

УДК 541.64:547.96

## МОДИФИКАЦИЯ ПОЛИМЕРОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

© 1993 г. Н. А. Платэ, Л. И. Валуев, О. Н. Зефирова

Институт нефтехимического синтеза им. А. В. Топчева Российской академии наук

117912 Москва, Ленинский пр., 29

Поступила в редакцию 22.12.92 г.

Рассмотрены способы создания многокомпонентных каталитических систем путем химической модификации полимеров биологически активными соединениями или сополимеризацией макромономеров этих соединений с гидрофильными мономерами. На примере систем фермент–кофактор и смесей ферментов (протеиназа–гепарин, протеиназа–углеводородный радикал, сывороточный альбумин–ферменты класса оксидоредуктаз и т. д.) показано, что протекание последовательных каталитических процессов возможно только при благоприятном расположении иммобилизованных соединений в объеме или на поверхности полимера. В максимальной степени такое расположение обеспечивает сополимеризационный метод модификации полимеров. Продемонстрированы возможности применения многокомпонентных систем для регулирования специфичности действия ферментов, создания совместимых с кровью полимерных материалов, повышения эффективности действия биоспецифических сорбентов.

### ВВЕДЕНИЕ

Последние десятилетия характеризуются качественно новым этапом развития биохимии, биотехнологии, медицины и химии полимеров медико-биологического назначения, с которым связывают решение таких теоретических и прикладных проблем, как создание новых типов полимерных материалов и лекарственных средств, высокоэффективных катализаторов и новых технологий синтеза химических соединений, принципиально новых методов разделения и очистки веществ природного происхождения и т. д. Решение большинства из этих проблем возможно на основе использования гетерогенных систем, способных избирательно воздействовать на одно или узкий круг соединений, присутствующих в сложной, многокомпонентной смеси, включая биологические ткани.

Наиболее перспективным подходом к созданию таких систем представляется иммобилизация на полимерном носителе нескольких биологически активных соединений (БАС), одно из которых обеспечивает селективное извлечение из смеси требуемого субстрата, например по механизму биоспецифического связывания, а другие оказывают на этот субстрат необходимое воздействие [1].

По аналогии с живой клеткой – идеальной, многокомпонентной каталитической системой, можно предположить, что протекание такого рода последовательных процессов возможно только при благоприятном расположении иммобилизованных соединений в объеме или на поверхности полимера. Обеспечение такого распо-

ложения, т. е. конструирование подобных систем на молекулярном уровне и является наиболее сложной задачей при разработке методов модификации природных и синтетических полимеров смесями различных БАС.

### НЕКОТОРЫЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Подавляющее большинство способов ковалентной иммобилизации БАС заключается в сшивании предварительно адсорбированных на полимерной поверхности молекул БАС полифункциональными реагентами или в химическом взаимодействии белков с реакционноспособной или предварительно активированной матрицей уже готового полимерного носителя [2]. Последнее, как было показано в работе [3], определяет основной недостаток этих способов, заключающийся в невозможности достижения стерического соответствия между молекулой БАС и поверхностью носителя и, как следствие, нарушении надмолекулярной структуры БАС (главным образом белковой природы) и их функциональной активности. Так, каталитическая активность большинства иммобилизованных таким образом ферментов находится на уровне 3–70% от исходного и лишь в редких случаях приближается к активности нативного фермента [4].

Иммобилизованные полиферментные системы обладают тем преимуществом, что субстраты для второго, третьего и т. д. ферментов образуются на поверхности или в объеме полимера непосредственно в том месте, где расположены фермен-

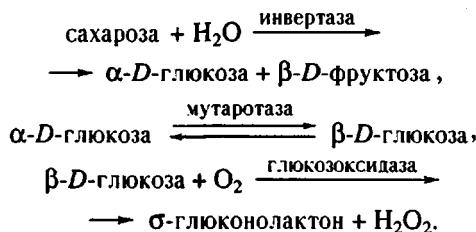
ты, поэтому реальная концентрация субстратов вокруг ферментов всегда выше, чем их средняя концентрация в растворе. Таким образом, благодаря соответствующему расположению ферментов последовательная цепь реакций протекает более эффективно, что в значительной степени нивелирует потерю ферментативной активности индивидуально иммобилизованных БАС.

Классическим примером такой соиммобилизации является совместное связывание с полимерной матрицей фермента и кофактора (ATP, NADH и др.) [5 - 8]. При этом достигается не только высокая устойчивость соиммобилизованных систем и сохранение их работоспособности в процессе многократного непрерывного использования, но и существенное повышение активности каталитической системы по сравнению с активностью той же системы в растворе.

Принципиально важным является тот факт, что система, образованная путем иммобилизации фермента и кофактора на раздельные полимерные матрицы, имеет низкую активность; при иммобилизации фермента и кофактора на один и тот же носитель активность системы значительно возрастает [9]. Например, активность смеси иммобилизованных лактатдегидрогеназы, алкогольдегидрогеназы и NAD в 3 раза ниже активности системы с совместно иммобилизованными ферментами и кофактором, что указывает на определяющую роль близкого расположения фермента и кофактора на полимерной матрице [9].

