

Профессор Н.Ф. Казанская об исследованиях в области инженерной энзимологии, проведенных под руководством И.В. Березина

ВЕСТН. МОСК. УН-ТА. СЕР. 2, ХИМИЯ. 1988. Т. 29. № 3  
УДК 577.15.02

## НАУЧНЫЕ ОСНОВЫ ПРИМЕНЕНИЯ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ\* (кафедра химической энзимологии)

*\* Статья публикуется в годовщину преждевременной кончины профессора Ильи Васильевича Березина (9.08.23—5.06.87), члена-корреспондента АН СССР, декана химического факультета МГУ (1969—1981 гг.), директора Института биохимии им. А. Н. Баха АН СССР (1981—1987 гг.), заведующего кафедрой химической энзимологии (1974—1987 гг.), лауреата Ленинской премии (1982 г.).*

Новая область науки — инженерная энзимология — получила интенсивное развитие. Эта область разделилась на несколько направлений, поскольку выявились многообразные возможности, которые биоорганические катализаторы, ферменты, могут дать для проведения химических превращений вне обычной сферы их деятельности, в химических реакторах. Основу для развития инженерной энзимологии как равноправной области науки создали фундаментальные исследования в области энзимологии и достижения в области выделения ферментов, а также в значительной степени учение о скоростях химических реакций. Выявление общности причин, обуславливающих уникальные свойства биокатализаторов: их специфичность и высокую каталитическую активность, а также взаимодействий, поддерживающих структуру молекул ферментов, явились предметом глубоких исследований, конечной целью которых была формулировка целого ряда научных и прикладных задач. Некоторые задачи, как будет показано ниже, решены в настоящее время, для других известны принципиальные пути решения, ряд задач пока только поставлены.

Цель статьи — познакомить с исследованиями в области инженерной энзимологии, проведенными под руководством члена-корреспондента АН СССР, профессора Ильи Васильевича Березина за двадцатилетний период 1966—1987 гг.

**I. Физико-химические механизмы ферментативного катализа.** Благодаря усилиям ряда научных школ в начале 70-х годов укрепилось представление, что ферментативные реакции при всей их сложности протекают в полном соответствии с общими закономерностями химических превращений. Действительно, общие принципы, управляющие реакциями с участием ферментов, нашли объяснение в рамках теории абсолютных скоростей реакций [1]. Такому утверждению предшествовала большая работа по изучению кинетики и механизма действия протеолитических ферментов (в основном трипсина и  $\alpha$ -химотрипсина) в реакциях гидролиза модельных соединений самой различной структуры. Был выявлен один из основных механизмов ускорения (на миллионы порядков) катализируемой реакции — сорбционное взаимодействие субстрат-фермент — и сформулировано правило, количественно определяющее взаимозависимость скорости ферментативного превращения субстрата с его адсорбционной способностью в районе активного центра фермента, предложенное ранее лишь в общей форме. Это правило указывает на существенное влияние химически инертных боковых фрагментов молекулы субстрата при взаимодействии с поверхностью белка [2]. На рис. 1 показано,

как изменяется стандартная свободная энергия (движущая сила химического превращения) по координате реакции при взаимодействии  $\alpha$ -химотрипсина с субстратами, эфирами фенилаланина и глицина. В случае фенилаланина скорость в 105 раз выше за счет "экстракции" углеводородного фрагмента субстрата R из воды в органическую "среду" белка. Эта экстракция дает выигрыш в значении  $\Delta G$ , равный около 7 ккал/моль. Заместители во фрагменте R могут в свою очередь стабилизировать переходное состояние или, напротив, ослаблять его. Для иллюстрации представлен рис. 2, на котором видно, насколько высок вклад гидрофобности этого фрагмента в константу скорости превращения субстрата. Обнаруженная взаимосвязь коэффициентов распределения некоторых соединений в системе н-октанол—вода (констант гидрофобности по Таншу) [3] и скоростей превращения субстратов на активных центрах ферментов получила предсказательную силу и послужила основанием для исследований других ферментов.

