Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Сибирский федеральный университет»

На правах рукописи

Сутормин Олег Сергеевич

БИ- И ТРИФЕРМЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ, СОПРЯЖЕННЫЕ С БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЛЮЦИФЕРАЗОЙ, В ВЯЗКОМ МИКРООКРУЖЕНИИ: БИОФИЗИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ПРИМЕНЕНИЕ

Специальность 03.01.02 – биофизика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор
Кратасюк Валентина Александровна

Красноярск – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 6
ГЛАВА 1. Обзор литературы.. 12
1.1. Сравнение реакционной среды, окружающей ферменты, в условиях классических буферных растворов *(in vitro*) и внутриклеточного окружения (*in vivo*)... 12
1.2. Влияние химических агентов, моделирующих внутриклеточные условия, на кинетические и термодинамические характеристики ферментов 16
1.3. Эффекты вязкости среды в ферментативных процессах.............................. 21
1.3.1. Структурное происхождение чувствительности ферментативных реакций к вязкости... 23
1.3.2. Физическая основа внутреннего трения.. 27
1.3.3.Экспериментальные подходы измерения внутренней вязкости ферментативных реакции... 30
1.4. Молекулярные эффекты и механизмы воздействия природных осмолитов на белковые глобулы 31
1.5. Кооперативные эффекты в ферментативных реакциях................................ 34
1.5.1. Классификация и количественная оценка кооперативности 36
1.6. Индивидуальные характеристики моноферментных реакций, входящих в состав биферментной и триферментной систем, и их каталитическая активность в вязких средах 37
1.6.1.Характеристика сопряженной биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза 37
1.6.2. Влияние осмолитов и краудинг-агентов на кинетические характеристики бактериальной люциферазы 41
1.6.3. Структурные характеристики лактатдегидрогеназы 44
1.6.4.Влияние природных осмолитов на кинетические характеристики лактатдегидрогеназы 48

1.7.Исследование эффективности работы биферментной системы: НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза 50
1.8.Возможность построения полиферментных цепей сопряженных с бактериальной люциферазой 53
1.9. Заключение к главе 58
ГЛАВА 2. Материалы и методы 60
2.1. Оборудование 60
2.2. Химические реактивы 60
2.3.Реакционная смесь для проведения исследований сопряженных ферментативных систем 61
2.3.1.Реакционная среда для исследований биферментной системы: НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза 62
2.3.2.Реакционная среда для проведения исследований триферментной системы: лактатдегидрогеназа + НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза 63
2.3.3. Приготовление растворов глицерина и сахарозы 66
2.4. Измерение кинетических параметров сопряженных ферментативных систем 66
2.4.1.Измерение кинетических параметров биферментной системы: НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза 66
2.4.2.Измерение кинетических параметров триферментной системы: лактатдегидрогеназа + НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза 67
2.5. Исследование термостабильности биферментной и триферментной системы в реакционных средах различной вязкости 68
2.6.Регистрация спектров флуоресценции НАДН:ФМН-оксидоредуктаза и бактериальная люцифераза в вязких реакционных средах 69
2.7.Методы биотестирования почвенных образцов, загрязненных поллютантами, с использованием ферментативных систем, различной сложности 70

2.8. Методы оценки потенциальной токсичности наноматериалов и нанотрубок с использованием биферментной системы: НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза 72
2.9. Статистическая обработка результатов 73
ГЛАВА 3.Влияние вязкости реакционной среды на активность би- и триферментных систем 74
3.1.Влияние вязкости реакционной среды на кинетическую активность биферментной биолюминесцентной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза 74
3.2.Влияние вязкости реакционной среды на кинетическую активность триферментной системы лактатдегидрогеназа + НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза 79
3.3. Выводы по главе 82
ГЛАВА 4. Изучение термостабильности би- и триферментной систем в условиях вязкого микроокружения 83
4.1. Влияние растворов повышенной вязкости на температурную стабильность биферментной системы: НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза 83
4.2. Исследование спектров флуоресценции ферментов биолюминесцентной реакции бактерий - НАДН:ФМН-оксидоредуктазы и люциферазы в вязких средах 87
4.3. Влияние растворов повышенной вязкости на температурную стабильность триферментной системы: лактатдегидрогеназа + НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза 90
4.4. Выводы по главе 95
ГЛАВА 5. Оценка возможности применения полиферментных систем *in vitro* в качестве тест-систем в биолюминесцентных ферментативных биотестах для оценки загрязнения почв поллютантами и определения потенциальной токсичности наноматериалов 97

5.1.Анализ чувствительности растворимой биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза к одностенным и многостенным углеродным нанотрубкам и наноматериалам 97
5.2.Сравнение чувствительности моно-, би- и триферментной систем к пестицидам и ионам металлов для оценки возможности их использования в качестве биотестов для экологического мониторинга почв............................... 102
5.3.Разработка программного обеспечения для сравнения стандартной активности ферментативных биотестов при тестировании степени загрязнения почвенных образцов 107
5.4. Выводы по главе 111
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 114
ВЫВОДЫ... 115
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ 116
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 121
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 123

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Актуальной задачей современной биофизики является понимание механизмов функционирования ферментов в многокомпонентной гиалоплазме клетки, содержащей от 5 до 40% молекул белков, аминокислот и полисахаридов от всего объема клетки [1-2]. Поэтому становится очевидным тот факт, что исследование кинетики ферментов в условиях *in vitro* не приводит к пониманию релевантных механизмов функционирования ферментов в условиях *in vivo*. В настоящее время, для изучения метаболических процессов *in vivo* идет поиск сред с оптимальными физико-химическими условиями, имитирующими внутриклеточное окружение ферментов в условиях реальной клетки [3].

Известно, что клеточная цитоплазма содержит водный домен, в котором находятся макромолекулы и небольшие органические и неорганические растворенные вещества, отвечающие за многие метаболические и ферментативные процессы в живых клетках, а наиболее адекватные значения цитоплазматической вязкости в жидкой фазе составляют от 2 до 8 сП [4,1]. В связи с этим, особо важным и интересным является вопрос о том, каким образом вязкость «организованной воды» водного домена цитоплазмы оказывает влияние на динамику протекающих метаболических процессов, что является актуальной фундаментальной задачей. Основными химическими агентами, с помощью которых принято варьировать значения вязкости реакционной среды, являются глицерин и сахароза [5,6]. Авторы, работающие в данном направлении, отмечают, что исследование вязкостно-температурной зависимости ферментативной реакции зачастую способствует получению полной и информативной картины об изменении термодинамической кооперативности в исследуемой системе [7-8]. В дополнение, использование водных растворов глицерина и сахарозы зачастую сопряжено с повышением эффективности использования ферментативных систем в биотестировании [9-11], что придает прикладную значимость и актуальность предлагаемому исследованию.

