризации с другими ненасыщенными мономерами. Выдергивание ацилированного трипсина, например, в присутствии окислительно-восстановительного инициатора радикальной полимеризации приводит к увеличению молекулярной массы ферmenta. Из рис. 3 видно, что продукт полимеризации ацилированного трипсина выходит из хроматографической колонки раньше, чем он сам.

Иммобилизацию ацилированного ферmenta на полимере проводили методом прямой радиационной прививки ацил-ферmenta на полимер под действием γ -излучения. Преимущество радиационной прививки перед другими методами заключается в том, что одновременно с прививкой происходит и стерилизация материала.

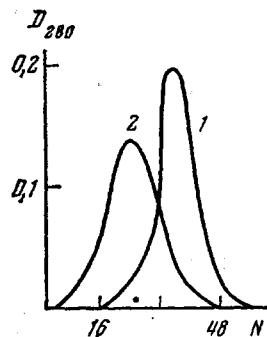
Привитая полимеризация одного ацилированного ферmenta приводит, однако, к получению образцов с невысокой активностью и неравномерным распределением привитого ферmenta по поверхности полимерного материала (табл. 2), как это следует из данных по люминесценции меченого препарата фибринолизина, когда в качестве люминесцентной метки использовали 1-диметиламино-5-нафталинсульфохлорид (дансил-хлорид). Прямыми наблюдениями было установлено, что люминесценция привитых полимерных пленок носит «островной» характер. Кроме того, образцы,

полученные прямой прививкой фермента на полимер, обладали таким же характером смачиваемости, т. е. недостаточно высокой гидрофильностью.

Для устранения этих недостатков нами была исследована совместная привитая сополимеризация активированного фермента и гидрофильного сомономера на поверхность полимера.

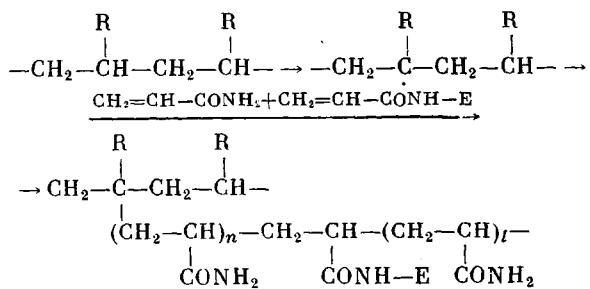
На начальной стадии сополимеризации ацилированного трипсина с акриламидом (рис. 4) основным продуктом реакции является относительно низкомолекулярный гомополимер акриламида (пик 3) *. По мере увеличения степени превращения мономеров в полимер доля сополимера ацилированного трипсина с акриламидом (пик 1) в продуктах реакции заметно увеличивается. При этом количество накопившегося на начальной стадии

Рис. 3. Гель-фильтрация ацилированного трипсина (1) и его гомополимера (2), полученного инкубацией ацилированного трипсина в присутствии персульфата аммония и N,N,N',N' -тетраметилэтилендиамина на сефадексе G-50. N — номер фракции



реакции полиакриламида остается практически постоянным, а количество мономерного трипсина (пик 2) уменьшается пропорционально увеличению концентрации сополимера.

Дополнительным подтверждением способности ацилированных ферментов вступать в сополимеризацию являются результаты определения скорости вымывания ферментов из полиакриламидных гелей, полученных полимеризацией нативного или ацилированного ферментов с акриламидом в присутствии сшивателя (рис. 5). Нативные ферменты не вступают в сополимеризацию с акриламидом и легко вымываются из сетки геля, в которой они оказываются связанными лишь физически, практически полностью в течение 0,5–1 час. Ацилированные ферменты, напротив, встраиваются в полимерные цепочки геля в результате реакции сополимеризации и после многократного промывания геля практически полностью остаются в его сетке, почти не теряя при этом своей активности. Эти результаты позволили предложить и осуществить привитую сополимеризацию ацилированных ферментов и акриламида на полимерные подложки методом прямой радиационной прививки смеси ацилированного фермента и акриламида под действием γ -облучения. Реакция протекает, вероятно, по следующей схеме (на примере ПИ):



* В условиях эксперимента при высокой скорости инициирования полимеризации молекулярная масса полиакриламида мало отличается от молекулярной массы рибофлавина, служащего инициатором полимеризации (пик 4).