В подавляющем большинстве исследований, посвященных поликомпонентным системам, обычно рассматривают иммобилизацию двух или нескольких ферментов, катализирующих ряд последовательных процессов, когда продукт реакции, катализируемой одним из них, является субстратом для другого фермента [10, 11]. При рассмотрении иммобилизованных и последовательно действующих ферментов (которые могут работать только совместно) чаще всего, как и в случае системы фермент-кофактор, отмечают существенное увеличение эффективности иммобилизованной системы по сравнению с той же, находящейся в растворе. Например, в результате иммобилизации трех ферментов цикла Кребса (малатдегидрогеназы, цитратсинтетазы и лактатдегидрогеназы), последовательно катализирующих реакции превращения малата в лактат, резко растет активность системы. При этом иммобилизация малатдегидрогеназы и цитратсинтетазы на одной полимерной матрице приводит к повышению эффективности до 230% по сравнению с растворимой системой, а соиммобилизация трех ферментов цикла Кребса – до 480%.

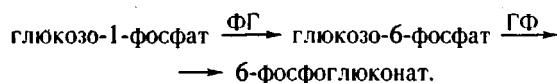
В работе [12] изучена активность иммобилизованных препаратов инвертазы, мутаротазы и глюкозоксидазы, катализирующих ряд последовательных реакций, составляющих основу энзиматического метода определения концентрации сахарозы



Было обнаружено, что при раздельной иммобилизации ферментов скорость последовательного образования  $\beta$ -D-глюказы оказывается слишком низкой, в то время как соиммобилизованная система обеспечивает высокую скорость и чувствительность анализа, приближающуюся к теоретической.

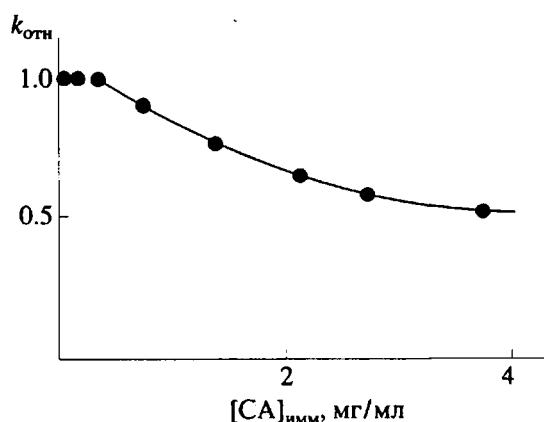
Повышение эффективности иммобилизованной системы в 1.4 - 2.4 раза по сравнению с аналогичными системами в растворе и при раздельной иммобилизации наблюдали также для таких двухкомпонентных систем, как гексокиназа-глюкоз-6-фосфатдегидрогеназа [13, 14] и галактозидаза-глюкозоксидаза [13, 15].

В работах [16 - 18] проведено обширное исследование фосфоглюкомутазы (ФГ) и глюкозо-б-фосфатдегидрогеназы (ГФ), иммобилизованных на целлюлозу, активированную  $\delta$ -триазинтрихлоридом. Эти ферменты осуществляют последовательные реакции

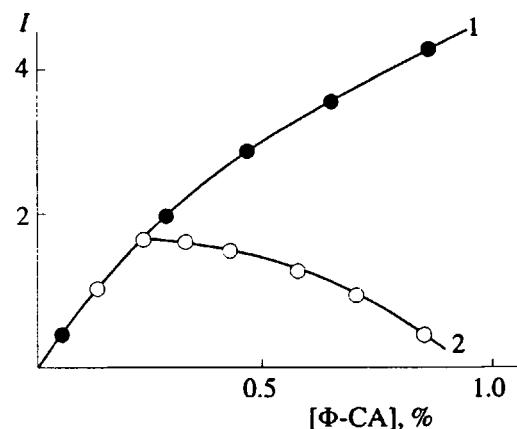


Были изучены следующие системы: 1) оба фермента находятся в растворе; 2) ФГ иммобилизован, ГФ в растворе; 3) ферменты иммобилизованы по отдельности; 4) ферменты иммобилизованы совместно. Оказалось, что эффективности систем 1 - 3 невысоки, а их активность уменьшается от первой к третьей. Четвертая система обладала довольно высокой активностью в отличие от первых трех, что проявлялось также в присутствии интермедиата (ГФ) в элюенте в концентрации на 33% ниже, чем ожидаемая, исходя из активностей ферментов в растворе.

Наблюдаемое повышение эффективности соиммобилизованных полиферментных систем, как было показано, происходит, во-первых, за счет сближения различных ферментов на полимерном носителе по сравнению со средним расстоянием между ними в растворе (в  $\sim 10^3$  раз), и, во-вторых, за счет изменения микроокружения ферментов при возрастании диффузационных ограничений для выхода промежуточных продуктов реакций из полимерной матрицы [19, 20]. С учетом этого в работе [21] для соиммобилизованных в поли(2-оксиэтил)метакрилатном геле инвертазы и глюкозоксидазы, осуществляющих конверсию сахарозы, были предложены теоретические кинети-



**Рис. 1.** Зависимость относительной константы взаимодействия сывороточного альбумина (CA) с билирубином от концентрации иммобилизованного в сшитом поли-N-винилпирролидоне CA.  $k_{\text{отн}} = k_{\text{имм}}/k_{\text{растра}}$ , где  $k_{\text{имм}}$  и  $k_{\text{растра}}$  – константы взаимодействия билирубина с иммобилизованным и нативным CA.



**Рис. 2.** Зависимость интенсивности флуоресценции  $\Phi\text{-CA}$  от его концентрации в индивидуальном растворе (1) и в смешанном растворе  $\Phi\text{-CA}$  и  $P\text{-CA}$  (2).  $\Phi\text{-CA} : P\text{-CA} = 1 : 10$ ,  $pH = 7.4$ .