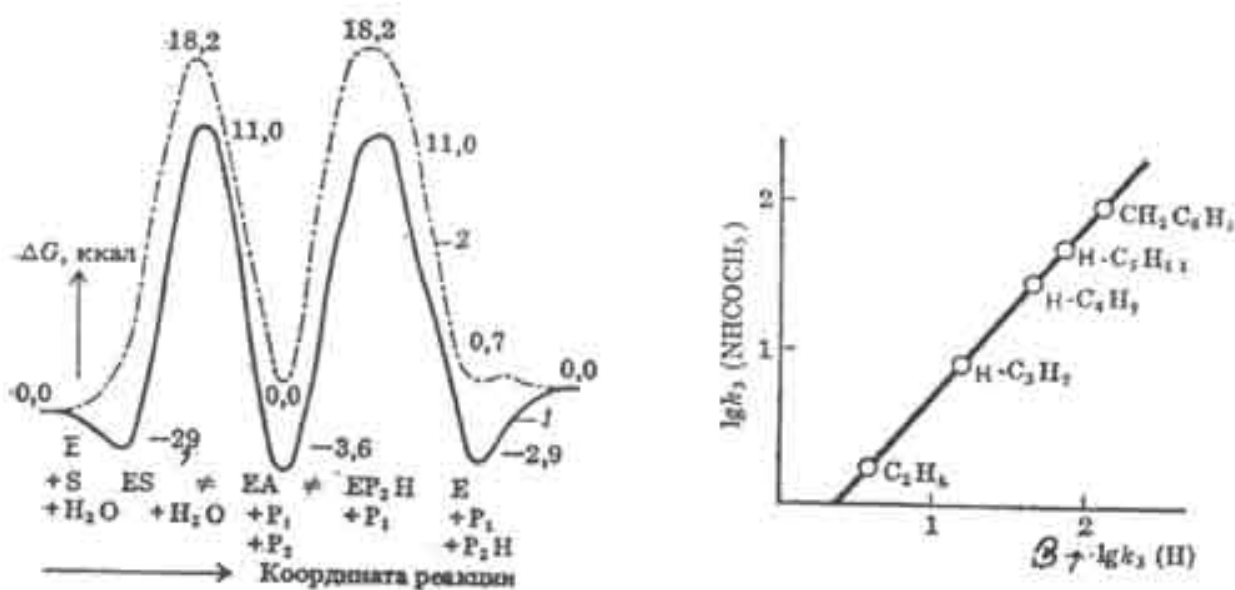


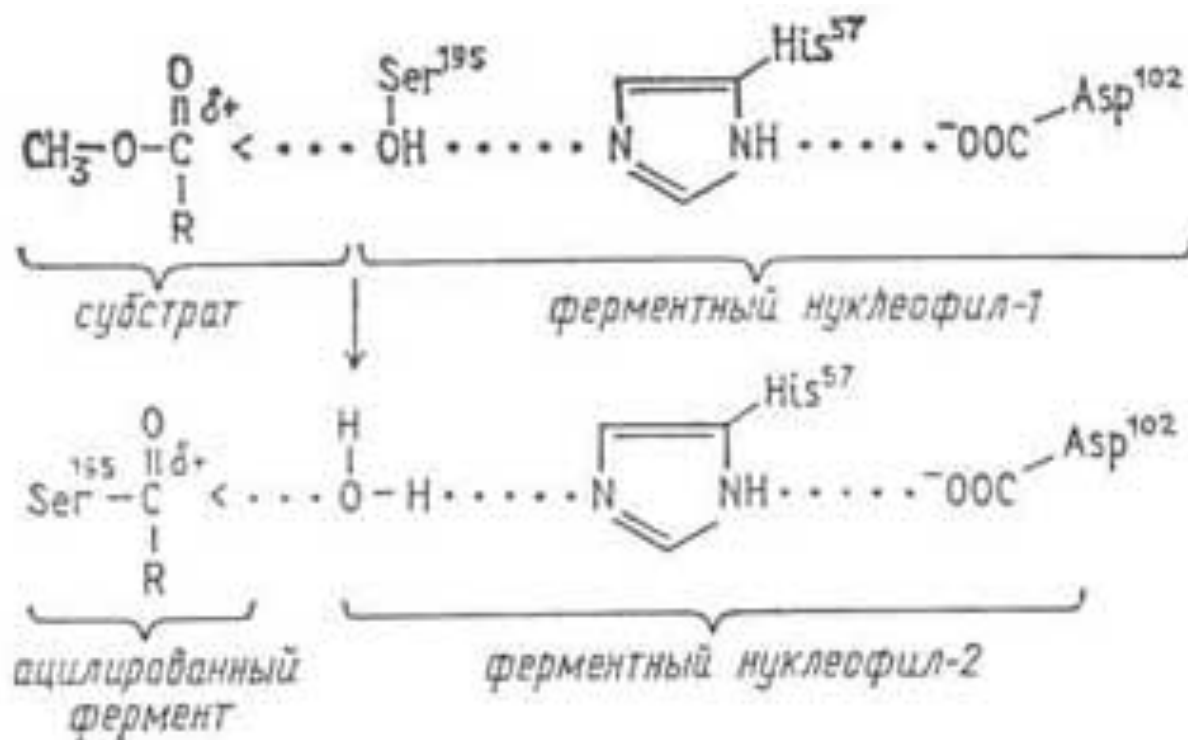
Рис. 1. Изменение стандартной свободной энергии фермент-субстратного взаимодействия по координате реакции при гидролизе в присутствии  $\alpha$ -химотрипсина метиловых эфиров N-ацетил-L-фенилаланина (1) и глицина (2) [2].

Рис. 2. Влияние N-ациламидной группы в остатке субстрата на скорость гидролиза ацилхимотрипсинов [2]

В дальнейшем было показано, что данный тип взаимодействия имеет место в огромном числе энзиматических систем, но конкретная картина может меняться при переходе к другим ферментам, в том числе металлозависимым, например карбоксипептидазам или аминоксилазам [4, 5]. С учетом трехточечного связывания субстратов в активном центре фермента правило "лучшее связывание—лучший катализ" позволило также количественно охарактеризовать энантиоселективность действия ферментов [6].

Другая важная особенность ферментативных реакций (их отличие от модельных гомогенно-каталитических бимолекулярных процессов), выявленная далее, заключается в возможности синхронного воздействия на субстрат со стороны компонентов (электрофильных и нуклеофильных групп) активного центра. Вклад от таких взаимодействий оценен на основании модели многоцентровой внутримолекулярной реакции, каковой, в сущности, и является переходное состояние ферментативного процесса. В активном центре  $\alpha$ -химотрипсина атакующим нуклеофилом является НО-группа аминокислоты Сер-195, включенная в систему водородных связей между субстратом, имидазолом аминокислоты Гис-57 и карбоксильной группой Асп-102. При

этом гидроксил! серина приобретает исключительно высокую нуклеофильность, превышающую при нейтральных значениях pH нуклеофильность иона  $\text{OH}^-$ . Образующийся после ацилирования эфирным или пептидным субстратом ацилфермент далее вступает в реакцию с молекулой воды, также располагающейся в активном центре. Вода освобождает гидроксил серина, возвращая фермент в исходное состояние. Ускорение реакции за счет сближения реагентов достигает  $10^7$  раз.



Наряду с исследованием протеиназ проводили работы по изучению других гидролитических ферментов—пенициллинаминогидролазы, карбоксилазы, а также окислительно-восстановительных ферментов—пероксидазы, гидрогеназ, дегидрогеназ, люциферазы. На многих примерах удалось выявить широкий набор факторов, определяющих активность и стабильность ферментов, обнаружить функциональные группы, существенные для ферментативного катализа, получить данные о химических характеристиках микросреды, конформационной подвижности и структуре активных центров ферментов [7—10]. В некоторых случаях был продемонстрирован аллостерический механизм регулирования каталитической активности ферментов [9, 10]. Серьезный приоритетный характер имели исследования о регуляторной роли липидов в построении активного центра люциферазы, мощного инструмента для использования в аналитических сенсорах [11].

Изложенный выше сравнительно простой подход к объяснению гигантских ускорений реакций ферментами связал сложные белковые системы с чисто химическим катализом, обогатив и химиков-катализиков новыми концепциями. В качестве примера приведем модель ферментативной реакции с помощью мицелл детергентов (мицеллярный катализ). Работы такого типа были начаты еще в 1969 г. Исходной посылкой была идея о моделировании ферментативного катализа поверхностью мицеллы, но вскоре были найдены новые каталитические мицеллярные системы, получившие известность как "псевдодвухфазная модель" мицеллярного катализа [12]. Основное уравнение этой модели, описывающее зависимость скорости реакции от концентрации поверхностно-

активного вещества, вошло в литературу как именное "уравнение Березина". Позднее были развиты мицеллярные аналоги коболамин-зависимых ферментов, рубредоксина. Вообще работы по химическому гомогенно-гетерогенному катализу всегда находились во внимании энзимологов, так, в частности, был выполнен большой цикл работ по "безрадикальному" окислению ненасыщенных углеводородов, развивалась общая теория внутримолекулярного катализа [13].

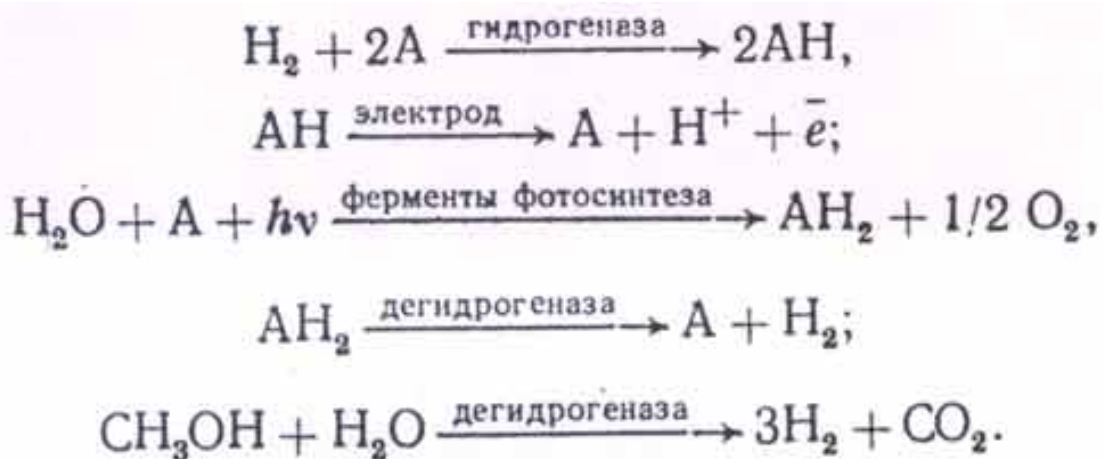
**II. Трансформация энергии ферментами.** Известное истощение топливных ресурсов (нефти, угля, газа) вызвало не только становление таких производств энергии, как атомная и термоядерная, но и усиление работы в области утилизации солнечной энергии, самой экологически "чистой", а также поставило вопрос о получении экологически допустимых энергоемких соединений.