Обозначенные выше направления исследований в полной мере относятся и к метаболическим процессам, происходящим в клетках светящихся бактерий. Несмотря на широкое использование биолюминесцентной биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза (Р + Л) в качестве тест-объекта для оценки загрязнения различных сред [12-13], отсутствует информация об окружении, в котором функционируют ферменты в клетках светящихся бактерий. Нет обоснования корректности использования тест-системы Р + Л вместо светящихся бактерий в биотестировании, так как вопрос о существовании комплекса между этими ферментами до сих пор остается открытым [14]. При этом разработанные подходы конструирования цепей сопряженных комплексов с бактериальной люциферазой, состоящих из 2-6 ферментов [15-16], дают возможность для реконструирования фрагментов метаболических систем в вязком микроокружении для создания модели функционирования ферментов в гиалоплазме.

Цель и задачи исследования – выявить механизмы функционирования ферментов в би- и триферментативных цепях сопряжения с бактериальной люциферазой в условиях вязкого микроокружения, имитирующего внутриклеточную среду клетки, влияющих на чувствительность ферментативных биотестов.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Установить закономерности влияния вязкости реакционной среды на активность биферментной (НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза) и триферментной (лактатдегидрогеназа + НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза) систем.

2. Оценить закономерности влияния вязкости реакционной среды на термостабильность цепей сопряжения ферментов с бактериальной люциферазой для выявления условий эффективного взаимодействия ферментов в

биферментной (НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза) и триферментной (лактатдегидрогеназа + НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза) системах.

3. Оценить влияние количества ферментов, в полиферментных цепях сопряжения с бактериальной люциферазой, на чувствительность биолюминесцентных ферментативных биотестов, используемых в качестве тест-объекта.

Научная новизна. Впервые в результате изучения эффектов вязкости реакционной среды, имитируемой добавлением различных концентраций глицерина и сахарозы, на активность биферментной (НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза – Р + Л) и триферментной (лактатдегидрогеназа + НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза – ЛДГ + Р + Л) систем получены зависимости изменений кинетических (константа спада, общее количество высвеченных квантов света) и термодинамических (энергия активации, константа термоинактивации) характеристик метаболических ферментативных комплексов в зависимости как от длины цепи сопряженных ферментов, так и от вязкости микроокружения. Показано, что увеличение вязкости реакционной среды влияет на подвижность пространственных структур ферментов, что объясняет уменьшение каталитической активности ЛДГ + Р + Л системы. Предложенный критерий оценки эффективности взаимодействия сопряженных ферментов по изменению термостабильности показал, что в триферментной системе ЛДГ + Р + Л теряется сопряжение по НАДН при увеличении вязкости микроокружения, в то время как эффективность сопряжения ферментов в биферментной системе Р + Л сохраняется в растворах повышенной вязкости даже при повышении температуры до +35℃.

Впервые предложены структурные элементы и критерии для построения экспериментальной модели эффективного взаимодействия ферментов в метаболических фрагментах в условиях вязкости реакционной среды, приближенных к внутриклеточным.

Практическая значимость работы. Найдены условия микроокружения для увеличения чувствительности к токсикантам у ферментативных систем, сопряженных с люциферазой. На примере оценки степени загрязнения почвенных экосистем показано, что повышение сложности системы (от моно- до триферментной) увеличивает чувствительность анализа, что позволяет управлять чувствительностью ферментативных тестов за счет использования ферментативных комплексов разной сложности или подбора систем, подверженных наименьшему влиянию фоновых компонентов почвы. Показано, что биферментная система Р + Л имеет более высокую чувствительность к действию углеродных нанотрубок (УНТ), чем тест *in vivo* на основе люминесцентных бактерий (EC_{50} для однослойных углеродных карбоксилированых нанотрубок (ОСУНТ) и многостенных углеродных нанотрубок (МСУНТ) на 2–3 порядка ниже). Предложены современные подходы для конструирования специализированных ферментативных биотестов различной сложности для целей мониторинга экологической безопасности сред различного компонентного состава и степени загрязнения.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Показано, что кинетические и термодинамические характеристики биферментной (НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза) и триферментной (лактатдегидрогеназа + НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза) систем зависят от вязкости реакционной среды, созданной водными растворами глицерина и сахарозы, и длины цепи сопряжения.

2. Увеличение термостабильности ферментативных систем, сопряженных с бактериальной люциферазой, может являться интегральным критерием оценки эффективности их кооперации.

3. Показано, что чувствительность биолюминесцентных ферментативных биотестов к почвенным токсикантам и наноматериалам зависит от количества ферментов в тест-объекте.

Личный вклад автора заключается в проведении экспериментальных исследований ферментативных систем, написании научных статей и тезисов конференций по материалам диссертации.

Диссертация соответствует паспорту специальности **03.01.02 – Биофизика**. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, пункт 1 – Молекулярная биофизика: биофизика нуклеиновых кислот; биофизика белка.

Достоверность и обоснованность результатов. В работе использовали современное научно-исследовательское оборудование и методы исследования. Для проверки достоверности и обоснованности результатов экспериментов, различия между показателями независимых выборок оценивали по критерию Стьюдента (t). Значения считали достоверными при уровне значимости не ниже 95% ($p < 0{,}05$).

Апробация работы. Основные положения и выводы диссертации были представлены на: Международной онлайн конференции «Устойчивое развитие после COVID-19: экологические проблемы и вызовы», (1-2 июня 2020, Индия); VI Съезд биофизиков России (16-21 сентября 2019, Сочи, Россия); 8-я Международная встреча молодых ученых-экологов (5 - 10 февраля 2019, Гент, Бельгия); 29-я, 28-я Ежегодная встреча Европейского общества SETAC (Хельсинки, Финляндия, 2019; Рим, Италия, 2018); 20-й, 19-й, 18-й и 17-й Международный симпозиум по хемилюминесценции и биолюминесценции (Нант, Франция, 2018; Цукуба, Япония, 2016; Уппсала, Швеция, 2014; Гуэлф, Канада, 2012); 9-й Международный конгресс по биокатализу (26-30 августа 2019, Гамбург, Германия); 53-я Международная научная студенческая конференция МНСК-2015 (11-17 апреля 2015, Новосибирск, Россия); Международная конференция SFM’15 (21-25 сентября 2015, Саратов, Россия); 10-я Международная конференция по стабилизации белков (7-9 мая 2014, Лаго-Маджоре, Италия); Всероссийская научно-практическая конференция «Развитие физико-химической биологии и биотехнологии на современном этапе» (23-24 октября 2013, Иркутск, Россия); 3-й Международный семинар «Окружающая среда и климатические изменения» (8-10 июля 2013, Кадис, Испания); семинарах лаборатории биолюминесцентных биотехнологий Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета (Красноярск, 2011-2020).