ческие модели. В моделях учитывали взаимодействие между ограниченными диффузионными областями двух ферментов внутри пустот пористой твердой подложки, а также влияние соотношения ферментов и факторов микроокружения на скорость реакции. Сравнение наблюдаемых и расчетных скоростей показало, что для описания поведения иммобилизованных ферментов необходимо учитывать скорость потока, размер частиц геля, диффузность геля и другие факторы микроокружения, отсутствующие в растворе.

Таким образом, анализ рассмотренных экспериментальных данных убедительно подтверждает предположение о том, что необходимым условием успешного функционирования многокомпонентных гетерогенных катализитических систем является благоприятное расположение иммобилизованных БАС. Только при таком расположении возможно эффективное протекание последовательных химических превращений, катализируемых этими веществами.

Методы иммобилизации, основанные на химическом взаимодействии смеси БАС с активированными группами полимера-носителя, хотя и приводят к получению "работающих" систем, однако не позволяют в полной мере реализовать заложенные в них потенциальные возможности. В связи с этим представляется вполне закономерным использование принципиально нового подхода к иммобилизации БАС, включающего предварительную активацию БАС введением в их состав способных к полимеризации двойных связей и последующую сополимеризацию ненасыщенных производных БАС с гидрофильным мономером и сивающим агентом. В данном случае иммобилизация БАС протекает одновременно с процессом формирования полимерной матрицы и

обычно не сопровождается изменением конформации их макромолекул и биологической активности, а при условии предварительной ассоциации ненасыщенных производных БАС различной химической природы обеспечивает иммобилизацию таких ассоциатов без их разрушения.

Изучение активности иммобилизованных белков выявило одну общую для них закономерность: измеряемая активность белков уменьшается по мере увеличения концентрации иммобилизованного белка (рис. 1) [22 - 24].

Основная причина этого явления была выявлена в работе [23] при исследовании поведения сывороточного альбумина, меченого флуоресцеином ( $\Phi\text{-CA}$ ) или родамином ( $P\text{-CA}$ ), методом флуоресцентной спектроскопии (рис. 2).

Из рис. 2 видно, что при суммарной концентрации белков в растворе до 0.1 - 0.2% интенсивность флуоресценции смесей белков близка к соответствующей интенсивности индивидуального белка, т.е. обе метки, одна из которых является донором, а другая акцептором энергии, не взаимодействуют друг с другом. При дальнейшем повышении концентрации белка интенсивность флуоресценции  $\Phi\text{-CA}$  в смеси с  $P\text{-CA}$  уменьшается за счет передачи части энергии с донора на акцептор. Это однозначно свидетельствует о том, что в растворе возникают ассоциаты молекул CA, в которых расстояние между метками (около 50 - 80 Å) значительно меньше среднего расстояния, рассчитанного для равномерного распределения CA в растворе (порядка 500 - 600 Å при концентрации белка 0.1%).

При сополимеризации ненасыщенного производного  $\Phi\text{-CA}$  с акриламидом и сивающим агентом интенсивность флуоресценции красителя

уменьшается в результате присоединения молекулы белка к нерастворимому носителю. Аналогичные изменения флуоресценции наблюдаются и при сополимеризации смеси Ф-СА с Р-СА. Это указывает на то, что дополнительного изменения расстояния между молекулами СА в процессе иммобилизации не происходит; на гелепрочно фиксируются образовавшиеся в растворе ассоциаты, которые в иммобилизованном состоянии стабилизируются за счет связывания каждой молекулы с нерастворимым полимером. При этом часть активных центров молекул иммобилизованного белка становится недоступной для молекул субстрата, что и приводит к уменьшению активности белка.

Обнаруженный факт сохранения ассоциатов макромономеров белков при их иммобилизации имеет принципиальное значение с учетом рассмотренных ранее результатов, свидетельствующих о необходимости достаточно близкого расположения иммобилизованных белков для создания многокомпонентных каталитических систем.

### СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ПРОТЕИНАЗ

К одному из наиболее важных направлений практического использования многокомпонентных систем следует отнести их применение для повышения эффективности действия биоспецифических сорбентов. При создании таких систем основная проблема заключается в правильном выборе не только биоспецифического лиганда, но и катализатора, обеспечивающего трансформацию сорбированного вещества. В случае, когда сорбируется белок (а это наиболее часто встречающаяся ситуация), в качестве такого катализатора весьма удобно использовать протеолитические ферменты.

Впервые принципиальная возможность создания подобных систем была продемонстрирована в работе [25] на примере синтеза препаратов для селективного гидролиза трипсином сывороточного альбумина в смеси с фибриногеном. Стратегия синтеза таких препаратов состояла в следующем. В качестве биоспецифического лиганда был использован ненасыщенный углеводород, способный по механизму гидрофобного взаимодействия образовывать с СА комплексы с константой комплексообразования  $0.8 \times 10^3$  (моль/л) $^{-1}$ . Известно, что в водных растворах трипсин способен солюбилизировать соединения с длинными углеводородными радикалами [26], т.е. в водном растворе оба соединения существуют в виде достаточно стабильных ассоциатов. Поэтому каталитические системы получали сополимеризацией ассоциатов макромономера трипсина и ненасыщенного углеводорода с акриламидом и N,N'-метилен-бис-акриламидом. Предварительная ассоциация обоих компонентов системы в сочетании с