Химические реакции в живой природе служат источником энергии, и, наоборот, энергия, подведенная к организмам, с помощью ферментов дает возможность осуществиться химическому превращению. Познание этих явлений дает надежду получить принципиально новые энергетические устройства, имеющие эффективность преобразования энергии, близкую к эффективности процессов в живых организмах. Использование биокаталитических систем как реальных источников энергии стало возможным после решения следующих проблем: изыскания ферментных систем, способных к такой трансформации; придания системам стабильности на основании выявленных экспериментально механизмов их инактивации [14, 15]; превращения биокатализаторов в формы, способные работать в технологических условиях. На этом пути было открыто явление биоэлектродкатализа—катализ ферментами электрохимических превращений. Явление биоэлектродкатализа дает возможность осуществить эффективный процесс вещество—поток электронов и наоборот [16]. В целях технологизации явления биоэлектродкатализа были специально разработаны полимерные полупроводниковые носители ферментов, способные проводить электрический ток [17]. Научным и идейным базисом всех исследований послужили законы химической кинетики, которые позволили определить границы ферментативного катализа как природного феномена и, следовательно, границы эффективности и производительности систем с участием ферментов [18].

К настоящему моменту можно назвать по крайней мере три безусловно работоспособных процесса. Это процесс биофотолиза воды микроорганизмами [19], процесс конверсии метанола и других спиртов в водород дегидрогеназами [20], а также уже реализующийся на технологическом уровне гидролиз целлюлозосодержащего сырья с помощью ферментов до низкомолекулярных веществ [21]. Последняя проблема с кинетической точки зрения казалась трудноразрешимой, поскольку исследователь имеет дело с нерастворимым субстратом, за скоростью расходования которого трудно следить а, кроме того, гидролиз проходит только с помощью набора ферментов, работающих на разных участках субстрата, которые имеют различную реакционную способность и т. п.

Очень важным аспектом направления, называемого ныне биоконверсией, является открывшаяся возможность разработки систем, работающих на принципах замкнутых биологических циклов, в которых технологические процессы используют вещества биологического происхождения. На этой основе можно получить источник энергии, например, для долговременной работы искусственного органа.

Ниже мы приводим примеры эффективных процессов, уже детально разработанных в лаборатории и ожидающих практической реализации:



**III. Стабилизация ферментов к внешним воздействиям.** Высокая каталитическая активность и специфичность действия любого фермента обусловлена уникальной структурой активного центра. Поэтому для проявления функций ферментов первостепенное значение имеет сохранение целостности активного центра и пространственной структуры белковой глобулы, которая обеспечивается взаимодействиями боковых групп полипептидной цепи. Для использования биокатализаторов в режимах промышленных производств было необходимо выяснить механизмы инактивации ферментов и найти пути стабилизировать молекулы белков.

В этом направлении был осуществлен большой объем фундаментальных исследований разных классов ферментов, а также клеток микроорганизмов, ферментные системы которых могли быть использованы в технологических режимах. Большой материал собран в ряде монографий [22, 23], вышедших в 1976 и 1983 гг. К этим вопросам неоднократно возвращались, поскольку практически каждый объект требует отдельного экспериментального обследования, и не всегда можно заранее предсказать способ сохранить каталитическую активность в выбранных условиях.

Наиболее разработанный прием стабилизации ферментов—иммобилизация—связывание фермента с полимерной матрицей. Перевод биокатализатора в твердую фазу или значительное увеличение молекулярного веса дают возможность легко отделить его от продуктов реакции и исходных соединений. Разные приемы иммобилизации основаны на знании механизмов инактивации белков, полученных на большом количестве примеров. Так, значительное влияние оказывают: а) микроокружение белковой глобулы в растворе и на носителе, б) число и природа групп, химически модифицированных в молекуле белка для усиления внутримолекулярных взаимодействий, в) химическая структура вводимых остатков. В данной статье нет необходимости далее подробно останавливаться на этом вопросе. Мы приводим два рисунка, которые хорошо иллюстрируют вышесказанное (рис. 3, 4).

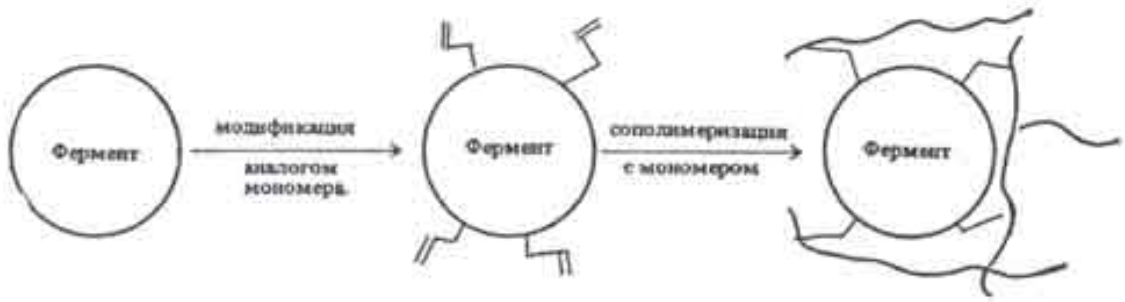


Рис. 3. Схематическое изображение иммобилизации фермента методом ковалентного "вшивания" его в полимерный гель [28]

