

Д. И. Заболотный, Т. Д. Савченко, Н. М. Ворошилова, С. В. Вережка

*Государственное учреждение “Институт отоларингологии
им. проф. А. И. Коломийченко НАМН Украины”, 03680 Киев*

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ IN VIVO

(обзор литературы и собственных исследований)

Иммобилизация ферментов на нерастворимых носителях обеспечивает общую стабилизацию белковой молекулы, продолжительное использование малых количеств дорогостоящих ферментов и чистоту продукта реакции. Поэтому иммобилизованные ферменты широко применяются в биотехнологии, фармацевтике, медицине и биохимических исследованиях. Иммобилизованные протеиназы широко применяются в медицине для очистки ран, расщепляя токсичные продукты некроза до усваиваемых здоровыми тканями низкомолекулярных пептидов. Рассматриваются ключевые подходы к применению иммобилизованных протеолитических ферментов, их достоинства и недостатки, обсуждаются пути преодоления последних. Обсуждается значение природного включения иммобилизованных протеиназ во внеклеточную полимерную субстанцию биопленок микроорганизмов, его роли в обеспечении преимуществ, превративших биопленки в доминирующую форму жизни.

Ключевые слова: детоксикация, иммобилизованные ферменты, протеолиз, биопленки.

Иммобилизация ферментов на нерастворимых носителях насчитывает более полувека и давно превратилась в рутинный метод, широко применяемый в биотехнологии, фармацевтике, медицине и биохимических исследованиях [9, 17, 24]. Многочисленные методы к иммобилизации белков могут быть разделены на три ключевые направления — физические, биоспецифические и химические. Физические методы, основанные на адсорбции, инкапсулировании, включении в гель или в липосомы. При этом взаимодействие фермента с субстратом может происходить как в иммобилизованном состоянии, так и вследствие пролонгированного выделения фермента в раствор. Биоспецифическая иммобилизация опосредована специфическими взаимодействиями растворенного фермента с иммобилизованными на носителе комплементарными лигандами. Наибольшее же распространение

получили методы химической иммобилизации, основанные на ковалентном связывании фермента с матрицей [19]. В качестве последней используются материалы, отличающиеся разветвленной трехмерной структурой, пригодные для проведения химической активации поверхностных групп и отвечающие целому ряду требований, выдвигаемых условиями использования полученного конъюгата [32].

Среди множества направлений применения иммобилизованных ферментов особое место занимают иммобилизованные протеиназы. Гарантированное исключение автолиза и загрязнения продуктов реакции ферментами составляет ключевое преимущество иммобилизованных протеиназ перед ферментами в растворе. Наибольшее распространение иммобилизованные протеиназы получили в медицине, главным образом — для рас-

Д. И. Заболотный — директор института, академик НАМН Украины
Т. Д. Савченко — с.н.с. отдела воспалительных заболеваний, к.м.н.

Лаборатория биохимии

С. В. Вережка — зав. лабораторией, д.б.н. (verevka.biochem@gmail.com)
Н. М. Ворошилова — с.н.с., к.б.н.

© Д. И. Заболотный, Т. Д. Савченко, Н. М. Ворошилова, С. В. Вережка, 2017.

щепления некротизированных тканей и предупреждения накопления эндотоксинов [1, 16]. Многообразие применяемых с этой целью методических подходов и препаратов, как зарубежных, так и отечественных, вошедших или по разным причинам не вошедших в клиническую практику, не поддается даже приблизительной оценке [25]. Однако рассмотрение и сравнение ключевых подходов не лишено познавательного и практического интереса.