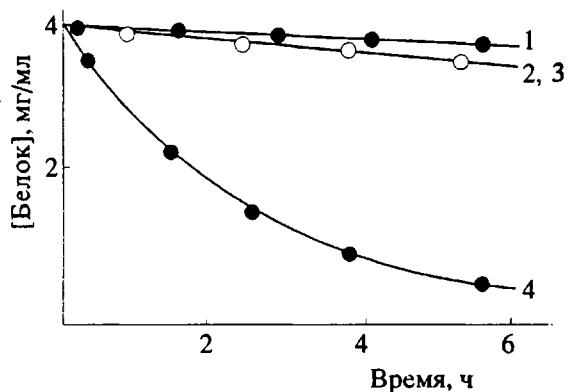


Рис. 3. Зависимость концентрации СА (1, 4) и фибриногена (2, 3) от времени инкубирования с полиакриламидными гидрогелями, содержащими 0.46 мг трипсина (1, 2) или 0.46 мг трипсина + 1.12 мг ненасыщенного углеводорода на 1 мл геля (3, 4).

“мягким” способом их иммобилизации обеспечивали согласованное действие всей системы (рис. 3).

Видно, что скорости гидролиза обоих белков под действием иммобилизованного трипсина практически одинаковы, т.е. селективность действия фермента на какой-либо белок отсутствует. Иная картина наблюдается при использовании двухкомпонентной системы. В данном случае СА, образуя комплексы с иммобилизованным углеводородным радикалом, концентрируется в объеме гидрогеля, что приводит к повышению локальной концентрации этого белка в непосредственной близости от трипсина и, как следствие, к значительному повышению скорости гидролиза белка.

Изменив природу биоспецифического лиганда, можно, напротив, добиться ускорения гидролиза фибриногена в смеси с СА. Известно, что фибриноген образует комплексы с гепарином-мукополисахаридом, содержащим большое количество отрицательно заряженных в физиологических условиях сульфогрупп (константа связывания фибриногена гепарином составляет  $5 \times 10^3$  (моль/л) $^{-1}$ ) [27]. В связи с этим одновременная иммобилизация в гидрогеле трипсина и гепарина приводит к ускорению гидролиза фибриногена, который оказывается более доступным для фермента, поскольку именно он извлекается из смеси белков за счет специфического связывания с гепарином (рис. 4) [28]. Повышению скорости гидролиза фибриногена в немалой степени способствует близкое расположение в гидрогеле молекул обоих БАС, так как в данном случае иммобилизации подвергались комплексы макромономеров трипсина и гепарина, возникающие в растворе за счет электростатического взаимодействия двух противоположно заряженных соединений – трипсина и гепарина.

Близкий по смыслу результат был получен в работе [29] при создании системы, способной

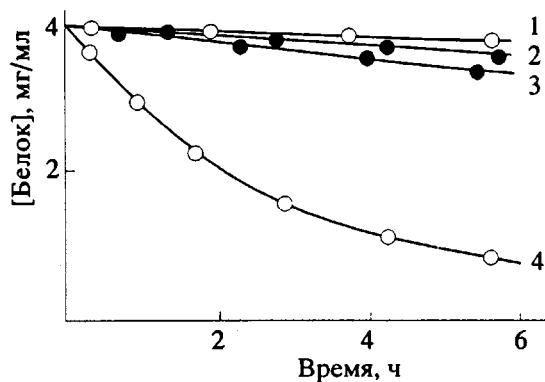


Рис. 4. Зависимость концентрации фибриногена (1, 4) и СА (2, 3) от времени инкубирования с гелем, содержащим 0.46 мг трипсина (1, 2) или 0.46 мг трипсина + 1.43 мг гепарина на 1 мл геля (3, 4).

сорбировать и одновременно активировать неактивный предшественник плазмина – плазминоген. Синтез каталитической системы осуществляли сополимеризацией акриламида и N,N'-бис-метиленакриламида с макромономером трипсина и N<sup>ε</sup>-метакрилоил-L-лизином – взаимодействующим с плазминогеном биоспецифическим лигандом. Синтезированный гидрогель был использован для селективного извлечения плазминогена из плазмы крови, причем одновременно с сорбцией протекал процесс активации плазминогена иммобилизованным трипсином. Эта система “работала” как сорбент с практически неограниченной емкостью, поскольку образующийся в результате активации плазмин не связывался с лизином и постепенно диффундировал из матрицы гидрогеля.

Рассмотренные результаты свидетельствуют о том, что использование многокомпонентных иммобилизованных систем позволяет подойти к решению одной из главных проблем современной биохимии – проблемы регулирования специфичности действия ферментов. Это достигается вве-

дением в окружение фермента специфического по отношению к требуемому субстрату лиганда, избирательно извлекающего этот субстрат из сложной смеси и “доставляющего” его непосредственно в зону действия фермента.

Можно высказать предположение, что подобные механизмы регулирования активности и специфичности действия ферментов могут встречаться и в “живых” системах, особенно в отношении ферментов, функционирующих в иммобилизованном, мембраносвязанном состоянии.

Что касается прикладных задач, то в настоящее время рассмотренная выше система гепарин-трипсин уже нашла применение для решения чрезвычайно важной проблемы химии медико-биологических полимеров – создания совместимых с кровью полимерных материалов.