Диссертационная работа была выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации на оказание услуг (выполнение работ) в 2020 году, проект № FSRZ-2020-0006, «Сопряженные ферментативные реакции в средах, моделирующих внутриклеточное окружение: механизмы эффектов и аналитическое применение».

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 25 работ, из них: 8 статей в российских и международных журналах; 17 публикаций в российских и международных сборниках трудов и материалов научных конференций.

Структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 141 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, трех глав с изложением результатов работы, заключения, выводов, списка публикаций по теме диссертации, списка сокращений и списка литературы (169 источников, в том числе 149 зарубежных). Диссертация иллюстрирована 28 рисунками и 7 таблицами.

ГЛАВА 1. Обзор литературы

1.1. Сравнение реакционной среды, окружающей ферменты, в условиях классических буферных растворов *(in vitro)* и внутриклеточного окружения *(in vivo)*

При исследовании поведения ферментативных реакций в условиях цитоплазматического окружения, необходимо отметить, крайне часто появляются ситуации, в которых происходит отклонение механизмов функционирования ферментативных реакций от допущений, которые неявным образом присутствуют при исследовании функционирования ферментов в разбавленных растворах методами классической биохимии. В частности, детально анализируются такие положения биохимии, которые нарушаются во внутриклеточных условиях [1]:

1) реакционный объем практически неограничен;

2) раствор является разбавленным;

3) концентрации субстратов значительно больше, чем концентрации ферментов;

4) раствор четко определен (известен его состав);

5) раствор гомогенный.

Относительно положения №1 «реакционный объем практически неограничен», нужно понимать, что размер живых клеток варьирует от 0,3 мкм в диаметре (для микоплазмы) до 1 мм в диаметре (для яйца гладкой шпорцевой лягушки), и ему соответствуют объемы от 10^{-17} л до половины микролитра. Средний объем бактерий составляет около $2{\cdot}10^{-16}$ л. Эукариотические клетки больше по размеру, но они имеют множество органелл, которые занимают свободный реакционный объем, и часть реакций происходят в примембранном слое или внутри конкретных органелл. Например, объем одной везикулы диаметром 50 нм составляет $6 \cdot 10^{-20}$ л. Кроме того, практически половину объема клетки занимают внутренние мембранно-связанные компартменты, что еще больше сокращает свободный объем, доступный для реагентов, диффундирующих в цитоплазме, которая омывает органеллы. Таким образом, ферментативные реакции происходят в крайне малом объеме, ограниченном клеточными компартментами. Это приводит к тому, что количество молекул и отдельных ионов в клетке – порядка нескольких тысяч на клетку, а значит, диффузионные процессы становятся значительным фактором функционирования клеток.

Аналогично явным образом проявляется несоответствие положения №2 – «раствор является разбавленным» во внутриклеточных условиях. Основное предположение физической химии разбавленных растворов состоит в том, что взаимодействием между молекулами растворенного вещества можно пренебречь. В то время как общая концентрация макромолекул внутри клеток очень высокая, белки среди них самые распространенные. Известно, что при характерной для клеток 20%-ой концентрации белковых макромолекул в среде начинают ярко проявляться эффекты молекулярного краудинга, оказывающие значительное воздействие на ферментативную кинетику.

Экспериментальные данные также зачастую свидетельствуют о том, что *in vivo* концентрация ферментов значительно превышает концентрацию соответствующих субстратов, и разница может составлять несколько порядков. В таких условиях положение №3 – «концентрации субстратов значительно больше, чем концентрации ферментов» серьезно нарушается: практически все молекулы субстрата находятся в связанном состоянии, и концентрация субстрата становится параметром, лимитирующим скорость ферментативной реакции, что сильно отличается от предпосылок классических кинетических моделей ферментативного катализа.

О невозможности точно определить состав цитоплазмы эукариотической клетки (о нарушении положения №4 – «раствор четко определен (известен его состав)») говорит многообразие известных мРНК: эукариотическая клетка производит от 10000 до 20000 разных белков, большинство из которых еще не исследованы методами биохимии. И хотя многие из них локализованы в органеллах или прикреплены к мембранам, считается, что большинство растворимых белков распределены равномерно внутри клетки [1,17].

Гомогенность цитоплазмы как среды для протекания ферментативных процессов также вызывает возражения. В первую очередь, присутствие мембранно-связанных субкомпартментов приводит к гетерогенности физико-химических характеристик внутреннего содержимого клетки. Известно, что клеточные органеллы располагаются не случайным образом, и клетка тратит значительное количество энергии на поддержание такого неравномерного распределения. Гетерогенность цитоплазмы эукариотических клеток связана также с наличием в них цитоскелета, образованного из само-собирающихся полимерных белковых волокон. Бактерии не имеют такой структуры как цитоскелет у эукариот. Тем не менее, бактериальная цитоплазма похожа на коллоидное стекло, будучи более насыщенной средой, чем эукариотическая. Это подтверждается экспериментально определенными коэффициентами диффузии свободного GFP в цитоплазме *E.coli*, которые оказались приблизительно в три раза меньше, чем для эукариотических клеток [18].

В целом, исследователи отмечают, что физическая природа бактериальной цитоплазмы всё ещё плохо понята, хотя именно она определяет цитоплазматические динамику и, следовательно, клеточную физиологию и поведение организмов [18-19]. Путем регистрации динамики белковых филаментов, плазмид, гранул и посторонних частиц различных размеров, было установлено, что бактериальная цитоплазма обладает свойствами, которые характерны для коллоидных стекол, и изменяет свое состояние от жидкого до твердого в зависимости от размера наблюдаемого компонента. В результате движение цитоплазматических компонентов становится непропорционально ограниченным с увеличением их размера. Примечательно, что клеточный метаболизм «разжижает» цитоплазму, позволяя более крупным компонентам покинуть их окружение и достичь отдаленных областей цитоплазмы. Следовательно, цитоплазматическая текучесть и динамика резко изменяются в клетке при переключении между метаболически активным и неактивным состоянием в ответ на внешний стимул [18-19]. Такие результаты дают представление о бактериальной клетке в состоянии покоя и имеют важные последствия для понимания бактериальной физиологии, так как стеклоподобное поведение цитоплазмы влияет на все внутриклеточные процессы, связанные с крупными компонентами клетки.