Изначально для очистки и заживления раны применяли свободные протеиназы. Значительный вклад в эти работы осуществлен в нашем Институте под руководством К. Н. Веремеенко [2, 13]. Нанесение свободных ферментов *in vulnere* в форме растворов, смоченных растворами тампонов или даже присыпок сухого препарата сохраняет свое значение и по сей день. Оказывая некротическое и противовоспалительное действие, наносимые ферменты способствуют очищению раневой поверхности и росту грануляций. В основном для этих целей применяются трипсин, химотрипсин и их смесь — химопсин, получаемые из поджелудочной железы крупного рогатого скота. К их несомненным достоинствам относятся эффективность воздействия на некротизированные ткани и умеренные проявления побочных эффектов [3]. Возобновляемое присутствие в прилегающей здоровой ткани белковых ингибиторов крови ограничивает нежелательное воздействие свободных ферментов на здоровые ткани. В то же время одноразовое нанесение ферментов в количестве, достаточном для очистки раны, исключено из-за раздражающих, алергизирующих и токсических эффектов. Способность растворенных ферментов к автолизу и их денатурация при обсыхании существенно усложняют процедуру обработки раны. Требуются неоднократные перевязки, иногда — до двух раз в сутки, постоянное поддержание повязки в увлажненном состоянии. Все это ограничивает применение растворенных ферментов условиями больничного стационара [15]. В настоящее время выпускаются и применяются для обработки гнойных ран тканевые формы иммобилизованного на полотне трипсина [28]. Отрезы полотна перед накладыванием на рану обильно смачиваются дистиллированной водой или раствором фурацилина, с последующим поддержанием увлажнения. Однако трипсин, даже в иммобилизованной форме, подвержен инактивации белковыми ингибиторами, что снижает эффективность его применения и требует неоднократных перевязок. Кроме того, немаловажным недостатком трипсина является его способность активировать разнообразные проферменты и профакторы, что

не может не сказываться на нормальном функционировании прилегающих тканей.

Этих недостатков лишены комплексы протеолитических ферментов микробиального происхождения. Они отличаются высокой протеолитической активностью, не поддаются блокированию белковыми ингибиторами протеиназ и в силу широкой субстратной специфичности способны обеспечить глубокий протеолиз расщепляемых белков. Правда, последнее обстоятельство существенно ограничивает возможности нанесения подобных ферментов на рану в свободном состоянии, поскольку гарантирует повреждение тканей с последующим комплексом разнообразных осложнений. Немалые проблемы связаны и с образуемыми продуктами протеолиза. Так, к побочным эффектам применения препарата протеиназ, выделяемого из плесневого гриба *Aspergillus terricola* и применяемого под названием “Террилитин”, относятся аллергические реакции, субфебрилитет и повышение температуры. В свое время в нашем Институте проводилось изучение как самого препарата “Террилитин”, так и возможностей его применения в оториноларингологии. В полной мере подтвердились как достоинства, так и недостатки этого препарата [4, 14]. Вследствие продолжительного использования выявлен широкий спектр противопоказаний к применению препарата “Террилитин” — гиперчувствительность, ХСН, эмфизема легких с дыхательной недостаточностью, декомпенсированные формы туберкулеза легких, дистрофия печени, цирроз печени, инфекционный гепатит, панкреатит, геморрагический диатез. Схожие побочные эффекты — раздражение, жжение и боль в месте аппликации, аллергические реакции — вызывает фермент-содержащая мазь “Ируксол” на основе группы протеолитических ферментов из *Clostridium histolyticum*. Подобные эффекты могут быть объяснены неконтролируемым расщеплением здоровых тканей с образованием продуктов, инициирующих развитие разнообразных патофизиологических процессов [7, 10, 35]. В качестве примера стоит упомянуть последствия неполного расщепления такого, казалось бы, безобидного белка, как казеин. Образующиеся при его гидролизе пептиды обладают антитромботическим, антигипертензивным, антиоксидативным, опиеподобным и иммуномодулирующим действием [18, 26, 29, 30]. Поэтому для эффективной очистки некротизированных тканей необходимо возможно более полное расщепление растворенных белков без воздействия протеиназ на здоровую ткань. Как недостаточная, так и чрезмерная активность применяемых ферментов сопряжены с осложнениями, ограничи-