В табл. 1 приведены результаты исследования модифицированного полиэтилена в опытах *in vitro* [24, 30]. Видно, что если модификация полимера одним трипсином практически не влияет на время свертывания крови и степень адгезии тромбоцитов, а модификация гепарином хотя и приводит к увеличению времени свертывания, но сопровождается повышением адгезии тромбоцитов, то для двухкомпонентных систем характерна низкая степень адгезии тромбоцитов в сочетании с повышенным временем свертывания крови.

Из табл. 2 видно, что гипокоагуляционные эффекты, наблюдавшиеся в крови в результате ее контакта с бинарной системой, имеют тот же характер, что и при воздействии на кровь гепаринодержащего полимера, но значительно пре-восходят их по абсолютной величине. Механизм этого явления заключается в последовательности воздействий каждого из БАС на определенный фактор свертывающей системы крови. Например, вследствие избирательной сорбции фибриногена на иммобилизованном гепарине трипсин с высокой эффективностью гидролизует именно этот белок, который не только является “строительным материалом” для образования фибринового сгустка, но и вызывает дополнительную адгезию тромбоцитов на поверхности полимера, обусловленную специфическим взаимодействием фибриногена с некоторыми ферментами, локализованными на мембране тромбоцита [27].

Повышенная скорость гидролиза фибрина бинарными системами по сравнению с гидролизом под действием полимера, модифицированного только трипсином (рис. 5), связана с тем, что иммобилизованный гепарин образует комплексные соединения с продуктами гидролиза фибрина, уводя их из зоны реакции и повышая тем самым эффективность действия иммобилизованного трипсина [31].

Вывод о высокой гемосовместимости таких полимеров был полностью подтвержден результатами имплантации сосудистых фторлон-лавса-

Таблица 1. Оценка гемосовместимости модифицированного полиэтилена

Содержание БАС, мг/см <sup>2</sup> поверхности		Относительное время свертывания крови* ( $\pm 10\%$ )	Относительный показатель адгезии тромбоцитов ( $\pm 10\%$ )
гепарин	трипсин		
0	0	1.2	1.8
0.3	0	1.8	3.9
1.5	0	10.0	6.0
0	0.1	1.2	1.3
0.3	0.2	2.1	2.3
0.3	0.3	3.2	1.6

\*Стандарт – стекло.

новых протезов в vena cava собаки, т.е. в участок с наиболее медленным кровотоком и поэтому наиболее склонный к тромбированию. Протезы, модифицированные трипсином и гепарином, сохраняли проходимость в сроки наблюдения до 7.5 мес, в то время как контрольные протезы полностью тромбировались через первые 6 - 8 ч.

Иными словами, уже сейчас можно говорить о том, что на основе систем протеолитический фермент-антикоагулянт крови удается синтезировать ряд модифицированных полимеров, которые по гемосовместимым свойствам во многом превосходят известные до сих пор синтетические материалы.

## КАТАЛИЗАТОРЫ РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ

Несмотря на многообразие описанных многокомпонентных систем, в большинстве из них соиммобилизовались БАС последовательного действия, когда одно поставляло субстрат для другого. Соиммобилизация БАС параллельного действия представляет собой более трудную задачу и работы такого типа встречаются крайне редко.

Одним из примеров является работа [32], в которой решали проблему разрушения микроорганизмами иммобилизованных ферментов. Авторами было предложено иммобилизовать два БАС, одно из которых ( $\beta$ -галактозидаза) осуществляет нужное превращение, а другое (лизоцим) разрушает клетки микроорганизмов.

Было исследовано поведение систем трех видов: 1) только иммобилизованная  $\beta$ -галактозидаза, 2)  $\beta$ -галактозидаза и лизоцим, иммобилизованные по отдельности и 3) соиммобилизованные на Сефарозе оба БАС.

Оказалось, что наибольшую устойчивость к бактериям проявляет третья система, что опять-таки демонстрирует преимущество совместно иммобилизованной системы как перед раздельно иммобилизованными БАС, так и перед системой, где "вспомогательное" БАС отсутствует.

Наиболее убедительно это показано для биореактора из соиммобилизованных (на сополи-

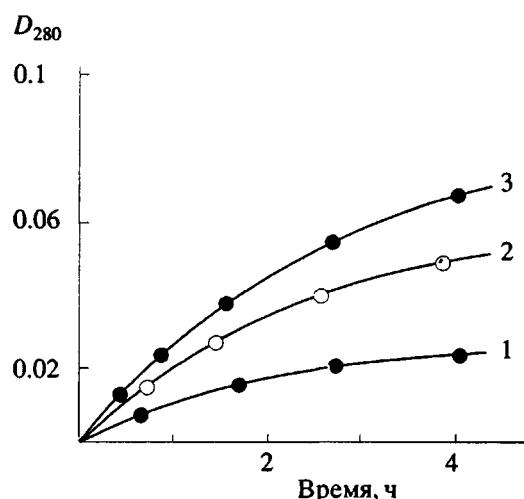


Рис. 5. Кинетика лизиса стабилизированного фибринна полимерами, модифицированными (мг/г полимера) гепарином (2.95) (1), трипсином (0.46) (2) и трипсином (0.46) + гепарином (3.15) (3).