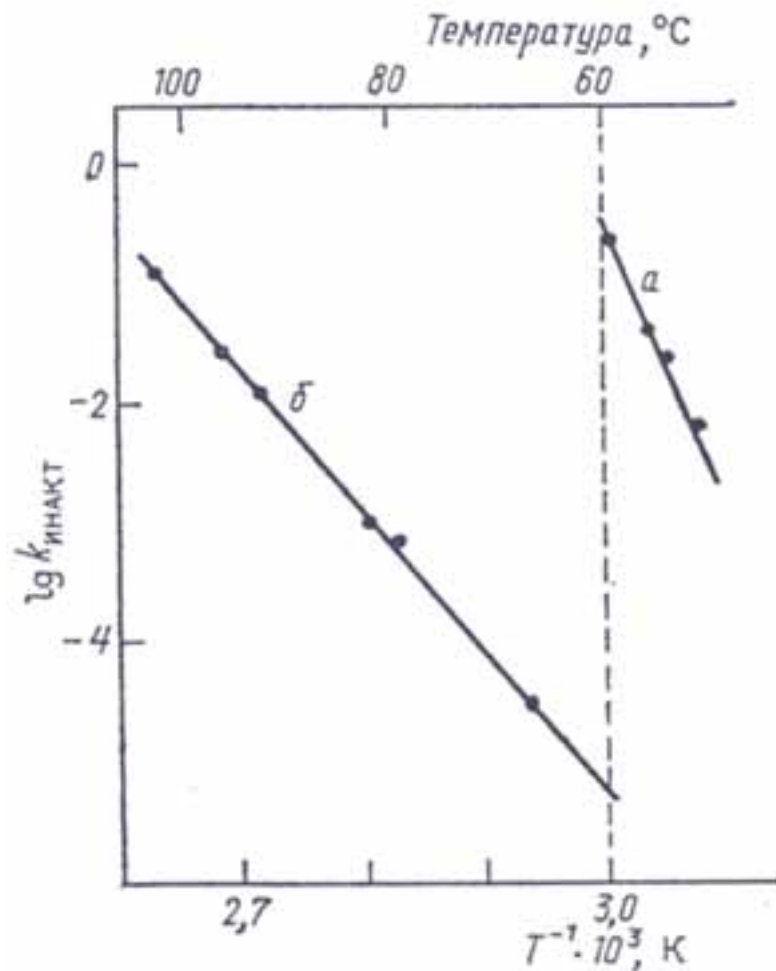


Рис. 4. Температурная зависимость константы скорости первого порядка для процесса термоинактивации  $\alpha$ -химотрипсина нативного (a) и иммобилизованного в полиакриламидный гель (б) [26]

Стабилизация ферментов против термической денатурации достигается в основном увеличением числа межцепочечных ковалентных связей в молекуле белка. Проблема состоит лишь в том, чтобы химическая реакция, приводящая к образованию дополнительных "мостиков", не приводила к исчезновению каталитической активности. Другой способ стабилизации разработан для предотвращения химической денатурации белков. Так высокая лабильность SH-ферментов ограничивает возможность их практического применения. Инактивация таких ферментов происходит за счет окисления

SH-групп кислородом воздуха, а также взаимодействия их с ионами тяжелых металлов. Добиться значительной стабилизации удалось, связав фермент с полимером, способным комплексовать ионы металлов, а также, частично окисляясь, снижать концентрацию кислорода у поверхности белка. На рис. 5 представлены данные по стабильности формиатдегидрогеназы, связанной с полимерами на основе 4-винилпиридина, алкилированного в различной степени, и схематическое изображение комплекса белок—полимер [24]. Известно, что формиатдегидрогеназа для осуществления каталитической активности требует присутствия кофактора никотинамиддинуклеотида (НАД), восстанавливающегося в акте катализа. НАД, связанный с полимером, продолжает участвовать в реакции, а наличие в этом же комплексе другого фермента—окислителя НАДН дает возможность иметь биокатализатор, не нуждающийся в непрерывной подаче в реактор дорогого кофактора [25].

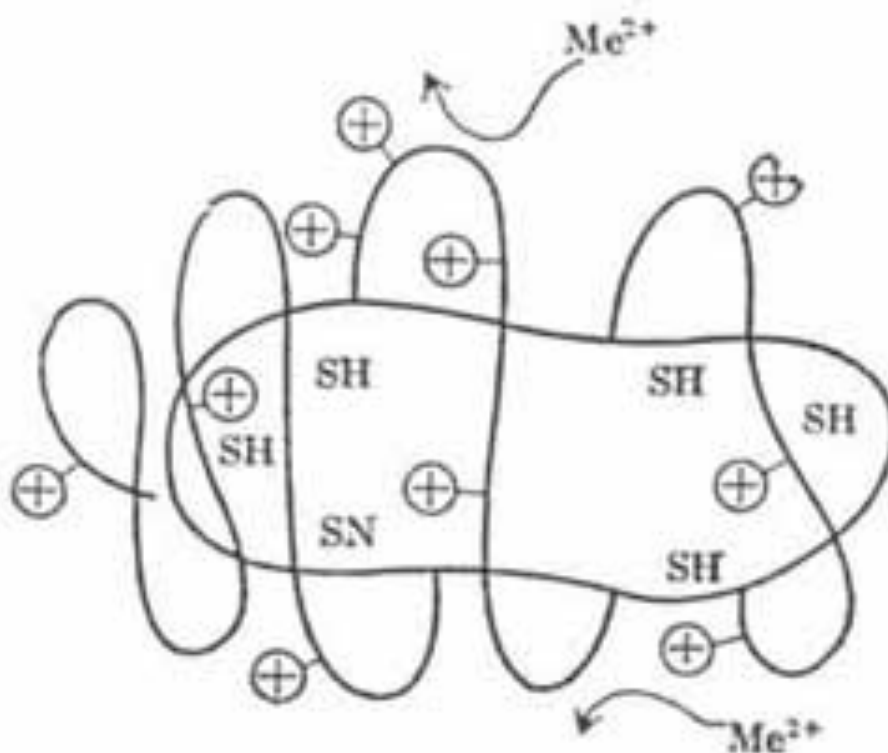


Рис. 5. Схематическое представление комплекса фермент—поликатион и механизма стабилизации формиатдегидрогеназы [24]

В дальнейшем глубокий физико-химический анализ взаимосвязи между структурой и стабильностью биокатализаторов дал возможность выявить наличие в молекулах белка "ключевых" групп, модификация которых позволяет достичь наиболее высоких эффектов стабилизации [27, 28].

Несколько более подробно следует описать способ стабилизации ферментов по отношению к денатурирующему действию органических растворителей, в которых проходит большинство химических синтетических процессов. Стабилизация в данном случае достигается путем включения ферментов с небольшим количеством воды (несколько сотен молекул воды на молекулу белка) в обращенные мицеллы [29]. При этом создаются условия, при которых фермент "работает" в водном окружении, а его

нерастворимые в воде субстраты и продукты локализованы в органической фазе. Данная система—фермент в обращенной мицелле—всесторонне изучена, в результате чего предложены приемы, дающие возможность использовать мицеллы в различных случаях.

Исследование процесса действия биокатализатора в мицелле привело к познанию интереснейших явлений, объясняющих работу ферментов в мембранно-связанном состоянии, получивших наименование "мицеллярная энзимология" [30]. В широком диапазоне экспериментальных условий (соотношение концентраций поверхностно-активного вещества и воды в органическом растворе) в одну исходную "пустую" мицеллу включается лишь одна молекула фермента. Фермент при этом приобретает оболочку, которая построена из гидратированных молекул ПАВ и защищает фермент от инактивации органическим растворителем. При этом во многих случаях оказалось, что ферменты в обращенных мицеллах в десятки и сотни раз более активны, чем в водном окружении. В сущности именно водное окружение является неродственной ферменту фазой, поскольку в природе они включены в мембраны (дифильные слои) и действуют, находясь в них. На рис. 6 представлена диаграмма состояний, связывающая каталитическую активность фермента с концентрацией компонентов в системе обращенных мицелл, из которой видно, что каталитическая активность лакказы, включенной в мицеллу, возрастает по крайней мере в 20 раз по сравнению с водным раствором.