вающими применение препарата. То есть для эффективного расщепления токсических продуктов некроза тканей необходимо выполнения двух, казалось бы, взаимоисключающих условий. Необходимо возможно более глубокий протеолиз продуктов некроза без повреждения здоровых тканей [10]. Выполнение первого условия достижимо применением мультиферментных комплексов с широкой субстратной специфичностью. Выполнение же второго условия может быть обеспечено иммобилизацией протеиназ на нерастворимых носителях [6, 11]. Этим достигаются резкое увеличение стабильности фермента, исключение автолитических процессов, ограничение направленности действия растворенными в экссудате токсическими компонентами и полное исключение контакта ферментов со здоровой тканью. Поэтому иммобилизованные протеиназы достаточно широко используются в клинической практике. Помимо упоминавшихся трипсин-содержащих тканевых покрытий, известны иммобилизованные на мелкокристаллической целлюлозе препараты продуцируемого *Bacillus subtilis* протосубтилизина и трипсина крупного рогатого скота. Протосубтилизин, иммобилизованный на аминоэтилцеллюлозе, под названием "ПАЭЦ" или "Профезим" еще в 1979 году прошел испытания в клиниках Минздрава СССР и получил разрешение Фармкомитета на применение [8]. Показано, что "Профезим" сохраняет активность в условиях постоянного гидролиза субстрата на протяжении более чем пяти суток. Весьма схожим по действию и также получившим в том же году разрешение Фармкомитета Минздрава СССР является трипсин, иммобилизованный на карбоксиметил-целлюлозе ("Трипцеллим"). Показано, что в отличие от трипсина в растворе, подвергающегося автолизу в течение 1-2 часов, "Трипцеллим" также сохраняет активность в условиях постоянного гидролиза субстрата в течение 10 суток. В среднем "Трипцеллим" обеспечивает полное очищение некротизируемой ткани за 12 суток, "Профезим" — за 15 суток и трипсин растворенный — за 18 суток. Раздражающего воздействия на ткани не обнаружено. При лучевых язвах с наличием плотного струпа ни "Профезим", ни трипсин растворенный не оказывали какого-либо эффекта, тогда как "Трипцеллим" обеспечивал разжижение и постепенное очищение раневой поверхности. Препарат наносили на поверхность раны в виде суспензии в количестве 1 мл на 3-4 см² ежедневно. То есть препарат, в принципе способный работать в течение 5-10 суток, в условиях *in vulnere* требовал регулярного обновления. Скорее всего это обусловлено присутствием в экссудате раны специфичных в отношении трипсина

белковых ингибиторов. В нашем Институте изучались возможности применения препарата "Террилитин", иммобилизованного на декстране [5]. Во всех случаях применение подобных препаратов осложнялось необходимостью постоянного поддержания обводненности раны и нанесенного препарата, что требует многократных перевязок или сложного по выполнению дренирования повязки. Тем самым применение рассмотренных препаратов и их многочисленных, мало чем от них отличающихся, аналогов возможно только в условиях больничного стационара.

Как следует из приведенного материала, существующие методы очистки некротизированных ран от продуктов распада тканей в целом соответствуют поставленной задаче, однако всем им присущи те или иные недостатки, обусловленные как побочными эффектами, так и необходимостью регулярной обработки поверхности раны. Это побудило нас к поиску решения, максимально объединяющего достоинства существующих разработок и лишенного их недостатков. Качественное улучшение процедуры очистки и заживления раны могло быть достигнуто за счет одноразового наложения повязки без дополнительных процедур в течение всего курса, интенсификации расщепления продуктов некроза при отсутствии какого бы то ни было воздействия фермента на здоровые ткани, обеспечения гидратированности раны и иммобилизованного фермента на протяжении всего курса без осложняющих процедур.