мере акриламида и акриловой кислоты)  $\beta$ -амилазы и пуллланазы, превращающих растворенный крахмал в продукт с высоким содержанием мальтозы [33]. В данном случае это пример системы, в которой один фермент (пуллланаза) разрушает пространственную структуру макромолекулы крахмала, делая доступными боковые цепи, расположенные внутри макромолекулы, а другой ( $\beta$ -амилаза) катализирует отщепление боковых цепей. Таким образом, оба фермента способны проявлять активность по отдельности, т.е. имеют возможность действовать независимо. Однако будучи соиммобилизованными, один из них повышает реакционную способность другого. Так, если одна  $\beta$ -амилаза способна гидролизовать около 60% крахмала, то при включении в систему пуллланазы ( $\beta$ -амилаза : пуллланаза = 6.6 : 1) степень гидролиза крахмала приближается к 100%. Подчеркнем еще раз, что указанный биореактор является примером системы, в которой одно из соиммобилизованных БАС (пуллланаза) не

Таблица 2. Результаты исследования крови методом коагулограмм до (I) и после (II) ее контакта с модифицированным полимером

Содержание БАС в полимере, мг/г	Тolerантность плазмы к гепарину, с		Время рекальцифика- ции, с		Протромби- новый индекс, % от исходного	Активность фибринстабилизиру- ющего фактора, с		Концентрация фибриногена, мг/100 мл	
	I	II	I	II		I	II	I	II
Гепарин (1.9)	73	80	44	69	72	1550	840	250	200
Гепарин (1.9) + + трипсин (0.5)	73	93	44	91	90	1550	170	250	110
Гепарин (1.9) + + трипсин (1.6)	73	$\infty$	44	$\infty$	71	1550	Сгусток не образуется	250	40

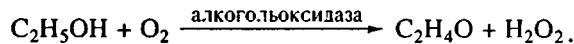
обеспечивает изначальную реакционноспособность другого ( $\beta$ -амилазы), а в значительной мере способствует повышению этой реакционноспособности вследствие создания наиболее благоприятных условий для е.о. работы.

Аналогичный подход был применен для решения задачи избирательного удаления из биологических жидкостей билирубина – токсичного продукта метаболизма гемоглобина.

Известно, что билирубин присутствует в крови в виде комплекса с альбумином (константа диссоциации таких комплексов равна  $10^{-8}$  -  $10^{-9}$  моль/л) [34], поэтому одно из решений проблемы удаления билирубина из крови заключается в перфузии крови через сорбент с иммобилизованным альбумином [35, 36]. Однако вследствие эквимолярного взаимодействия СА–билирубин и огромной разницы в молекулярных массах СА и билирубина емкость таких сорбентов чрезвычайно низка.

Качественно иной результат был получен в работах [37, 38] при использовании для этих целей системы, сочетающей в себе функцию сорбции билирубина с последующей трансформацией его в нетоксичное водорастворимое соединение.

Известно [37], что пероксидаза из хрена (ПХ) способна катализировать окисление комплексно связанного с СА билирубина кислородом или перекисью водорода, например, генерируемой в результате ферментативной реакции



Основываясь на известном механизме обеих реакций, включающем в себя образование промежуточного комплекса  $\text{O}_2(\text{H}_2\text{O}_2)$ –пероксидаза–альбумин–билирубин [37, 39] было предложено иммобилизовать в гидрогель тройную систему: СА (осуществляющего извлечение билирубина из смеси), алкогольоксидазу (АО) и пероксидазу

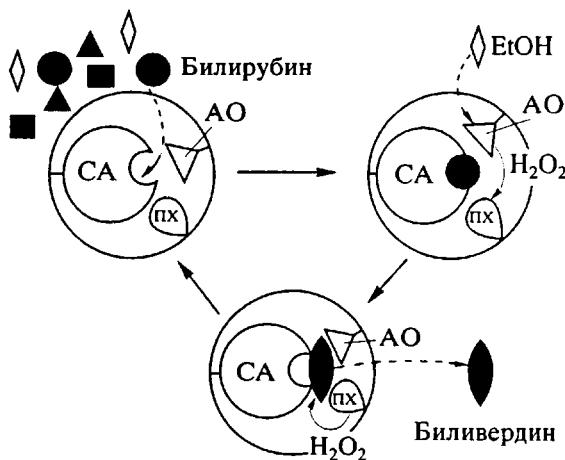


Рис. 6. Схема действия каталитической системы иммобилизованных в поликариламидном геле БАС для детоксикации билирубина.

(генерирующих окислитель и катализирующих окисление билирубина) [38].

Иммобилизацию БАС осуществляли сополимеризацией макромономеров СА, алкогольоксидазы и пероксидазы и образующихся в растворе ассоциатов этих макромономеров с акриламидом и N,N'-метилен-бис-акриламидом (табл. 3).

Как и следовало ожидать, активность гидрогелей с совместно иммобилизованными БАС оказалась выше активности смеси гидрогелей.

Определяющая роль предварительной ассоциации молекул БАС подтверждается результатами сравнительного изучения систем, полученных традиционным методом взаимодействия предварительно активированного полимера с БАС.

Была исследована иммобилизация указанной системы БАС на ПАН с использованием водорастворимого карбодиимида и на альдегидсодержащий полимерный носитель. Показано, что несмотря на сохранение активности иммобилизованных ферментов, эффективность полученных систем очень мала независимо от концентрации альбумина и ферментов.