Рис. 6. Изменение каталитической активности лакказы в обращенных мицеллах различного состава

Информация, полученная в исследованиях по мицеллярной энзимологии, представляет большой интерес с точки зрения фундаментальной науки для решения вопросов о структуре и активности биокаталитических ансамблей (фермент-липидная мембрана). С

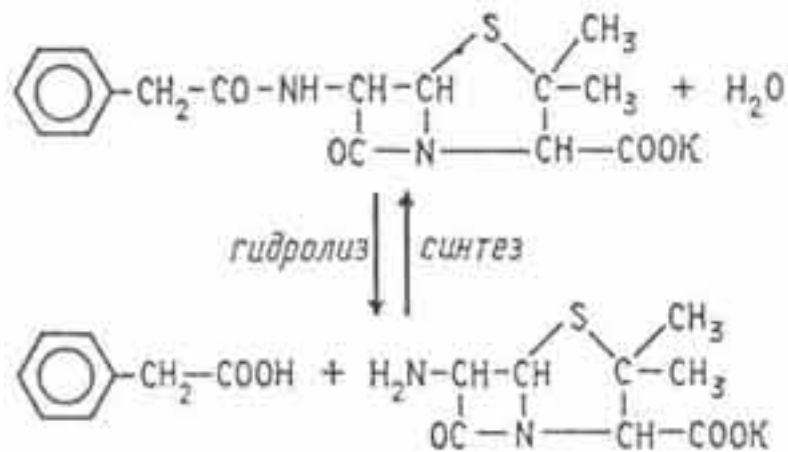


практической целью стабилизированные в обращенных мицеллах молекулы ферментов могут быть использованы в различных областях биотехнологии: органическом синтезе с помощью ферментов, создании высокочувствительных тестовых систем для анализа, получении носителей лекарств с новым механизмом действия.

**IV. Решение некоторых научно-практических задач.** Еще десять лет назад можно было считать, что использование биокатализаторов в промышленности будет сравнительно скромным. Но с развитием методов стабилизации ферментов стало возможным рассматривать их как высокотехнологические химические катализаторы, т. е. активные, специфичные и стабильные, а также легко отделяемые от реакционной смеси. В самом общем виде пути применения биокатализаторов в промышленности могут быть классифицированы следующим образом: синтез, аналитическое использование ферментов, индикация физических воздействий, лекарственные препараты.

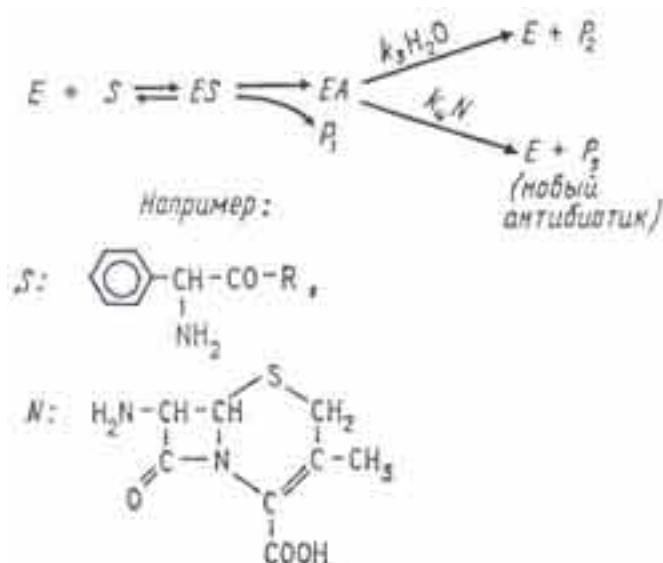
*1. Биокатализ в органическом синтезе.* Именно в этой области инженерной энзимологии у нас в стране и за рубежом были получены первые крупномасштабные достижения. В качестве биокатализаторов использовали как иммобилизованные ферменты, стабилизированные к внешним воздействиям, так и целые клетки. Последний способ применения ферментов в их природном окружении предоставляет ферменту еще один шанс сохранить каталитическую активность. А клетка, включенная в полимерное окружение, получающая реагенты для поддержания жизнеспособности, проводит специфичный для нее синтез.

Основные достоинства биокатализаторов: уникальная избирательность действия, возможность проводить процесс в "мягких" условиях, протекание реакций с высокой скоростью при использовании незначительных количеств катализатора—ярко проявились при получении ключевых полупродуктов синтеза новых "полусинтетических" β-лактамных антибиотиков -β-аминопенициллановой (6-АПК) и 7-аминодезацетоксицефалоспоровановой (7-АДЦК) кислот.



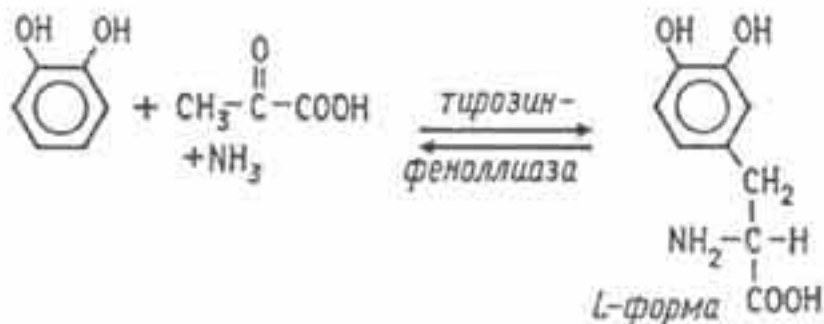
Два первых в СССР процесса инженерной энзимологии с использованием иммобилизованных ферментов для производства этих кислот внедрены в 1974 и в 1982 гг. на Рижском заводе медпрепаратов. Это стало возможным лишь после проведения детальных исследований кинетики и механизма действия пенициллинаминогидролазы—фермента, обеспечивающего расщепление более стабильной связи в молекуле пенициллинов и цефалоспоринов при сохранении ответственной за активность антибиотика связи в β-лактамном кольце соединения [31, 32].

Работы по изучению термодинамики реакций синтеза новых пенициллинов и цефалоспоринов позволили научно обосновать и создать биокаталитические методы получения новых  $\beta$ -лактамных антибиотиков как путем прямого синтеза, так и путем синтеза целевых соединений с переносом ацильной группы [33]:



Иммобилизованные клетки микроорганизмов, содержащие аспаратаммиаклиазу, тирозинфеноллиазу, фенилаланинаммиаклиазу, малаткарбоксилазу, фумаразу, представили хорошую возможность для проведения ферментативного синтеза аминокислот [34].

Важное значение для медицинской промышленности, например, представляет разработанный способ получения L-3,4-диоксифенилаланина (ДОФА) из пирокатехина и пирувата аммония под действием клеток с тирозинфеноллизной активностью [35]:



Дальнейшие перспективы развития биокатализа в области тонкого органического синтеза в значительной степени связаны с использованием последовательных ферментативных превращений, а это во многих случаях требует решения проблемы регенерации кофакторов ферментативной реакции, как это представлено схемой:



Подобное сопряжение в принципе может быть реализовано с помощью другой ферментной системы, так и подходящего химического или электрохимического процессов. В системах регенерации НАДН, может быть использована формиаатдегидрогеназа метилотрофных бактерий. Работы в этом направлении вылились в разработку непрерывного метода синтеза НАДН в колоночном реакторе. Метод настолько эффективен, что при объеме реактора в 100 мл можно получать 20 кг/год этого препарата, что обеспечило бы годовую потребность страны [36].