Первое требование могло быть выполнено посредством применения иммобилизованного на нерастворимом носителе фермента в составе гидратированного полимерного геля [23]. В последние годы подобные гели приобретают все большее распространение в медицине и косметологии. В частности, полиэтиленгликоль (ПЭГ) — полимер с формулой $-O-[-CH_2-CH_2-O]_n-$ широко распространен как основа кремов и мазей, обладает слабым антисептическим действием, а также является пищевой добавкой (E1521). ПЭГ с молекулярной массой от 1500 Да и выше не способен проникать в клетки прилегающей ткани. Он обладает сильными осмотическими свойствами, то есть хорошо удерживает влагу. Мази на основе ПЭГ применяются при лечении ожоговых ран вследствие способности всасывать экссудат с последующей передачей белковых составляющих на наружные слои марли. Применение иммобилизованных ферментов в подобном геле способно обеспечить обводненность раны и на протяжении всего курса лечения. Интенсификация протеолитического расщепления продуктов некроза требует применения активного при физиологических значениях рН

ферментативного комплекса с возможно более широкой субстратной специфичностью и не подверженного инактивации присутствующими в кровообращении белковыми ингибиторами. С подобной точки зрения применение трипсина и трипсин-подобных ферментов [10] не является оптимальным, поскольку субстратная специфичность трипсина ограничена расщеплением белков по остаткам лизина и аргинина, а сам он подвержен блокированию ингибиторами системы гемостаза и, что существенно, активирует многочисленные проферменты и профакторы. Имобилизация фермента на нерастворимом носителе исключает побочные воздействия фермента на прилегающие ткани, что делает возможным использование полиферментных комплексов микробного происхождения. Разнообразная специфичность входящих в комплекс ферментов обеспечивает интенсификацию расщепления белка вплоть до аминокислот. К подобным комплексам относится препарат “Проназа”, являющийся смесью частично очищенных протеолитических ферментов из микробов *Streptomyces griseus*. “Проназа” содержит нейтральные и щелочные протеиназы, близкие по характеру действия химотрипсину и карбоксипептидазам. Благодаря широкой специфичности этот комплекс при pH 7-8 расщепляет в казеине и альбумине 80-85 % пептидных связей. Имобилизованная на углеродных волокнах композиция этого препарата в конце 80-х годов проходила испытания к качеству средства очистки ожоговых ран. Результаты были обнадеживающими, однако последующие события не позволили довести эту перспективную разработку до внедрения. Правда, выбор волокнистого углеродного носителя представляется далеким от идеала. Для обеспечения интенсивного расщепления продуктов некроза необходима высокая удельная поверхность носителя с иммобилизацией возможно большего количества протеиназ. В этом отношении показатели углеродных волокон достаточно скромные [31]. Много более перспективными представляются трехмерные макросетчатые полимеры, давно и успешно применяемые в разнообразных методах препаративной биохимии и биотехнологии [34]. Огромная (до десятков квадратных метров на мл) поверхность подобных носителей, регулируемая их проницаемость для белков разных размеров, отработанные методы иммобилизации белков — все это обеспечивает преимущества трехмерных макросетчатых полимеров перед любыми другими типами нерастворимых носителей иммобилизованных протеиназ. Однако много более существенным обстоятельством оказывается обеспечение подобными системами максимального расщепле-

ния белков до малых пептидов и отдельных аминокислот. Структура трехмерного носителя испещрена каналами, отличающимися между собой проницаемостью для молекул с разными молекулярными массами [22]. Поэтому значительная часть объема носителя изначально недоступна для неподвергшихся фрагментации достаточно крупных белков. В ходе протеолитического расщепления образуются меньшие по размеру фрагменты, способные проникать в области, для исходных молекул недоступные. Каждое расщепление ведет к уменьшению размеров фрагментов и возрастанию доступных для них содержащих иммобилизованные протеиназы участков трехмерной сети. При этом уменьшается вязкость системы, что способствует поступлению новых крупных молекул, рост же осмотического давления приводит к вытеснению малых молекул в доступные для них зоны, последующего их там расщепления и вывода в окружающую среду конечных продуктов. Каждая частица трехмерного макросетчатого носителя с иммобилизованными протеиназами превращается в своего рода реактор, непрерывно поглощающий крупные продукты некроза и выделяющий в окружающую среду безвредные низкомолекулярные пептиды и аминокислоты. При этом как поглощение крупных молекул, так и выделение низкомолекулярных продуктов расщепления идет по различным потокам, не конкурируя между собой. Аналогия с демоном Максвелла, чье 150-летие в этом году широко отмечается в научной среде, напрашивается сама собой.