Гидрофильный мономер, в данном случае акриламид, облегчает процесс привитой сополимеризации активированного фермента. Можно ожидать, что введение в реакционную смесь акриламида приведет к тому, что первым актом реакции привитой сополимеризации будет присоединение к мак-

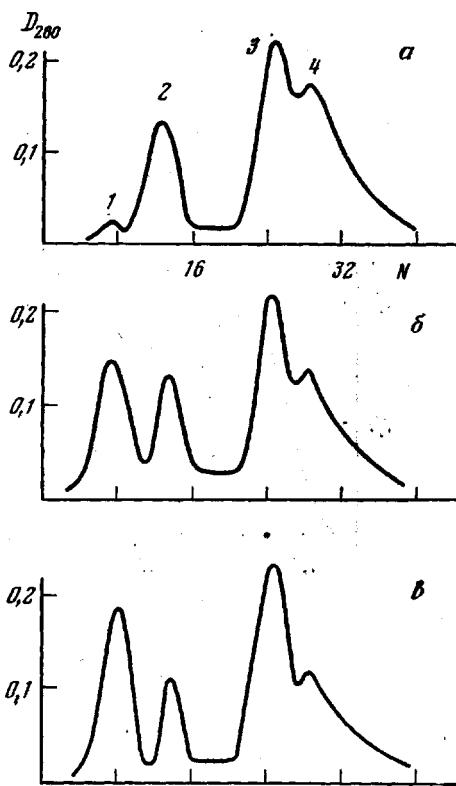


Рис. 4

Рис. 4. Гель-фильтрация сополимеров ацилированного трипсина с акриламидом, полученных в присутствии рибофлавина на сефадексе G-50. Время полимеризации 10 (а), 15 (б) и 30 мин (в)

Рис. 5. Зависимость концентрации белка в гелях от времени вымывания: 1 — трипсин, ацилированный ненасыщенной кислотой, 2 — уксусным ангидридом; 3, 4 — нативный и ацилированный фибринолизин соответственно

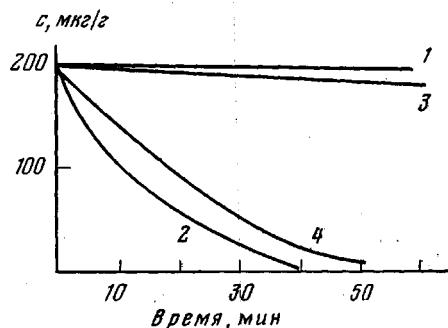


Рис. 5

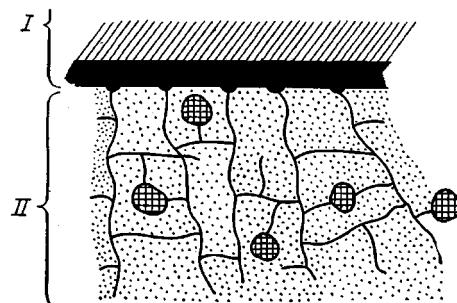
рорадикалу молекул акриламида, в результате чего радикал удалится от поверхности, облегчая тем самым присоединение молекулы фермента. Вторая функция гидрофильного мономера заключается в гидрофилизации поверхности полимера в результате прививки, что обеспечивает дополнительный вклад в повышение гемосовместимости, поскольку известно, что создание на поверхности полимера гидрофильного слоя в значительной степени повышает тромборезистентность материала [17, 18]. Поверхность полимера в результате привитой сополимеризации покрывается гидрофильным слоем сшитого полиакриламидного геля, в порах которого находятся ковалентно-связанные с цепями полиакриламида макромолекулы фермен-

Таблица 2

Зависимость ферментативной активности препаратов от состава исходной мономерной смеси при дозе 0,3 М.д

Весовое соотношение акриламид: ацилиро- ванный фермент	Активность (μкг тирозина/мин·10 см ²)			
	фибринолизина		протеазы	
	протеолити- ческая	фибринолити- ческая	протеолити- ческая	фибринолити- ческая
0	0,5±0,4	0,6±0,1	0,7±0,1	4,5±0,3
200	4,7±0,3	2,0±0,2	9,6±0,3	14,3±0,5
400	20,0±1,0	14,1±0,5	27,8±1,2	29,1±1,3
800	21,6±1,1	16,5±0,6	27,0±1,2	34,2±1,3

та. Схематически это можно представить следующим образом:



I – полимер, II – гидрофильный слой. Сплошные линии – поликарбамидные цепи, заштрихованные области – макромолекулы фермента, точки – молекулы воды.