2. *Детекция физических воздействий.* Многообещающими оказались возможности применения ферментов в целях детекции энергетических воздействий (механических, звуковых, световых) и в химическом анализе, где требуется исключительная специфичность и чувствительность.

Основой большей части детектирующих систем с использованием ферментов служит их способность "усиливать" первичный сигнал путем инициирования реакции переработки некоторого субстрата фермента. Регистрация убыли этого субстрата или появления продукта ферментативной реакции, образовавшегося в течение определенного промежутка времени после воздействия при отсутствии фоновых превращений, делает такое усиление теоретически бесконечным:

$$Y = Xk_{кат}t,$$

где  $Y$ —эффект от действия усиливающей системы,  $X$ —первичный эффект,  $k_{кат}$ —константа скорости превращения субстрата,  $t$ — время его превращения.

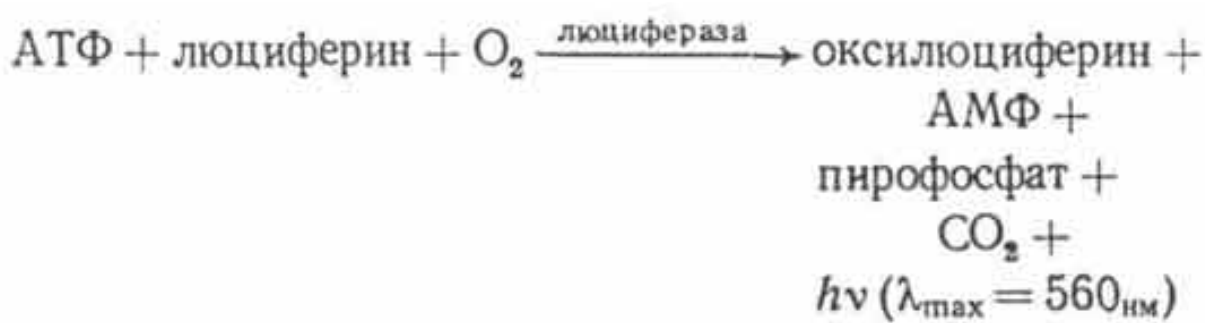
Эффект ферментативного усиления был использован для создания ряда детектирующих устройств и материалов. Так, была продемонстрирована возможность регистрации ультразвука [37], механических воздействий [38], а также использования этих воздействий для регуляции ферментативной активности в обратимом режиме. В сущности, устройства с механической регуляцией ферментативной активности являются функциональными моделями слуховой рецепции.

Светочувствительные ферментные системы исходно рассматривались как модели зрительной рецепции, но дальнейшая разработка привела к созданию бессеребряных фотографических материалов [39]. Для этих целей был предложен ряд способов инициирования светом ферментативной реакции, каждый из которых был положен в основу фотослоя. Первый пример—это инициирование светом цис-транс-изомеризации в ацилированном химотрипсине. При этом транс-изомер оказался значительно менее стабильным, и ферментативная активность в фотослое, возникшая на экспонированных участках, использовалась для визуализации изображения. Светочувствительность фотоматериалов в этом случае достигала  $10^3$  см<sup>2</sup>/Дж. Если светом инициировать активность фермента, способного к реакции активации своего природного предшественника, то активность возрастет экспоненциально, а следовательно, возрастет и светочувствительность. В таком варианте можно добиться чувствительности, близкой к

серебряным слоям [40]. Описанные выше системы требуют присутствия ферментной компоненты в слое. Можно избежать этого неудобства, из-за которого материал нужно хранить в строго контролируемых условиях, для чего предложено применить способ иммобилизации фермента под действием света, а также способы, в которых фермент присутствует только в проявляющем растворе. Визуализация изображения при всех вариантах достигается появлением цветного продукта реакции или исчезновением субстрата. Как светочувствительность, так и разрешение вполне достаточны для получения вторичных изображений [41].

3. *Химический анализ.* На принципе усиления сигнала с помощью ферментов основаны также высокоспецифичные и чувствительные способы анализа. Знание механизма действия многих ферментов, структуры активного центра, влияния на ферментативную активность различных ингибиторов и активаторов позволяет использовать для анализа большой круг ферментов. Обычно делается выбор в сторону более специфичных и высокоактивных ферментов. Приемы иммобилизации позволяют изготавливать биологические сенсоры, указывающие на присутствие тех или иных соединений, а также осуществлять их количественный анализ [42].

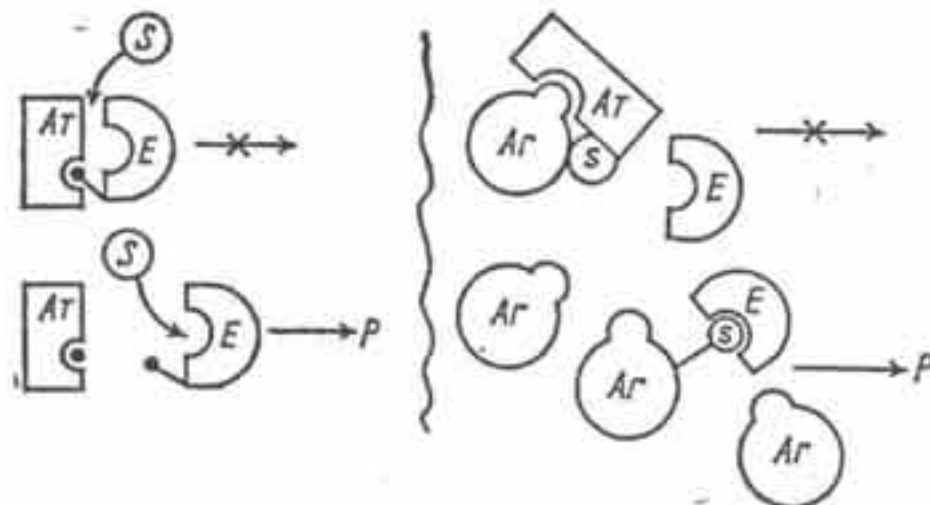
Всем этим условиям прекрасно удовлетворяет фермент люцифераза, кинетические свойства и структурные особенности которого были хорошо исследованы. Для использования этого фермента в качестве инструмента при анализе необходимо было разработать способ синтеза субстрата, который легко детектируется в небольших концентрациях, и метод иммобилизации люциферазы с сохранением ферментативной активности. Субстрат люциферазы—люциферин—при превращении образует квант света, что дает использовать высокочувствительную флюориметрическую технику.



Иммобилизацию люциферазы, фермента, подвергающегося инактивации по многим механизмам, удалось эффективно осуществить, воспользовавшись данными, полученными предварительно для других ферментов. В результате был разработан реагент для биолюминесцентного анализа аденозинтрифосфата, а следовательно, систем, работающих с участием этого соединения,—микробных клеток, АТФ-зависимых ферментов или субстратов, реагирующих в его присутствии [43]. Новым подходом явилось применение соиммобилизованных биолюминесцентных систем в микроанализе нуклеотидов, производных глюкозы и других диагностически важных метаболитов.