В то же время, отмечается, что независимо от деталей физической химии цитоплазмы, некоторые общие тенденции её функционирования ясны. В частности, исследователи отмечают, что это неточно и обманчиво рассматривать цитоплазму как однородную среду, подобную разбавленному раствору, но характеризующуюся повышенным единым значением вязкости, определяющим вращательную подвижность малых молекул, дальнюю трансляционную диффузию растворенных веществ и фазовое состояние внутриклеточной среды [20]. Наблюдаемая подвижность растворенных веществ в концентрированной, сложной смеси разных компонентов, которую представляет собой внутриклеточная среда, зависит от размера растворенного вещества и временного/пространственного интервала, при котором эту подвижность регистрируют. В отсутствие связывания, вращательная и трансляционная подвижность малых молекул, таких как ионы и малые органические молекулы, не будет изменена краудингом или препятствиями в виде неподвижных компонентов. Она будет отражать вязкость внутриклеточной воды, которая, по существующим данным, является, по сути, пулом несвязанной воды. Даже макромолекулы размера типичного глобулярного белка (~ 3 нм в радиусе) могут свободно диффундировать на чрезвычайно короткие расстояния или в очень коротких временных диапазонах, потому что вероятность встретить препятствия на пути диффузии при таком пространственно-временном режиме относительно низка. Таким образом, скорости реакций, зависящих от диффузии реагентов на короткие расстояния, будут относительно устойчивыми к воздействию эффектов исключенного объема, и иметь примерно те же значения, которые измеряются в разбавленном растворе.

Для анализа диффузии растворенных веществ макромолекулярного размера в длительные времена или на дальние расстояния, необходимо учитывать возможные последствия краудинга, задержки неподвижными препятствиями и переходных ограничений. Прогнозировать подвижность макромолекул в цитоплазме на основе общих принципов очень трудно, для реальных биологических молекул она дополнительно зависит от конкретного размера, формы и деформируемости исследуемой молекулы, а также от воздействия слабых сил притяжения или отталкивания. Склонность к слабым взаимодействиям (связыванию) или разделению на капельные фазы приводит к дальнейшему снижению подвижности молекул любого размера. Это подтверждается исследованиями, указывающими доминирующую роль взаимодействий связывания в чрезвычайно малой подвижности глобулярных белков, наблюдаемых в *E. coli*. [17, 21-22].

1.2. Влияние химических агентов, моделирующих внутриклеточные условия, на кинетические и термодинамические характеристики ферментов

Одной из основных задач системной биологии является создание исчерпывающих, количественных прогностических моделей, которые смогут расширить наши знания относительно клеточного устройства и его поведения. Относительно, понимая устройства ферментативного катализа внутри клетки, в частности, в последнее время, сложилось четкое понимание, что главным компонентом, определяющим работоспособность ферментов и сопряженных с ними метаболических реакций, является цитоплазма клетки. Осознание того, что клеточная цитоплазма является густой смесью растворенных в ней макромолекул и различных веществ, составляющих 40% от объема клетки, привело к тому, что в настоящее время проблема изучения влияния молекулярной скученности на кинетические и термодинамические характеристики ферментативных реакций является «горячей» и широко изучаемой проблемой в микромире клетки [2]. Молекулярная скученность является одной из отличительных особенностей клеточных функций, которая отличает исследования биохимических реакций в клетке от лабораторных исследований. Исследования влияния молекулярной скученности на биохимические процессы установили воздействие этого внутриклеточного эффекта на ключевые функции клетки, такие как фолдинг белков, ферментативный катализ, внутриклеточная сигнализация и транспорт, локализация макромолекул и органелл [20].

С ростом концентрации макромолекул уменьшается количество свободного объема, доступного для последующих молекул. Следствием этого является уменьшение случайности распределения частиц в концентрированных растворах, приводящее к уменьшению энтропии «переполненных» растворов. Уменьшение энтропии увеличивает количество свободной энергии, тем самым значительно увеличивая термодинамическую активность растворенных веществ, что оказывает сильный эффект на все процессы, связанные с активностью. При этом эффект исключенного объема, вызванный высокой концентрацией определенных молекул, влияет не только на термодинамические характеристики этих молекул, но и на активности других веществ, присутствующих в малых концентрациях. То есть можно утверждать, что в неидеальном растворе с эффектом краудинга поведение молекулы будет другим, чем в разбавленном растворе.

Экспериментально показано, что эффект краудинга уменьшает константу Михаэлиса-Ментен ($К_м$), предположительно за счет повышения активности воды, либо за счет увеличения соотношения коэффициентов активности между ферментом и фермент-субстратным комплексом [8]. Но, несмотря на полученные экспериментальные данные, остается больше вопросов, чем ответов. Так, например, синтетические полимерные краудинг агенты увеличивают ферментативную активность таких ферментов, как глюкозида и АДФ-сахарная дифосфатаза, но, в то же время, эти, же краудинг агенты уменьшают каталитическую активность таких ферментов, как гексокиназа и щелочная фосфатаза. При этом эффект влияния молекулярного краудинга на кинетику моноферментных реакций описывается нелинейной функцией. Так, в случае, исследования влияния эффекта молекулярного краудинга на кинетику мультимедной оксигеназы (Fet3p) было показано, что постепенное увеличение добавляемых концентраций, в реакционную смесь, краудинг агентов приводит к повышению кинетической активности исследуемого фермента, но, при увеличении добавляемой концентрации краудин агента выше «определенной» наблюдается ингибирование кинетической активности Fet3p [8].

Зачастую, природа используемого для моделирования внутриклеточных условий краудинг агента также может влиять на кинетические характеристики исследуемых ферментов. Так ранее было показано, что небольшие концентрации краудинг агентов белкового происхождения увеличивают ферментативную активность ферментов, в то время как краудинг агенты синтетического происхождения уменьшают кинетическую активность этих же ферментов [23]. Все эти исследования, вероятно, подтверждают тот факт, что молекулярный краудинг имеет различное действие на компоненты, которые в сумме дают величину ферментативной активности фермента. Другими словами, молекулярный краудинг уникальным образом действует на такие характеристики фермента, как диффузия, константа связывания белка с субстратом, термодинамическая активность и термостабильность ферментов [24]. Ранее было показано, что использование, в качестве краудинг агентов синтетических полимеров приводит к увеличению термостабильности ферментов, но в тоже время синтетические полимеры нарушают диффузионные процессы внутри системы [25]. Проведенное исследование, посвященное установлению влияния нейтрально и отрицательно заряженных краудинг-агентов на кинетические характеристики малатдегидрогеназы показало, что нейтрально заряженные краудинг агенты уменьшают величину максимальной скорости реакции (V_{max}) малатдегидрогеназы сильнее, чем отрицательно заряженные краудинг агенты. Исключением стал яичный белок, который сильнее остальных исследованных краудинг агентов уменьшает значения V_{max} и $K_{м}$ малатдегидрогеназы, среди всех исследуемых краудинг агентов [8].