Данные этих экспериментов дают основание полагать, что именно метод сополимеризации, в котором стадия образования полимерной матрицы происходит одновременно с иммобилизацией БАС, позволяет сохранить ассоциаты и, таким образом, обеспечить значительную эффективность полученного гидрогеля в окислении комплексно-связанного билирубина. Кинетика окисления комплекса СА–билирубин гидрогелем с соиммобилизованным БАС подчиняется уравнению Михаэлиса–Ментен с  $K_M = 16.0$  мкмоль. Равенство  $K_M$  в случае растворимой ( $K_M = 16.2$  мкмоль) и иммобилизованной пероксидазы указывает на то, что при данном размере частиц субстраты не испытывают диффузионных затруднений [40].

Механизм действия системы с совместно иммобилизованными БАС можно изобразить схемой, приведенной на рис. 6. СА сорбирует из раствора билирубин, концентрируя его в непосредственной близости от молекулы пероксидазы. Алкогольоксидаза генерирует перекись водорода, а пероксидаза катализирует окисление билирубина образующейся перекисью. Продуктом окисления является биливердин, который не образует устойчивых комплексов с альбумином и вымывается в раствор, освобождая место связывания на молекуле СА для новой молекулы билирубина.

Рассмотренный подход дает возможность, используя при иммобилизации относительно неспецифические БАС, получать катализитическую систему, с высокой избирательностью воздействующую на определенное вещество.

Более того, такая катализитическая система, полученная методом совместной одновременной полимеризации ассоциатов макромономеров

**Таблица 3. Составы гидрогелей с иммобилизованным альбумином, пероксидазой и алкогольоксидазой и их активность в окислении комплекса СА-билирубин**

Система	Компоненты гидрогеля	Концентрация белков в геле с × 10 <sup>6</sup> , моль/л	Доля окисленного комплекса за 1 ч, %
Смесь гидрогелей	ПХ	11.8	22
	АО	1.63	
	СА	320	
Гидрогель с совместно иммобилизованными БАС	ПХ	11.4	65
	АО	1.65	
	СА	312	

БАС в полимерной матрице, является оригинальной моделью полимерного гидрогелевого аффинного сорбента "бесконечной" емкости, сочетающего функции сорбции и катализа химической реакции. Сорбируемое вещество окисляется до водорастворимого и невзаимодействующего с иммобилизованным лигандом соединения и отделяется в раствор, освобождая лиганд для новой молекулы субстрата.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая изложенные экспериментальные результаты, можно сделать вывод о том, что использование многокомпонентных катализических систем на основе соиммобилизованных БАС позволяет по-новому взглянуть на свойства многих БАС и открывает новую страницу в биохимии, биотехнологии и медицине. В результате объединения в единое целое различных БАС могут возникать принципиально новые надмолекулярные образования, в которых эти БАС не только сохраняют свою индивидуальность, но и активно воздействуя друг на друга, взаимно трансформируют направленность биологического действия.

Применение многокомпонентных систем позволило решить несколько принципиальных задач современной медицины и биохимии, включая создание гемосовместимых полимерных материалов и биоспецифических гемосорбентов для удаления из крови токсичных веществ, а также варьирование биохимических характеристик иммобилизованных БАС и расширение спектра их физиологического действия.

Весьма перспективным представляется использование для получения таких систем сополимеризации с участием макромономеров БАС, поскольку этот подход основан на детально разработанном аппарате физической химии полимеров и с учетом известных закономерностей протекания реакций синтеза полимеров позволяет в мягких условиях осуществить иммобилизацию пред-

варительно сформированных в растворе надмолекулярных образований БАС различной химической природы.

Несомненно, что вся эта область химии находится только на самом начальном этапе своего развития. Однако достигнутые к настоящему времени успехи на пути создания материальных систем, сочетающих свойства синтетических полимеров и БАС и способных моделировать функции органов живого организма, позволяют говорить о перспективности этого научного направления и необходимости его дальнейшего развития.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Платэ Н.А., Валуев Л.И., Чупов В.В. // Высокомолек. соед. А. 1980. Т. 22. № 9. С. 1963.
2. Введение в прикладную энзимологию / Под ред. Березина И.В. М.: МГУ, 1982.
3. Martinek K., Mozhaev V.V. // Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 1985. V. 57. N. 2. P. 179.
4. Иммобилизованные ферменты / Под ред. Березина И.В. М.: МГУ, 1976. Т. 1.
5. Maeda H. Kemikaru Enjiniyaringu // 1987. V. 32. N. 5. P. 40.
6. Furukawa S.F., Katayama N., Iizuka T., Urabe J., Okada H. // FEBS Lett. 1980. V. 121. N. 4. P. 239.
7. Jamazaki J., Maeda H. // Agric. Biol. Chem. 1982. V. 46. N. 6. P. 1571.
8. Grunvald J., Chang T.M.S. // J. Appl. Biochem. 1979. V. 1. N. 1. P. 104.
9. Morikawa J., Karube J., Suzuki S. // Biochim. Biophys. Acta. 1978. V. 523. P. 263.
10. Sikita B. // Chem. Prum. 1988. V. 38. N. 8. P. 426.
11. Валуев Л.И., Платэ Н.А., Чупов В.В., Бурдыгина И.Ф. // Вопр. мед. химии. 1985. Т. 31. № 4. С. 43.
12. Моркевичене М., Дикьювене А., Паулоконис А., Казлаускас Д. // Прикл. биохим. микробиол. 1982. Т. 18. № 5. С. 688.
13. Bjorck L., Rosen C.G. // Biotechnol. Bioeng. 1976. V. 18. N. 9. P. 1463.
14. Mattiasson B., Mosbach K. // Biochem. Biophys. Acta. 1971. V. 235. N. 2. P. 253.
15. Messing A. // Biotechnol. Bioeng. 1974. V. 16. N. 7. P. 897.
16. Shimizu S.Y., Lenhoff H.M. // J. Solid-Phase Biochem. 1979. V. 4. N. 2. P. 75.
17. Shimizu S.Y., Lenhoff H.M. // J. Solid-Phase Biochem. 1979. V. 4. N. 2. P. 95.
18. Shimizu S.Y., Lenhoff H.M. // J. Solid-Phase Biochem. 1979. V. 4. N. 2. P. 109.
19. Koch-Schmidt A.C., Mattiasson B., Mosbach K. // Eur. J. Biochem. 1977. V. 81. N. 1. P. 71.
20. Krishna R., Ramachandran P.A. // J. Appl. Chem. Biotechnol. 1975. V. 25. N. 4. P. 625.
21. Hossian M.M., Do D.D. // Chem. Eng. Sci. 1987. V. 42. N. 2. P. 255.
22. Платэ Н.А., Валуев Л.И. // ЖВХО им. Д.И.Менделеева. 1985. Т. 30. № 4. С. 402.