Руководствуясь изложенными соображениями, в нашей лаборатории проведена работа по созданию композиции иммобилизованного на нерастворимой макросетчатой матрице широкоспецифичного комплекса протеолитических ферментов [6]. Протеолитический комплекс “Проназа” (*Pronase aus Streptomyces griseus (Lyophilisat) Boehringer Mannheim GmbH*) иммобилизовали на гранулированном полимерном макросетчатом носителе *Spheron 100 000 [LC]* (*Lachema*, Брно), применяемым в некоторых видах гель-фильтрационной хроматографии. Выбор данного носителя обусловлен его биологической инертностью, химической стойкостью и высокими механическими свойствами. Высокая активная поверхность — около 1 м²/мл обеспечивала связывание значительного количества протеиназ, после чего начальная проницаемость гранул (10⁵ кДа) неизбежно падала, оставаясь вполне достаточной для реализации рассмотренного механизма глубокого протеолиза. Огромный избыток иммобилизованного на носителе фермента находится внутри гранулы, недоступен для контакта со здоровой тканью, однако

способен быстро и эффективно гидролизовать растворенные в экссудате эндотоксины до низкомолекулярных пептидов и аминокислот. Размеры гранул (25–43 мкм) исключали неконтролируемое прохождение через биологические барьеры, а помещение иммобилизованной ферментативной композиции в 50 % раствор полиэтиленгликоля (*Polyethylene glycol 6000, Serva, США*) в 0.05 М натрий-фосфатном буфере pH 7,4 обеспечивал надлежащую обводненность иммобилизованных ферментов. Показана высокая протеолитическая активность в отношении белкового субстрата — денатурированного казеина, расщепляемого до малых, неосаждаемых трихлоруксусной кислотой, пептидов. Созданный композит по консистенции напоминает сметану, хорошо удерживается на поверхности и смывается водой. Стабилен при хранении при 2 °С, хотя нахождение иммобилизованного фермента в гидратированном окружении геля делает возможным хранение и при комнатной температуре. Ввиду высокой активности и эффективности осуществляемого гидролиза белков препарат может разбавляться гидрогелем до требуемого достаточного количества и с выбором желаемой консистенции. К принципиальным преимуществам созданной композиции относятся возможность одноразового нанесения препарата без каких-либо последующих обработок в течение курса, ограничение гидролитического действия иммобилизованного фермента исключительно растворимыми белковыми компонентами эндогенной интоксикации с образованием нетоксичных и неиммуногенных продуктов и отсутствие побочных эффектов, связанных с повреждением здоровой ткани и воздействием фермента на здоровые ткани.

Эффективность рассмотренной схемы иммобилизации ферментов в трехмерном макросетчатом носителе подтверждается ее широким распространением в живой природе. Артур Корнберг как-то заметил, что многоклеточные организмы, включая людей, являются редкими артефактами в мире, принадлежащем микроорганизмам. При этом, согласно различным оценкам, 95–99 % микроорганизмов обитают в состоянии биопленок — многоклеточных агрегатов, в котором клетки включены в продуцируемую ими внеклеточную полимерную субстанцию, обеспечивающую слипание клеток друг с другом и с подходящей поверхностью [12]. В составе биопленки могут присутствовать микроорганизмы разных видов, более или менее успешно формирующие симбиотические сообщества на самых разнообразных поверхностях раздела фаз, обычно — в потоке, обеспечивающем поступление достаточного количества продуктов