Помимо природы краудинг агентов, на кинетическую активность ферментов может влиять размер, как самого фермента, так и краудинг агента. Так, например, было проведено исследование, посвященное поиску вклада в эффект молекулярного краудинга таких характеристик как относительный размер фермента и используемый краудинг агент. Экспериментально было показано, что ферментативная активность «малых» ферментов, таких как α-химотрипсин (молекулярная масса – 25 кДа) и пероксидаза хрена (молекулярная масса – 42 кДа), не зависит от молекулярной массы краудинг агентов, в то время как ферментативная активность «больших» ферментов таких как лактатдегидрогеназа (молекулярная масса -150 кДа) и щелочная фосфатаза (молекулярная масса -105 кДа) уменьшается с увеличением размера, используемого краудинг агента. Такой эффект может быть объяснен тем, что большие по размеру краудинг агенты уменьшают силу фермент-субстратных взаимодействий, что в конечном счете приводит к уменьшению ферментативной активности [2].

С помощью различных систем *in vitro*, моделирующих внутриклеточный краудинг, было показано, что эффект исключенного объема оказывает значительное влияние на конформационную стабильность и структурные свойства биологических макромолекул. Также, макромолекулярный краудинг может влиять на различные биологические равновесия, а значит, на процессы сворачивания белка, связывания с малыми молекулами, ферментативную активность, белок-белковые взаимодействия, патологическую агрегацию белков, степень формирования амилоидных фибрилл [26].

С помощью тест-системы, с использованием α-кристаллина и УФ- облученной гликогенфосфорилазы b, было проведено исследование влияния внутриклеточных условий краудинга на агрегацию белков и антиагрегационную активность малых белков теплового шока. В качестве краудинг агентов исследователями были использованы полиэтиленгликоль (ПЭГ-20000), Фиколл-70000, и триметиламин N-оксида (ТМАО). На примере УФ-облученной гликогенфосфорилазы b было показано позитивное влияние молекулярного краудинга на процессы агрегации фермента. В присутствии краудинг агентов наблюдается снижение антиагрегационных процессов α-кристаллина. Наблюдаемые эффекты объясняются существованием двух типов комплексов между α-кристаллином и

УФ-облученной гликогенфосфорилазы b, которые приводят к наблюдаемым антиагрегационным эффектам двух исследованных ферментов в присутствии краудинг агентов [27].

Следует отметить, что в последние годы некоторые исследователи призывают не воспринимать эффект стабилизации структуры белков в условиях краудинга как догму и не переоценивать роль исключенного объема в данном эффекте [28-32]. Это напрямую связано с методической проблемой, исходно возникающей при экспериментальном моделировании «стесненных» условий – трудностью или даже невозможностью подобрать идеальный краудинг агент, который создавал бы только стерические препятствия в среде без изменения других физико-химических характеристик. В частности, результаты вычислительного моделирования и многие экспериментальные результаты указывают на критическую роль межмолекулярных взаимодействий (электростатических, гидрофобных, ван-дер-ваальсовых) и диффузии, наряду с исключенным объемом, в управлении реакциями связывания белков с различными молекулами [28]. В дополнение, опубликована работа, в которой авторы на основе своих экспериментальных данных отмечают, что помимо межмолекулярных взаимодействий краудинг агентов с компонентами реакций следует учитывать их влияние на физико-химические свойства растворителя (воды) [31]. Например, изменение общей полярности среды в присутствии краудинг агента может изменить степень гидратации поверхности исследуемого белка, что повлияет на его структурные и функциональные свойства. Следует отметить, что в настоящее время наибольшее внимание исследователей уделяется влиянию краудинга на процессы сворачивания белков, их конформационную динамику и реакции ассоциации. Ферментативные процессы в «переполненной» среде являются гораздо менее изученными, развитие этого направления еще во многом находится на стадии накопления экспериментальных данных. Как результат, эффект влияния молекулярной скученности на кинетику ферментативной реакции может зависеть от механизма действия краудинг агентов на индивидуальный фермент, что требует детального анализа в каждом конкретном случае [17,8,31].

1.3. Эффекты вязкости среды в ферментативных процессах

Во всех клетках присутствует жидкая водная фаза, в которой протекает значительная часть основных реакций внутриклеточного метаболизма. Вязкость является одним из фундаментальным параметров водной среды, от которого зависят протекающие в ней физико-химические процессы [4,32-33]. Учитывая пространственную неоднородность внутриклеточного пространства, измерения внутриклеточной вязкости, как правило, охватывают определенную область клетки, в которой находится зонд, и характеризуют то, что можно назвать «микровязкостью» [32-34].

Теоретическое рассмотрение влияния вязкости на скорости химических реакций впервые было представлено в работе Крамерса в 1940 г. [32,34]. Согласно его теории, химическая реакция протекает в результате броуновского движения молекул (диффузии), которые могут испытывать трение со стороны молекул среды. Трение реагентов со средой влияет на вероятность преодоления барьера энергии активации и тем самым на скорость реакции.

Предполагается, что, по крайней мере, в растворах чувствительными к вязкости и лимитирующими скорость реакции являются не процессы диффузии реагентов, а сам процесс катализа на стадиях активации субстрата и высвобождения продукта реакции. Эти стадии связаны с конформационными перестройками домена активного центра фермента. Причем, чем больше подвижность домена с активным центром фермента зависит от вязкости среды, тем больше вязкость среды влияет на активность фермента и тем самым на скорость реакции [32-34]. Следует отметить также, что внутримолекулярное трение влияет и на кинетику конформационных перестроек, а в конечном итоге, и на скорость ферментативной реакции [32,35-36]. Вероятно, индивидуальные особенности организации каждого фермента и определяют разную зависимость их внутримолекулярной подвижности от вязкости среды.

Ранее был разработан полуфеноменологический подход, позволяющий детектировать конформационную динамику белка в ходе его функционирования. Суть этого подхода заключается в исследовании зависимости константы скорости элементарной биохимической стадии от изменения вязкости среды (растворителя) [32,34]. Однако, соответствующие константы скорости не всегда обнаруживают вязкостную зависимость. Общий вид феноменологического выражения константы химического (биохимического) процесса от вязкости среды определяется формулой:

$$k = A \times \eta^{-\delta} \times e^{-\frac{E_a^*}{RT}}, \qquad (1)$$

где A – предэкспоненциальный множитель, E_a – «внутренняя» энергия активации (A и E_a не зависят от вязкости среды), δ – параметр, принимающий в зависимости от механизма элементарного акта процесса значения от 0 до 1 [32-34].