22. Платэ Н.А., Валуев Л.И. // ЖВХО им. Д.И.Менделеева. 1985. Т. 30. № 4. С. 402.
23. Платэ Н.А., Валуев Л.И., Синани В.А., Чупов В.В. // Биотехнология. 1987. Т. 3. № 2. С. 173.
24. Plate N.A., Valuev L.I., Chupov V.V. // Pure. Appl. Chem. 1984. V. 56. N. 10. P. 1351.
25. Платэ Н.А., Валуев Л.И., Чупов В.В., Бурдыгина И.Ф. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 282. № 4. С. 1010.
26. Измайлова В.Н., Ребиндер П.А. // Структурообразование в белковых системах. М.: Наука, 1974.
27. Plate N.A., Valuev L.I. // Adv. Polym. Sci. 1986. V. 79. N. 1. P. 95.
28. Plate N.A., Valuev L.I. // Thromb. Res. 1982. V. 27. N. 1. P. 131.
29. Гаврилюк С.В., Чупов В.В. // Тез. докл. VIII Всесоюз. симп. "Синтетические полимеры медицинского назначения". Киев, 1989. С. 32.
30. Valuev L.I., Plate N.A. // Adv. Mater. 1990. V. 2. N. 9. P. 405.
31. Plate N.A., Valuev L.I., Chupov V.V. // Makromol. Chem., Macromol. Symp. 1986. V. 4. N. 1. P. 245.
32. Mattiasson B. // Edv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol. 1977. V. 19. N. 4. P. 777.
33. Martensson K. // Biotechnol. Bioeng. 1974. V. 16. N. 3. P. 579.
34. Jacobsen J. // FEBS Lett. 1969. V. 5. N. 2. P. 112.
35. Bouvier M., Brown G.R., St.-Pierre L.E. // Can. J. Chem. 1987. V. 65. N. 9. P. 1927.
36. Scharschmidt B.F., Martin J.F., Shapiro L.J., Plotz P.H., Berk P.O. // J. Lab. Clin. Med. 1977. V. 89. N. 1. P. 101.
37. Зефирова О.Н., Сытов Г.А., Постников В.А., Валуев Л.И., Платэ Н.А. // Прикл. биохим. микробиол. 1990. Т. 26. № 6. С. 761.
38. Zefirova O.N. // Int. School-Seminar "Modern Problems of Physical Chemistry of Macromolecules". Pushchino, 1991. P. 176.
39. Зефирова О.Н., Постников В.А., Сытов Г.А. // Тез. докл. VIII Всесоюз. науч. симп. "Синтетические полимеры медицинского назначения". Киев, 1989. С. 51.
40. Угарова Н.Н., Кершенгольц Б.М., Артамонов И.Д., Березин И.В. // Биохимия. 1976. Т. 41. № 9. С. 1662.

## Modification of Polymers with Biologically Active Compounds

N. A. Platé, L. I. Valuev, and O. N. Zefirova

*Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Russian Academy of Sciences,  
Leninskii Pr. 29, Moscow, 117912 Russia*

**Abstract** – The paper gives a survey of the methods, used for preparation of multicomponent catalytical systems, that involve conventional chemical modification of polymers by biologically active compounds or copolymerization of the corresponding macromonomers with hydrophilic monomers. Using the enzyme–cofactor system and mixtures of enzymes (protease–heparin, protease–hydrocarbon radical, serum albumin–oxyreductase, etc.) as examples we show that the occurrence of consecutive catalytical reactions is possible only when the arrangement of the immobilized compounds in the bulk of the polymer or at its surface is favorable. Polymer modification using copolymerization is shown to be the procedure that best conforms to this requirement. The prospects of using multicomponent systems to control enzyme specificity, create blood compatible polymeric materials, and enhance the efficaciousness/efficiency of biospecific sorbents are demonstrated.

Сдано в набор 29.03.93 г.

Офсетная печать Усл. печ. л. 22.0  
Тираж 1371 экз.

Подписано к печати 14.05.93 г.

Усл. кр.-отт. 306 тыс. Уч.-изд. л. 22.7  
Зак. 4223

Формат бумаги 60 × 88<sup>1/8</sup>

Бум. л. 11.0  
Цена 70 р. 00 к.

Отпечатано в Московской типографии № 2 ВО "Наука", 121099, Москва, Г-99, Шубинский пер., 6