питания. Ключевым условием формирования биопленок является воздействие некоторого неблагоприятного фактора [20]. При его отсутствии микроорганизмы переходят к свободной — планктонной — форме существования. Для формирования биопленки необходима пластичность фенотипа — способность образующих ее микроорганизмов к дифференциации, обеспечивающей соответствие локальным условиям обитания. Основную часть массы биопленок составляет внеклеточная полимерная субстанция (ВПС) — высокогидратированная (до 97 %) полимерная композиция, по преимуществу сформированная полисахаридами, липополисахаридами и гликопротеинами [21]. По мере созревания в биопленке усугубляется дифференциация клеток, внутренние слои переходят к анаэробному обмену веществ, формируются каналы питания, меняется состав потребляемых продуктов и секретируемых в окружающую среду веществ. При этом, благодаря связывающим свойствам структурных компонентов биопленки, некоторые из этих веществ фиксируются в составе ВПС. Поэтому секретируемые микроорганизмами протео- и липо- и нуклеолитические ферменты, накапливаются в ВПС в концентрациях, недостижимых для планктонных форм. Подобные включения наделяют ВПС функциями коммунальной внеклеточной пищеварительной системы и интенсифицируют в биопленке процессы обмена веществ [20]. Иммобилизация в составе ВПС значительных количеств литических ферментов существенно расширяет ресурсное обеспечение микроорганизмов, переводит в приемлемую для питания форму продукты распада отмирающих клеток и разнообразные токсические веществ [27]. Все это способствует выживанию сообществ микроорганизмов в неблагоприятной среде, драматически повышает их сопротивляемость разнообразным неблагоприятным факторам. Львиную долю в реализацию отмеченных преимуществ вносит внеклеточная полимерная субстанция, являющаяся примером спонтанно, но закономерно сформированного и эффективно функционирующего в составе трехмерной макросетчатой матрицы комплекса иммобилизованных литических ферментов. С другой стороны, доминирование биопленок в живой природе является ярким, хоть и несколько неожиданным, подтверждением высокой эффективности подобных комплексов.

Как следует из приведенных материалов, оптимальный подход для очистки ран от токсических продуктов некроза состоит в глубоком протеолизе растворимых продуктов распада тканей без воздействия ферментов на здоровые ткани. Предложенный подход реализован посредством иммобилизации широкоспецифичного микробиального

протеолитического комплекса на макросетчатом трехмерном полимерном носителе. Необходимая обводненность раны обеспечивается применением композиции иммобилизованных ферментов в со-

ставе гидратированного полимерного геля. Примененный подход является аналогом внеклеточного полимерного вещества доминирующей формы жизни — биопленок.