Случай δ = 0 соответствует отсутствию вязкостной зависимости и, следовательно, интерпретируется в рамках традиционной теории абсолютных скоростей реакции. Случай δ = 1 соответствует диффузионному пределу в теории Крамерса.

Ситуация же с 0 < δ < 1 характерна в большинстве своем для систем, где химические превращения протекают вблизи раздела фаз, и отражает закономерность передачи вязкостных характеристик из гомогенной фазы в приграничные слои.

При добавлении различных вязких агентов в водную среду неизбежно меняются свойства раствора, а также не исключается возможность прямого взаимодействия этих веществ с ферментами. Поэтому для выявления непосредственного влияния вязкости на скорость протекания ферментативной реакции, необходимо проводить измерения в растворах с добавлением разных вязких агентов.

Существует два принципиальных механизма влияния вязкости на ферментативные реакции. Так как коэффициент молекулярной диффузии обратно пропорционален вязкости среды, повышение вязкости растворителя приведет к уменьшению констант скоростей ассоциации и диссоциации ферментов с молекулами субстратов, продуктов или других лигандов (например, ингибиторов). Для этого механизма:

$$\mathrm{k_{obs}} = \frac{\mathrm{k}}{\eta_{\mathrm{rel}}}, \tag{2}$$

$$\frac{\mathrm{k}}{\mathrm{k_{obs}}} = \eta_{\mathrm{rel}}, \tag{3}$$

, где η_{rel} – это относительная вязкость, определяемая как отношение вязкостей реакционного раствора в присутствии и отсутствии вязкого агента.

Через замедление вязкостью раствора структурных изменений белка, обусловленное «трением», увеличение вязкости приводит к уменьшению скоростей процессов, сопряженных со структурными изменениями. Для этого механизма:

$$\mathrm{k_{obs}} = \frac{\mathrm{k}}{\eta_{\mathrm{rel}}^{\delta}} \tag{4}$$

$$\frac{k}{k_{obs}} = \eta_{rel}^{\delta} \tag{5}$$

, где δ – константа сопряжения, определяющая чувствительность реакции к вязкости растворителя.

Теория предсказывает, что δ может меняться от 0 до 1; δ будет иметь значение 0 для реакций тех ферментов, активные центры которых блокированы от растворителя, в то время как δ будет равно 1 для реакций ферментов, активные центры которых существенно соединены с растворителем [32-33].

1.3.1. Структурное происхождение чувствительности ферментативных реакций к вязкости

Исследователи сходятся во мнении, что наличие зависимости ферментативных реакций от вязкости реакционной среды обязательно связано с некоторыми конформационными изменениями белковой глобулы. Часто зависимость реакции от вязкости является доказательством конформационных изменений белковой глобулы в ходе катализируемой реакции [7,37]. В настоящее время проводится огромное количество исследований посвященных поиску ответа на вопрос - как структурные изменения белковой молекулы связаны с наблюдаемыми различиями внутренней вязкости и раскрытию механизмов действия растворителя на интермедиаты реакции через внутреннюю часть белка в активном центре. Понимание «структурного» вклада вязкости реакционной среды на скорость ферментативных реакций поможет приблизить нас к пониманию природы внутреннего трения [7].

На рисунке 1.1. представлены четыре основные идеи о структурном происхождении вязкостной зависимости ферментативных реакций. Эти идеи представлены в виде простых моделей конформационных изменений двух белковых доменов, движущихся относительно друг друга.

Было установлено, что вязкостная зависимость обусловлена амплитудой конформационного изменения [38]: даже если вязкость окружающей среды выше, чем 10^{15} сП, малоамплитудная динамика остается неизменной, в то время как высокоамплитудная динамика ослаблена (Рисунок 1.1.A) [39-41]. Ранее было установлено, что при активации трипсина, размер боковой цепи, где происходит относительное вращательное движение двух доменов, является основным фактором, определяющим чувствительность трипсина к вязкости реакционной среды (Рисунок 1.1.B) [42]. Также было обнаружено, что чем больше активный центр углублен в белковую молекулу, тем менее он чувствителен к вязкости растворителя (Рисунок 1.1.D) [43]. Зачастую подвижность пространственной структуры белковой глобулы имеет прямую зависимость от вязкости реакционной среды. Так, ранее было проведено сравнение скорости переноса электрона в пределах жесткого (ковалентная связь) и более гибкого (электростатические взаимодействия) комплекса цитохрома c и пластоцианина.