Возникновение сплошной структуры при облучении даже в отсутствие сшивавшего агента обусловлено либо протеканием реакции передачи цепи с участием подвижного атома водорода цепей поликарбамида, либо тем, что роль сшивавшего агента выполняет сам ацилированный фермент, поскольку в процессе ацилирования избытком хлорангидрида на одной макромолекуле фермента может возникнуть две и более двойных связей C=C. Вторая причина является более вероятной, поскольку гомополимеризация ацилированных образцов фибринолизина, например, приводит к получению сплошных продуктов полимеризации без использования какого-либо сшивателя. Подтверждением возникновения гелевой структуры на поверхности полимера является также образование нерастворимого сополимера при облучении смеси ацилированной протеазы с акриламидом в отсутствие полимерной подложки и сшивателя.

Результаты исследования влияния γ -облучения на свойства нативных и ацилированных ферментов представлены на рис. 6. Из рисунка видно, что, во-первых, ацилирование ферментов приводит к некоторому возрастанию их радиационной устойчивости и, во-вторых, в результате воздействия γ -излучения в значительной степени изменяется соотношение фибринолитической и протеолитической активностей протеазы и фибринолизина. Так, при дозе облучения около 3 Мрад ацилированная протеаза полностью теряет общую протеолитическую активность, сохраняя при этом ~30% исходной фибринолитической активности.

Кроме того, необходимо отметить, что в процессе γ -облучения при дозах порядка 2–2,5 Мрад происходит полная стерилизация образцов, о чем свидетельствует отсутствие помутнения бульона Хойтингера после инкубации облученных образцов в бульоне при 37 и 28° в течение 2 суток.

Результаты по привитой сополимеризации смесей ацилированного фермента и акриламида различного состава на полипропиленовую ткань приведены в табл. 2.

Сравнение активностей модифицированных полипропиленовых тканей, полученных иммобилизацией фермента на привитой сополимер аллиламина и совместной прививкой ацилированного фермента и акриламида на поверхность полимера, свидетельствуют о том, что в последнем случае при равных дозах облучения активность препаратов почти на два порядка выше*.

* Приведенные в табл. 3 значения фибринолитической активности препаратов несомненно являются заниженными, так как используемая в настоящей работе методика определения фибринолитической активности (реакция между ферментом и сгустком фибрин) не позволяет определить точное значение этого параметра. При использовании иммобилизованных ферментов субстрат и фермент находятся в твердом состоянии и реакция проходит в гетерогенных условиях со всеми вытекающими отсюда осложнениями.

Результаты исследования стабильности полученных препаратов представлены в табл. 3.

Из табл. 1 и 3 видно, что замена связи C=N на C-C, посредством которой макромолекула фермента присоединена к полимерной матрице, приводит к существенному повышению стабильности препаратов. Так, если в первом случае при хранении в течение 11 суток образцы полностью те-

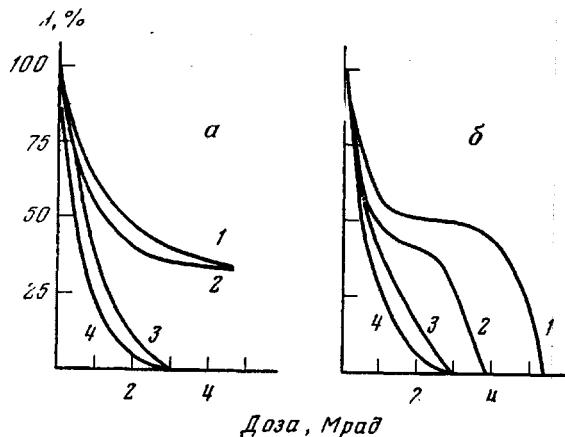


Рис. 6. Зависимость относительных активностей протеазы (а) и фибринолизина (б) от дозы γ -облучения:

1, 2 — фибринолитическая, 3, 4 — протеолитическая активность ацилированного (1, 3) и нативного фермента (2, 4)

ряют свою активность, то в последнем случае при тех же условиях хранения препаратов (pH 9,1, 4°) некоторые образцы сохраняют до 50% исходной активности в течение 17 суток.

Результаты изучения гемосовместимости синтезированных материалов, проведенного *in vitro* по методу Ли и Уайта [19], представлены в табл. 4. Исследования проводили в обеспыленной атмосфере путем измерения времени свертывания крови, нанесенной на поверхность модифицированного материала.

Из таблицы видно, что независимо от природы используемых полимеров модификация приводит к существенному увеличению времени свертывания крови. Так как при контакте крови с полимером реакция образования сгустка фибрина инициируется на полимерной поверхности, то увеличение времени свертывания свидетельствует о снижении скорости этой реакции, т. е. о повышении гемосовместимости полимерного материала.