Список использованной литературы

1. *Богущи Л. К., Шварцман Л. Я.* Применение протеолитических ферментов при туберкулезе легких. — М.: Медицина, 1970. — 128 с.
2. *Веремеенко К. Н.* Лечебные свойства протеолитических ферментов и их применение в клинике. — В кн. Ферменты протеолиза и их ингибиторы в медицинской практике. — К.: Здоров'я, 1971. — С. 36-70.
3. *Веремеенко К. Н., Голобородько О. П., Кизим А. И.* Протеиназы, их активаторы и ингибиторы в патогенезе и лечении некоторых заболеваний. — В кн.: Протеолиз в норме и при патологии. — К.: Здоров'я, 1988. — С. 128-162.
4. *Веремеенко К. Н., Опанащенко Г. А., Карпенко Г. Ф.* Применение террилитина в сочетании с лизоцимом для лечения послеоперационных ран у больных с раком гортани // Вестник отоларингологии. — 1985. — № 6. — С. 65-69.
5. *Веремеенко К. Н., Покотиленко А. К., Карпенко Г. Ф.* Экспериментальное обоснование применения иммобилизованного фермента террилидона в комплексной терапии гнойного среднего отита // Журн. ушных, носовых и горловых болезней. — 1985. — № 6. — С. 15-20.
6. *Верьовка С. В.* Композиція для загоєння ран // Патент на корисну модель № 105500 від 25.03.2016, Бюл. № 6 від 25.03.2016.
7. *Заболотний Д. І., Кизим О. Й., Верьовка С. В.* Патологічні ефекти інтоксикації клітинних мембран ендогенними пептидами (огляд літератури і власних досліджень) // Журн. НАМН України. — 2011. — 17, № 3. — С. 201-207.
8. *Иммобилизованные протеолитические ферменты в лечении гнойно-некротических процессов.* — Новосибирск, 1981. — 140 с.
9. *Иммобилизованные ферменты.* — М.: Изд-во МГУ, 1976. — Т. 1, 2.
10. *Коган А., Соколов Б., Мингареев А.* Токсичность раневого отделяемого в условиях пролонгированного протеолиза иммобилизованными ферментами // Хирургия. — 1998. — № 4. — С. 41-44.
11. *Макаров К. А., Кибардин С. А.* Иммобилизованные ферменты в медицинской практике. — М.: Медицина, 1980. — 128 с.
12. *Николаев Ю. А., Плакунов В. Л.* Биопленка — “город микробов” или аналог многоклеточного организма? // Микробиология. — 2007. — 76, № 2. — С. 149-163.
13. *Применение ферментов и их ингибиторов с лечебной целью.* — В кн.: Ферменты в отоларингологии. — К.: Здоров'я, 1980. — С. 139-146.
14. *Райко И. Е.* Исследование биохимических и лечебных свойств нативного и иммобилизованного террилитина: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Киев, 1989. — 29 с.
15. *Романовская И. И.* Потенциальное раневое покрытие с трипсином, иммобилизованным в модифицированный поли-N-винилпирролидон // Доповіді НАН України. — 2009. — № 9. — С. 182-186.
16. *Стручков В. И., Григорян А. В.* Протеолитические ферменты в гнойной хирургии. — М.: Медицина, 1970. — 408 с.
17. *Тривен М.* Применение иммобилизованных ферментов. — В кн.: Иммобилизованные ферменты. — М.: Мир, 1983. — С. 89-164.
18. *Exposito L., Recio I.* Antibacterial activity of peptides and folding variants from milk proteins // Intern Diaty J. — 2006. — 16. — P. 1294-1305.
19. *Fernandez-Lapuente R.* Special Issue: Enzyme Immobilization 2016 // Molecules. — 2017. — 22, № 4. — P. 601.
20. *Flemming H., Wingender J., Szewzyk U. et al.* Biofilms: an emergent form of bacterial life // Nat. Rev. Microbiol. — 2016. — 14. — P. 563-575.
21. *Flemming H.* EPS — then and now // Microorganisms. — 2016. — 4, № 4. — P. 437-444.
22. *Gimmon-Kinsel M., Jimenez V., Washmon L., Balkus K.* Mesoporous molecular sieve immobilized enzymes // Studies in Surface Science and Catalysis. Vol. 117. Mesoporous molecular sieves. — Elsevier Science AB, 1998. — P. 373-412.
23. *Grimaldi J., Radhakrishna M., Kumar S., Belfort G.* Stability of proteins on hydrophilic surfaces // Langmuir. — 2015. — 31, № 3. — P. 1005-1010.
24. *Homael A., Sariri R., Vianello F., Stevanato R.* Enzyme immobilization: an update // J. Chem. Biol. — 2013. — 6, № 4. — P. 185-205.
25. *Liang J., Li Y., Yang V.* Biomedical application of immobilized enzymes // J. Pharm. Sci. — 2000. — 89, № 8. — P. 979-990.
26. *Lopez-Exposito I., Gomez-Ruiz J., Amigo L., Recio I.* Identification of antibacterial peptides from ovine α_2 -casein // Intern Diaty J. — 2006. — 16. — P. 1072-1080.
27. *Lopez D., Vlamakis H., Kolter R.* Canibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis* // Mol. Microbiol. 2009. — 74, № 3. — P. 609-618.
28. *Marques D., Pessela B., Betancor L. et al.* Protein hydrolysis by immobilized and stabilized trypsin // Biotechnol. Prog. — 2011. — 27, № 3. — P. 677-683.
29. *Pan Y., Lee A., Wan J. et al.* Antiviral properties of milk proteins and peptides // Intern. Diaty J. — 2005. — 21. — P. 1252-1261.
30. *Pihlanto A.* Antioxidative peptides derived from milk proteins // Intern. Diaty J. — 2006. — 16. — P. 1306-1314.
31. *Raghupathi K., Thayumanvan S.* Nano-arming enzymes: rational design of polymer-wrapped enzymes // Meth. Enzymol. — 2017. — 590. — P. 381-441.
32. *Sirisha V., Janin A., Janin A.* Enzyme Immobilization: An Overview on methods, support materials, and applications