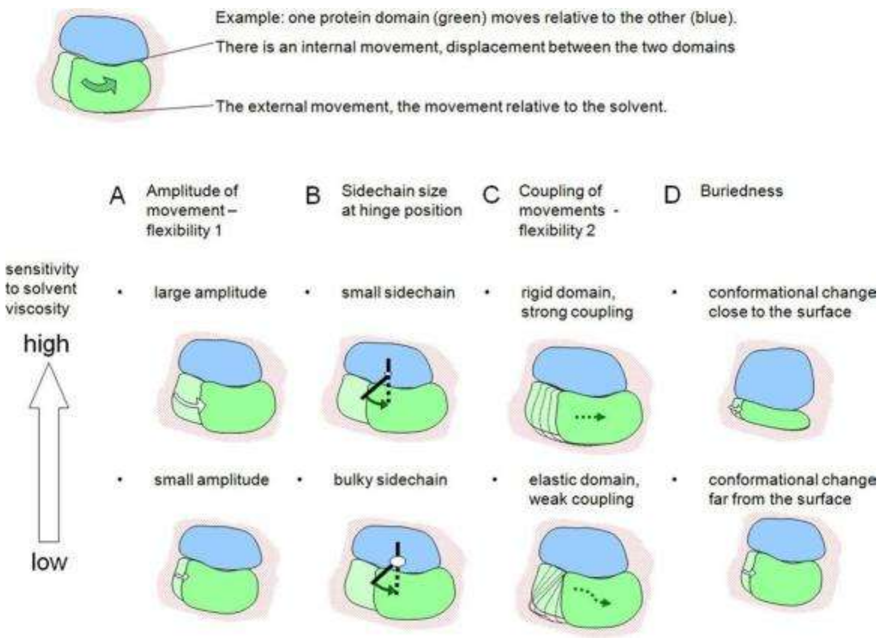


Рисунок 1.1. — Структурные рассуждения о чувствительности к вязкости конформационных изменений. В модели, используемой для иллюстрации, рассматривается простое конформационное изменение: скольжение нижнего белкового домена (зеленый цвет) относительно статического, верхнего домена (синий цвет). Начальная конформация скользящего домена показана более светлым цветом. Четыре различные структурные характеристики оцениваются на основе их зависимости от вязкости. (А) чем больше амплитуда конформационного изменения, тем выше чувствительность к вязкости; (В) когда два домена соединены, скользящее движение вызывает вращение в соединительных сегментах. Аминокислоты с наибольшим вращением функционируют как шарниры. Если эти аминокислоты являются более объемными, зависимость от вязкости уменьшается; (С) конформационное изменение происходит вдоль двух координат реакции или двух поверхностей взаимодействия. Существует внутренняя поверхность, то есть поверхность между двумя доменами и внешней поверхностью, которая является поверхностью белка, движущейся относительно растворителя. Эти две поверхности связаны через сам скользящий (зеленый) домен, следовательно, координаты реакции связаны между собой. Степень связи между двумя координатами реакции зависит от упругости скользящей области. Чем сильнее сцепление, тем выше чувствительность к вязкости; (D) движения, происходящие вдали от поверхности взаимодействия растворитель-белок менее чувствительны к изменениям вязкости, следовательно, чем большее углубление каталитически активных структур белковой молекулы от поверхности, тем меньше зависимость белка от вязкости. Воспроизведено из [7].

Были получены следующие результаты - жестко связанный комплекс не обладал чувствительностью к вязкости реакционной среды, в то время как более подвижный комплекс демонстрировал зависимость от вязкости реакционной среды [7]. Полученные результаты позволили предположить, что чем более жесткая структура белковой молекулы, тем менее она чувствительна к вязкости реакционной среды [44-45]. Аналогичный вывод был сделан на основе результатов, полученных для флуоресцентного белка. Полученный мутантный белок, обладающий большей гибкостью, был более чувствителен к внешней вязкости [45].

При этом существуют исключения из получаемых результатов, так противоположный результат был получен при исследовании влияния вязкости микроокружения на реакцию активации трипсина и его мутантов. Было получено, что предположительно более гибкий мутант трипсина, содержащий глициновую петлю, был менее чувствителен к вязкости растворителя, чем более жесткий мутант [36]. Наблюдаемое противоречие может быть причиной расплывчатого определения – «гибкость белковой молекулы». Данным термином можно описывать принципиально разные явления, например, амплитуду движения (Рисунок 1.1.А) или сочетание двух движений (Рисунок 1.1.С). Если предположить, что гибкость белковой молекулы характеризует амплитуду конформационного изменения, то большее конформационное изменение обусловлено для фермента с высокоподвижной пространственной структурой, что может быть причиной того, что он более чувствителен к вязкости растворителя (Рисунок 1.1.А, гибкость 1) [7,39-41]. Тем не менее, гибкость белковой молекулы может также использоваться для оценки силы сцепки белковых доменов, например, смещения внешней и внутренней поверхностей белкового домена без какой-либо отсылки на амплитуду их движений (Рисунок 1.1.С, гибкость 2). Сильная или жесткая связь сцепки означает, что конформационные изменения белка происходят одновременно в каждом задействованном белковом домене, тогда как слабая или гибкая связь сцепки между белковыми доменами означает, что их движения могут быть частично последовательными из-за упругих свойств пространственной структуры белка [36].

1.3.2. Физическая основа внутреннего трения

Существуют экспериментальные данные доказывающие, что вязкость растворителя может влиять на энергетический ландшафт ферментативной реакции путем изменения кажущихся энергетических барьеров [7,36,46-47]. Одним из таких доказательств является то, что при измерении температурной зависимости ферментативной реакций для определения энергии активации кажущаяся энергия активации, которая была рассчитана по тангенсу угла наклона, была на 5 ккал/моль выше [7,47], чем эталонное значение. Такие результаты были получены в следствие того, что температурной зависимостью вязкости растворителя традиционно пренебрегают (вязкость водных растворителей удваивается в диапазоне температур от 303 до 277 К, что является наиболее часто применяемым температурным диапазоном в экспериментах). Эта разница в 5 ккал/моль имеет место быть только когда теория Крамерса является хорошим приближением зависимости скорости ферментативной реакции от вязкости.

В отличие от влияния вязкости растворителя на энергетические ландшафты белковой глобулы, мало что известно о том, как внутренняя вязкость самой ферментативной реакции связана с ее энергетическим ландшафтом. Определение температурной зависимости внутренней вязкости ферментативной реакции является первым шагом к интеграции внутреннего трения к теории энергетического ландшафта. В настоящее время, опубликовано небольшое количество научных работ, посвященных определению температурной и вязкостной зависимостях ферментативных реакций, из которых может быть рассчитана зависимость внутренней вязкости ферментативной реакции от температуры (Таблица 1.1). Однако и среди небольшого количества опубликованных работ лишь несколько авторов делают выводы о важности внутренней вязкости ферментативной реакции или исследуют ее температурную зависимость. Недавно была обнаружена температурная зависимость внутренней вязкости активации трипсина, которая хорошо описывается уравнением Аррениуса [36].

Таблица 1.1. — Результаты исследований вязкостно-температурной зависимости ферментативных реакций. Воспроизведено из [7]

Исследованная реакция	Исследованный диапазон вязкости (сП)	Исследованный диапазон температур (К)
фотоиндуцированный перенос электрона между цитохромом Zn и пластоцианином меди	0,8-790	260-308
фотоиндуцированный перенос электрона между цитохромом Zn c_6 и цитохромом f	0-60	283, 293, 313
перенос электрона между цитохромом f и пластоцианином	1-3	293, 300
туннелирование протонов и гидридов в светоактивированной протохлорофиллид оксидоредуктазе	1-10	198-323
тушение фосфоресценции пероксидазы хрена	0,9-12	278-298
связывание гемоглобина с NO-спиновой меткой	1-10000	276-315
Время жизни фосфоресценции Trp четырех разных белков	1-100	253-333
лизоцим Trp изотопный обмен	1-6,3	288, 293, 299
формирование компактной конфигурации цитохрома C	0,7-6	290, 293, 298, 303
активация трипсиногена	0,9-5,5	275-313
связывание O_2 и CO с миоглобином и протогемом	1-100000	180-340
связывание CO с микропероксидазой 11	7-700	253-313
связывание CO с миоглобином	$1\text{-}10^{10}$	63-290
скорость гидролиза карбоксипептидазы A	7-90	283-308
H^+-АТФаза	1-3	293, 308, 313

Эта зависимость аналогична поведению вязкости жидкостей, которая также происходит от микроскопических столкновений пересекающихся барьеров [48]:

$$ϛ (T) = ϛ_0 \exp(\Delta E_ϛ / k_\beta T) \qquad (6)$$

, где $ϛ_0$ - независимый от температуры параметр внутренней вязкости, $\Delta E_ϛ$ - является характеристическим параметром энергии активации внутреннего трения. Такая же связь, но с другой интерпретацией, была обнаружена для цитохрома в процессе его ренатурации [49]. Данные, полученные для межмолекулярного электронного переноса и активности пероксидазы хрена, также согласуются с полученной ранее температурной зависимости внутренней вязкости [50-51]. Экспериментальные данные, которые хорошо описываются уравнением (6), указывают на то, что внутреннее трение связано с характеристиками энергетического барьера.