Таблица 3

Зависимость протеолитической активности препаратов от времени хранения (pH 9,1; 4°)

Весовое соотношение фермент:акриламид	Активность препарата (%) после хранения в течение			
	11 суток		17 суток	
	протеаза	фибринолизин	протеаза	фибринолизин
1:100	88	75	54	50
1:200	50	70	32	40
1:400	31	64	21	20
1:800	80	20	12	5

Таким образом, суммируя полученные результаты, можно сделать вывод о перспективности предложенных способов повышения гемосовместимости полимерных материалов. Использование этих способов позволяет получать материалы с достаточно высокой гемосовместимостью как при кратковременном, так и при долговременном контакте с кровью.

Таблица 4

Зависимость времени свертывания крови от фибринолитической активности иммобилизованных ферментов

Исходный полимер	Время свертывания, мин					
	активность, мкг тирозина/мин					
	фибринолизина			протеазы		
	0	0,6	16,5	0	4,5	34,2
ПЭ	6,5±0,5	80±1	>120	6,5±0,5	108±1	>200
ПП	6,0±0,5	80±1	>120	6,0±0,5	100±1	>200
Лавсан	7,5±0,5	88±1	>120	7,5±0,5	115±1	>200

В работе были использованы: бычий трипсин и химотрипсин фирмы «Serva» (США), фибринолизин фирмы «Sigma Chemical Company» (США), протеаза из *Actinomyces Sphaeroides*, любезно предоставленная проф. Н. С. Егоровым (кафедра микробиологии Биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова) *. Все использованные в работе вещества очищали по общепринятым методикам. Синтез хлорангидридов проводили по методике [20]. В колбу с обратным холодильником вносили 1 моль акриловой кислоты, 2 моля бензоилхлорида и 0,05 г гидрохинона. Реакционную смесь кипятили в течение 1 час. Хлорангидрид отгоняли, собирая фракцию с т. кип. 75°. Для предотвращения полимеризации хлорангидрид хранили в темноте при 4°.

Ацилирование ферментов проводили путем добавления к раствору фермента в бикарбонатном буфере pH 8,0 требуемого количества хлорангидрида акриловой кислоты в течение 1 час при 0° при постоянном перемешивании.

Для привитой сополимеризации аллиламина обезжиренную эфиром полимерную пленку или ткань площадью 10 см² помещали в ампулу, добавляли аллиламин, ампулу вакуумировали (10⁻³ torr), запаивали и подвергали радиационному облучению на источнике ⁶⁰Со. Облученную ткань промывали бикарбонатным буфером и помещали в 10%-ный водный раствор глутарового альдегида на 3–4 час при комнатной температуре. Образцы промывали бикарбонатным буфером и помещали в раствор фермента на 12–14 час при 4°.

Гомо- и сополимеризацию ацилированного трипсина с акриламидом проводили в вакууме либо при 20° (используя в качестве инициатора полимеризации рибофлавин, концентрация которого составляла 10 мг/л), либо при 36° в присутствии персульфата аммония в смеси с N,N,N',N'-тетраметилэтидиамином.

Продукты гомо- и сополимеризации разделяли гель-фильтрацией на колонке (1,2×60 см) с сефадексом G-50 (Pharmacia), уравновешенной 0,01 M трис-acetатным буфером при pH 8,5. Элюирование проводили тем же буфером со скоростью 30–40 мл/час. Продукты сополимеризации анализировали спектрофотометрическим [21] или гравиметрическим методами с последующим определением ферментативной активности каждой фракции.

Привитую сополимеризацию акриламида и ацилированного фермента проводили путем облучения полимерной ткани в растворе ацилированного фермента и акриламида.

Концентрацию ферментов в растворе определяли методом Лоури, в основе которого лежит калориметрическая реакция с реагентом Фолина – Чокальтеу [22].

Протеолитическую активность нативного фермента определяли модифицированным методом Ансона [23], используя в качестве субстрата 1%-ный раствор казеина. Активность выражали в мкг тирозина/мин·мг белка. Активность иммобилизованного фермента определяли аналогичным образом и выражали в мкг тирозина/мин·10 см².

Фибринолитическую активность определяли тем же методом, но в качестве

* Авторы выражают искреннюю благодарность проф. Н. С. Егорову и сотрудникам кафедры микробиологии МГУ за предоставленные образцы протеазы.