4. *Иммуноферментный анализ.* До последнего десятилетия иммунохимический анализ, основанный на специфическом взаимодействии антиген-антитело, ориентировался в основном на регистрацию радиоактивных меток, имеющих в антигене. В настоящее время регистрация проводится с помощью ферментной метки. И тут нужно отдать справедливость научному предвидению исследователей нашей лаборатории, твердо настаивавших на развитии этого направления анализа в нашей стране.

Меченные ферментом антигены или антитела взаимодействуют между собой конкурентно с немечеными, и по количеству появившейся ферментативной метки или убыванию ее в исследуемой фазе судят о концентрации искомого соединения.



Инженерная энзимология, предлагая в качестве меток ферменты, исходит из тех же соображений, что и в случае создания детектирующих систем—высокой степени усиления первичного воздействия. В качестве метчиков используют высокоактивные ферменты (пероксидазу, фосфатазу, люциферазу и др.). К продуктам каталитического превращения субстратов таких ферментов предъявляется требование простой и высокочувствительной регистрации.

Серьезной проблемой в иммуноферментных методах анализа является разработка способа введения ферментных меток, предусматривающих сохранение специфического взаимодействия антиген-антитело, а не только сохранения ферментативной активности. Проведенный большой цикл исследований позволил предложить целый ряд совершенно новых методов связывания фермента, особенно для определения низкомолекулярных антигенов, таких как инсулин, тироксин. Одним из них является иммунокофакторный анализ. В этом варианте в качестве метки использован не фермент, а его кофактор АТФ или НАД, концентрация которых в исследуемой жидкости регистрируется в присутствии фермента, находящегося в растворе [44].

Низкие концентрации анализируемых компонентов не могут обеспечить достаточно высокой скорости их взаимодействия в силу чисто инетических причин. Однако быстрота анализа—одно из основных требований, предъявляемых медициной и в других случаях, в которых используется иммуноферментный анализ. Для целей ускорения выдачи ответа предложен вариант метода—кинетический иммуноанализ [45]. Этот метод состоит в регистрации скорости изменения концентрации продукта ферментативной реакции, а не количества его, образовавшегося к моменту образования комплекса антиген-антитело. Разумеется, такой тип анализа требует введения некоторых расчетных приемов, но с интенсивным внедрением современной расчетной техники последнее не представляется неразрешимой проблемой.

5. *Ферменты как лекарственные средства.* Медицина давно знакома с применением ферментов как лекарственных средств. Это направление фармакологии развивалось недостаточно интенсивно по двум причинам—с трудностями получения удовлетворительного количества очищенных ферментов, а следовательно, их

дороговизны, а также нестабильностью ферментов в организме и быстрого их выведения. Обе проблемы решались почти одновременно, и сейчас с уверенностью можно утверждать, что ферменты и другие физиологически важные белки заняли надежное положение среди терапевтических средств.

Стабилизация и удерживание белкового препарата в организме; достигаются путем связывания с полимерной матрицей или заключения его в полимерные полупроницаемые или биodeградируемые оболочки. Так, первый в мире препарат пролонгированного действия, используемый для лизиса тромбов, представляет собой иммобилизованную на декстране стрептокиназу [46]. В данном случае сохранение активной структуры белка—совершенно исключительное требование, поскольку чужеродный белок может вводиться лишь в ограниченном количестве, чтобы исключить иммунный ответ организма. Выявлены полимеры, растворимые в физиологических жидкостях и не отторгаемые организмом, разработаны методы связывания белковых лекарственных препаратов с этими носителями, изучена аллергенность этих препаратов, скорость выведения и продемонстрирован физиологический эффект.

Модификация полимером белка значительно снижает его антигенные свойства, увеличивает его молекулярный вес, чем затрудняет выведение через почки. Модификация полимером, кроме того, позволяет ввести во вновь образовавшуюся структуру соединения, специфичные к рецепторам различных органов, т. е. привить белковому препарату свойство "тропности" к страдающему органу.

Обработка такого рода была предпринята в случае апротинина, белкового ингибитора протеиназ природного происхождения. Этот белок с молекулярным весом 6000 Да легко покидает организм через почки. Апротинин—мощный лекарственный препарат, используемый много лет для лечения страданий, связанных с увеличением протеолитической активности. Высокая скорость выведения апротинина делает лечение исключительно дорогим, что тормозит его применение. Связанный с карбоксиметилдекстраном апротинин сохраняет биологическую активность. Препарат, дополнительно модифицированный остатками галактозы, на которую печень имеет специфические рецепторы, в течение минут собирается в этом органе и может остановить там протеолиз. Полученный результат иллюстрирует рис. 7 [47].

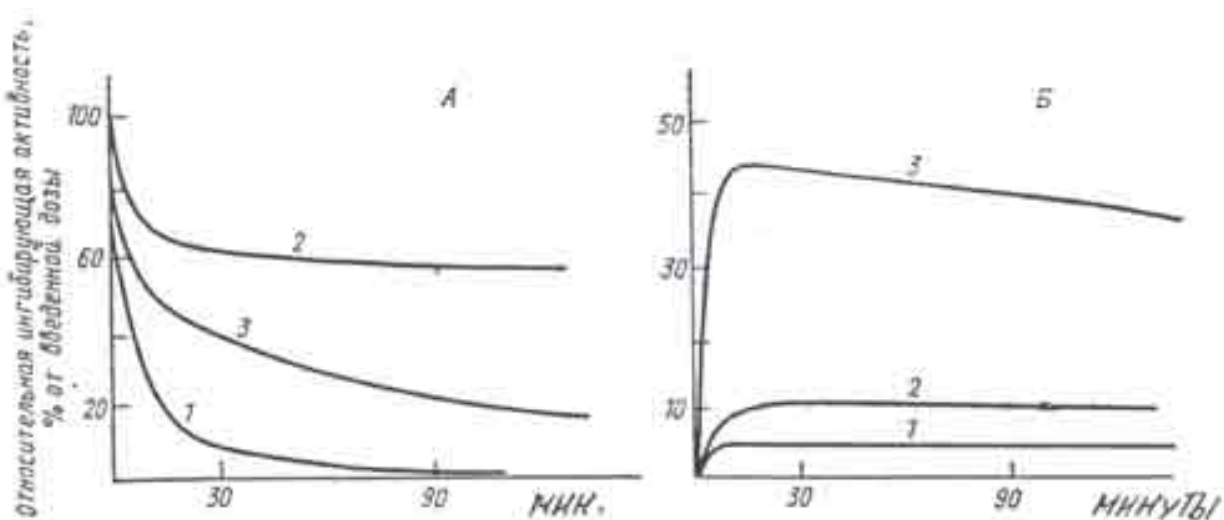


Рис. 7. Удерживание нативного апротинина (1) и апротинина, модифицированного КМ-декстраном (2) и КМ-декстраном и галактозой (3), в кровотоке (А) и в печени (Б) крыс [47]

Белковые лекарственные препараты, молекулярный вес которых; увеличен полимером, значительно дольше удерживаются в организме, не вызывают иммунного ответа организма, но наиболее хороших результатов следует ожидать, если белковый препарат будет полностью совместим с организмом человека. Такая проблема может быть решена генетической инженерией белков.