- of immobilized enzymes // *Adv. Food Nutr. Res.* — 2016. — 79. — P. 179-211.
33. *Silva S., Malcata F. X.* Caseins as a source of bioactive peptides // *Intern Diaty J.* — 2005. — 15. — P. 1-15.
34. *Turkova J.* Bioaffinity chromatography. — Amsterdam — London — New York — Tokyo: Elsevier, 1993. — 796 p.
35. *Zabolotnyi D. I., Gogunskaya I. V., Zabolotnaya D. D.* et al. Suicide antigens: induced denaturation of proteins in the development of allergic reactions / in: *Advances in Medicine and Biology.* — NY: Nova Sci. Publ., 2012. — 53. — P. 217-232.

Получено 4.11.2017

ИММОБІЛІЗОВАНИ ПРОТЕОЛІТИЧНІ ФЕРМЕНТИ *IN VIVO* (огляд літератури та власних досліджень)

Д. І. Заболотний, Т. Д. Савченко, Н. М. Ворошилова, С. В. Верьовка

Державна установа “Інститут отоларингології ім. проф. О. С. Коломийченка НАМН України”,
03680 Київ

Імобілізація ферментів на нерозчинних носіях забезпечує загальну стабілізацію білкової молекули, тривале використання малих кількостей дорогих ферментів та чистоту продукту реакції. Тому іммобілізовані ферменти широко застосовуються в біотехнології, фармацевтиці, медицині та біохімічних дослідженнях. Імобілізовані протеїнази широко застосовуються в медицині для очистки ран, розщеплюючи токсичні продукти некрозу до низькомолекулярних пептидів, що засвоюються здоровими тканинами. Розглядаються ключові підходи до застосування іммобілізованих протеолітичних ферментів, їх переваги та недоліки, пропонуються підходи до подолання останніх. Обговорюється значення природного включення іммобілізованих протеїназ до позаклітинної полімерної субстанції біоплівки мікроорганізмів, його ролі в забезпеченні переваг, що перетворили біоплівки на домінуючу форму життя.

IMMOBILIZED PROTEOLYTIC ENZYMES *IN VIVO* (review of literature and own data)

D. I. Zabolotnyi, T. D. Savchenko, N. M. Voroshylova, S. V. Verevka

State institution “A. I. Kolomijchenko Institute of Otolaryngology NAMS Ukraine”, 03680 Kyiv

Immobilization of enzymes on insoluble carriers provide for a general stabilization of the protein molecule, the continued use of small amounts of expensive enzymes, and the purity of the reaction product. Therefore immobilized enzymes are widely used in biotechnology, pharmaceuticals, medicine and biochemical research. Immobilized proteinases are used widely in medicine for detoxification of wounds by splitting of the toxic products of necrosis to low-molecular peptides, which are assimilated by healthy tissues. The key approaches for the use of immobilized proteolytic enzymes, their advantages and disadvantages are considered. The complex way for overcoming of the latter is proposed. The similarity of this way to the case of the natural inclusion of immobilized hydrolases in the biofilms' extracellular polymer substance, as well as survival advantages of such inclusion are discussed.