субстрата использовали фибрин (искусственный тромб), полученный смешиванием 0,7 мл 0,3%-ного (по белку) раствора фибриногена с 0,05 мл 0,5%-ного раствора тромбина в грис-буфере (рН 9,0) при комнатной температуре.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию
10 VII 1979

ЛИТЕРАТУРА

1. *B. K. Kusserow, R. W. Larrow, J. E. Nichols, Trans. Amer. Soc. Artif. Inter. Organs.*, 12, 8, 1973.
2. *F. B. Ablondi, In The Enzymes. v. 4, New York — London, 1960, p. 175.*
3. *H. C. Егоров, М. А. Аль-Нури, Н. А. Баранова, В. Г. Крейер, Авт. свид. 506619, 1975; Бюлл. изобретений, 1976, № 10.*
4. *H. A. Платэ, In Polymeric Drugs, New York — London, 1970, p. 63.*
5. *Л. И. Валуев, М. А. Аль-Нури, Н. А. Баранова, Н. С. Егоров, Н. А. Платэ, Тезисы докладов Симпозиума «Физиологически активные полимеры», Ленинград, 1975, стр. 31.*
6. *Л. И. Валуев, В. В. Чупов, М. А. Аль-Нури, Н. С. Егоров, Н. А. Платэ, Тезисы докладов II Всесоюзного симпозиума «Получение и применение иммобилизованных ферментов», Абовян, 1977, стр. 124.*
7. *В. В. Чупов, Л. И. Валуев, Н. А. Платэ, Тезисы доклада Всесоюзной научной конференции «Состояние работ по созданию и технологии получения ферментов специального назначения», Москва, 1978, стр. 99.*
8. *Н. А. Платэ, Л. И. Валуев, Н. А. Баранова, М. А. Аль-Нури, Н. С. Егоров, Авт. свид. 545648, 1976; Бюлл. изобретений, 1977, № 5.*
9. *Н. А. Платэ, Л. И. Валуев, М. А. Аль-Нури, И. С. Егоров, Прикл. биохимия и микробиология, 13, 673, 1977.*
10. *Н. А. Платэ, Л. И. Валуев, М. И. Мастерова, А. П. Истомин, Авт. свид. 608813, 1978; Бюлл. изобретений, 1978, № 20.*
11. *Н. А. Платэ, Л. И. Валуев, М. А. Аль-Нури, Н. С. Егоров, В. В. Навроцкая, Авт. свид. 665639, 1976; Бюлл. изобретений, 1979, № 20.*
12. *Н. А. Платэ, Л. И. Валуев, М. А. Аль-Нури, Н. С. Егоров, В. В. Навроцкая, Авт. свид. 666815, 1979; Бюлл. изобретений, 1979, № 21.*
13. *В. П. Зубов, Е. С. Гарина, В. Ф. Корнильева, М. Н. Мастерова, В. А. Кабанов, Л. С. Полак, Высокомолек. соед., A15, 100, 1973.*
14. *Иммобилизованные ферменты, под ред. И. В. Березина, т. 1, Изд-во МГУ, 1976, стр. 181.*
15. *The booklet «The sterilization of plastics», London, 1974.*
16. *Y. Labonnesse, M. Gervais, Europ. J. Biochem., 2, 215, 1967.*
17. *J. D. Andrade, Med. Inst., 7, 110, 1973.*
18. *A. L. Kaganov, J. Stamberg, P. Synek, J. Biomed. Mater. Res., 10, 1, 1976.*
19. *R. Y. Lee, P. D. White, Amer. J. Med. Sci., 145, 495, 1913.*
20. *G. H. Stempel, J. Amer. Chem. Soc., 72, 2299, 1950.*
21. *N. Catstimpoolas, J. Kenney, J. Chrom., 71, 573, 1972.*
22. *G. Folin, V. Giocalten, J. Biol. Chem., 3, 627, 1927.*
23. *M. L. Anson, I. Gen. Physiol., 22, 79, 1938.*

INFLUENCE OF METHODS OF PROTEOLYTIC ENZYMES IMMOBILIZATION IN POLYMER HYDROGELS ON THE BLOODCOMPATIBILITY OF MODIFIED POLYMERIC MATERIALS

Plate N. A., Valuyev L. I., Chupov V. V.

Summary

The possibilities of enhancing of bloodcompatibility of polymeric materials by means of the immobilization on their surface some proteolytic enzymes (trypsin, chymotrypsin, fibrinolysin and protease from actinomycets) have been studied. The methods of enzymes immobilization on polymeric materials were worked out. It was shown that the immobilization of fibrinolysin and protease by grafting enzymes modified by acryloyl chloride to polymers in the presence of hydrophilic comonomer resulted in the formation of highactive and stable products demonstrating increased bloodcompatibility.