Обзор исследовательских работ, проводившихся под руководством Ильи Васильевича Березина, демонстрирует широту проблем, которые могут быть решены при использовании активных, стабильных и управляемых биологических катализаторов. Сейчас почти каждый из путей оформился в самостоятельное научное направление. Достигнуты определенные успехи. Но профессор Березин смотрел только вперед и не любил гордиться прошлым. В задачу его школы входит осуществить задуманное им и открыть новые возможности для приложения своих сил—это будет лучшей данью памяти Учителя.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Березин И.В., Мартинек К. // Ж. Всесоюз. хим. о-ва. им. Д. И. Менделеева. 1971. **16**. С. 411. [2] Березин И.В. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1974. № 15. С. 1073. [3] Березин И.В., Мартинек К. Основы физической химии ферментативного катализа. М., 1977. [4] Клесов А.А., Вэлли Б., Березин И.В. // ДАН СССР. 1977. **234**. С. 238. [5] Швядас В.К., Галаев И.Ю., Галстян Н.А., Березин И.В. // Биохимия. 1980. **45**. С. 1361. [6] Швядас В.К., Галаев И.Ю., Березин И.В. // Биохимия, 1986. **51**. С. 1490. [7] Савицкий А.П., Угарова Н.Н., Березин И.В. // Биоорг. химия. 1977. **3**. С. 1242. [8] Варфоломеев С.Д., Бачурин С.О., Тоай Ч.Д., Березин И.В. // Мол. биол. 1977. **11**. С. 423. [9] Egorov A.M., Tishkov V.I., Popov V.O., Verezin I.V. // Biochem. Biophys. Acta. 1981. **659**. P. 141. [10] Угарова Н.Н., Бровко Л.Ю., Беляева Е.И., Филиппова Н.Ю., Березин И.В. // ДАН СССР. 1981. **260**. С. 258. [11] Угарова Н.Н., Березин И.В. // ДАН СССР. 1986. **289**. С. 231. [12] Березин И.В., Мартинек К., Яцимирский А.К. // Усп. хим. 1974. **42**. С. 787. [13] Березин И.В., Яцимирский А.К. // ЖФХ. 1980. **54**. С. 1633. [14] Березин И.В., Варфоломеев С.Д., Зайцев С.Д. // ДАН СССР. 1976. **229**. С. 94. [15] Тоай Ч.Д., Варфоломеев С. Д., Гоготов И.Н., Березин И.В. // Мол. биол. 1976. **10**. С. 452. [16] "Биоэлектродкатализ". Открытие, внесенное в Государственный реестр СССР. № 311. Березин И.В., Богдановская В.А., Варфоломеев С.Д., Тарасевич М.Р., Ярополов А.И. [17] Варфоломеев С.Д., Бачурин С.О., Осипов И.В., Березин И.В. // ДАН СССР. 1978. **239**. С. 348. [18] Варфоломеев С.Д., Березин И.В. // Мол. биол. 1976. **10**. С. 818. [19] Березин И.В., Варфоломеев С.Д. // Гелиотехника. 1976. № 3. С. 60. [20] Егоров А.М., Платоненкова Л.С., Егорова О.А., Березин И.В. // Итоги науки и техники. Сер. Микробиология. Т. 9. М., 1978. С. 134. [21] Клесов А.А., Митькевич О.В., Сеницын А.П., Березин И.В. // ДАН СССР. 1984. **277**. С. 999. [22] Иммуобилизованные ферменты / Под ред. В.К. Антонова, И.В. Березина, К. Мартинек. Т. 1. М., 1976, 1978. [23] Введение в прикладную энзимологию / Под ред. И.В. Березина, К. Мартинек. М., 1987. [24] Диков М.М., Осипов А.П., Егоров А.М., Березин И.В., Мустафаев М.Н., Кириш Ю.Э., Кабанов В.А. // ДАН СССР. 1979. **248**. С. 1260. [25] Егоров А.М., Осипов А.П., Березин И.В. // Прикл. биохимия и микробиол. 1982. **18**. С. 515. [26] Мартинек К., Гольдмахер В.С., Клибанов А.М., Торчилин В.П., Смирнов В.Н., Чазов Е.И., Березин И.В. // ДАН СССР. 1976. **228**. С. 1468. [27] Кутузова Г.Д., Угарова Н.Н., Березин И.В. // Усп. хим. 1984. **53**. С. 1852. [28] Можаяев В.В., Мартинек К., Березин И.В. // Усп. хим. 1987. **56**. С. 1659. [29] Березин И.В., Мартинек К., Левашов А.В., Клячко Н.Л. // ДАН СССР. 1977. **236**. С. 290. [30] Martinek K., Levashov A.V., Klyachko N.L., Khmel'nitski Yu.L., Verezin I.V. // Eur. J. Biochem. 1986. **155**. P. 453. [31] Березин И.В., Клесов А.А., Швядас В.К., Ныс П.С., Савицкая Е.М. // Антибиотики. 1974. **19**. С. 880.

- [32] Швядас В.К., Клесов А.А., Ныс П.С., Савицкая Е. М., Березин И.В. // Антибиотики. 1976. **21**. С. 698. [33] Швядас В.К., Марголин А.Л., Березин И.В. // ДАН СССР. 1979. **249**. С. 479. [34] Фам Вам Нгуен, Яковлева В.И., Малофеев И.В., Варфоломеев С.Д., Березин И.В. // ДАН СССР. 1978. **241**. С. 342. [35] Березин И.В., Сафонов М.С., Пожарский С.Б., Зуева Н.Н., Яковлева В.И., Авсюк И.В. // ДАН СССР. 1982. **262**. С. 476. [36]. Егоров А.М., Осипов А.П., Березин И.В. // Прикл. биохимия и микробиол. 1982. **18**. С. 515. [37] Клибанов А.М., Мартинек К., Березин И.В. // Биохимия. 1974. **39**. С. 878. [38] Березин И.В., Клибанов А.М., Мартинек К. // Усп. хим. 1975. **44**. С. 17. [39] Березин И.В. // Бессеребряные фотографические процессы. Л., 1985. [40] Березин И.В., Айсина Р.Б., Казанская Н.Ф.// ДАН СССР. 1972. **207**. С. 1383. [41] Маненкова М.А., Казанская Н.Ф., Березин И.В. // Вестн. Моск. унта. Сер. 2, Химия. 1985. **26**. С. 592. [42] Березин И.В., Угарова Н.Н., Бровко Л.Ю., Лебедева О.В. // Вестн. АМН СССР. 1985. № 7. С. 88. [43] Бровко Л.Ю., Угарова Н.Н., Васильева Т.Е., Домбровский В.А., Березин И.В. // Биохимия. 1978. **43**. С. 798. [44] Митрохина Т.Г., Осипов А.П., Таврилова Е.М., Сорокина Н.В., Егоров А.М. // Прикл. биохимия и микробиол. 1983. **19**. С. 143. [45] Арефьев А.А., Осипов А.П., Егоров А.М. // Ж. микробиол., энзим. и иммунолог. 1987. № 9 С. 27. [46] Чазов Е.И., Смирнов В.Н., Мазаев А.В., Торчилин В.П. // Ж. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. 1985. **30**. С. 365. [47] Larionova N.I., Mityushina G.V., Kazanskaya N.F., Blidchenko Yu.A., Berezin I.V. // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1985. **366**. P. 743.

*Поступила в редакцию 21.12.87*