Недавно, на основе процесса фолдинга белка была выдвинута экспериментальная гипотеза о том, что внутреннее трение ферментативной реакции связано с неоднородным распределением энергетических ландшафтов [52]. На основе теоретического расчета о влиянии неоднородностей ландшафта, на диффузионную постоянную [53], было предположено, что измеренная разница значений внутренней вязкости между двумя мутантными доменами спектрина во время фолдинга была вызваны разницей в неоднородностях их энергетических ландшафтов [52]. Однако, оценка зависимости высоты энергетического барьера на поверхности энергетического ландшафта от температуры не проводилась. Позже аналогичная гипотеза была выдвинута для объяснения процессов активации трипсина. В проведенном исследовании была количественно определена температурная зависимость внутренней вязкости трипсина, согласно уравнению (6), на основе полученных экспериментальных данных [36]. Использованная модель основана на предложенной ранее гипотезы о подвижности внутреннего и внешнего доменов белковой глобулы, которые перемещаются относительно друг друга (рисунок 1.1.С), и дополнена идеей о неоднородности энергетического ландшафта. В таком приближении предполагается, что величина, характеризующая энергию активации внутреннего трения, зависит как от прочности связи между белковыми доменами, так и от структуры неоднородности ландшафта. Привлекательной чертой этой модели является то, что она отождествляет значение величины внутреннего трения ферментативной реакции с хорошо известной иерархической структурой энергетического ландшафта. Однако, даже если эта модель будет подтверждена экспериментальными наблюдениями, которые в конечном итоге докажут правильность этой модели, в конечном итоге она будет количественно выраженной только в терминах энергии. В настоящее время, в модели отсутствуют как количественная оценка силы сцепки мобильных и сопряженных доменов белковых глобул, так и оценка структуры неоднородности энергетического ландшафта. Поэтому, в настоящее время, данная модель подходит только для того, чтобы объяснить различия между мутантами одного и того же фермента, которые предположительно имеют очень похожие энергетические профили. Следует отметить, что модель имеет ограниченную прогностическую силу для других ферментов и реакций.

1.3.3. Экспериментальные подходы измерения внутренней вязкости ферментативных реакции

Внутренняя вязкость определяется косвенно путем измерения зависимости скорости реакции от вязкости. Широко используемые способы варьирования вязкости растворов – добавление глицерина, глюкозы, сахарозы, мальтозы, полиэтиленгликоля различного молекулярного веса, этанола, метанола в буферные растворы. Эти способы имеют некоторые недостатки, которые необходимо учитывать при планировании экспериментов и обсуждении полученных результатов. Добавление со-растворителя изменяет не только вязкость раствора, но и влияет на другие свойства раствора: диэлектрическую проницаемость, активность воды, ионную силу, осмотическое давление и др. Авторы часто делают большие усилия, чтобы свести перечисленные выше нежелательные изменения к минимуму [36] или доказать, что вызванные добавлением со-растворителя изменения незначительны для их конкретной экспериментальной части [46]. Часто эффекты различных со-растворителей сравниваются с эталонными условиями, чтобы проверить, есть ли какие-нибудь специфические эффекты влияния со-растворителя на ферментативные реакции [38,44,54-59]. Со-растворители могут нарушать равновесие, особенно, в реакциях фолдинга/денатурации белка [60] или влиять на высоту энергетического барьера активации ферментативной реакции [61], но для большинства ферментативных реакций доказано, что со-растворители не оказывают особого эффекта на упомянутые выше нарушения равновесия и энергетический ландшафт ферментативной реакции [7,62]. В относительно небольшом диапазоне концентраций со-растворителей нежелательные эффекты могут быть незначительными, но в случае высоких диапазонов значений вязкости, моделируемых высокими концентрациями со-растворителей, получаемые результаты вязкостных зависимостей ферментативных реакций очень трудно интерпретировать. Данный факт, особенно, стоит учитывать при изучении зависимости времени релаксации ферментативной реакции от вязкости реакционной среды, такие исследования обычно проводят при высоких значениях вязкости реакционной среды.

Вычислительные методы моделирования могут преодолеть эти технические трудности. Влияние макроскопической вязкости, с использованием методов моделирования, было исследовано путем изменения температуры со-растворителя независимо от температуры белковой глобулы [63], массы молекулы со-растворителя [64] или просто используя неявный со- растворитель с постоянной величиной времени затухания [65-67]. Подобные эксперименты в *in silico* системах в настоящее время не обладают большой информативностью, но такие подходы могут оказаться полезным дополнением к теоретическим исследованиям и в *in vitro* системах.

1.4. Молекулярные эффекты и механизмы воздействия природных осмолитов на белковые глобулы

Ответной реакцией на какой-либо вид стресса у живых организмов (термический, осмотический или химический) происходит накапливание осмолитов в высоких концентрациях. Осмолиты – это низкомолекулярные органические соединения, например, метиламины, аминокислоты или полиолы. Осмолиты необходимы живому организму, так как они помогают защищать белки в условиях стресса за счет стабилизации структуры белков [6]. В качестве примера можно привести данные о том, что высокие концентрации мочевины содержатся в тканях скатов и акул. Несмотря на то, что мочевина может привести к запуску процессов денатурации белков, фактором, сдерживающим запуск денатурирующих процессов в клетке, можно считать присутствие таких химических агентов как, саркозина и триметиламин N-оксида, которые предотвращают денатурирующее действие мочевины на белки [6,68-72]. Существуют работы, в которых показана способность сахарозы к избирательной способности стабилизации белковой глобулы в условиях экстремальных температурных значений [6,9].

Несмотря на то, что к настоящему времени существует обширное число научных публикаций, в которых показана способность природных осмолитов к защите пространственной структуры белковых молекул, до сих пор нет четкого представления и понимая о том, какие молекулярные эффекты и механизмы ответственны за эти процессы [6,69,73-76]. Кроме этого, довольно часто научные публикации, посвященные интерпретации обнаруженных защитных механизмов природных осмолитов содержат информацию, которая противоречит друг другу. Но, несмотря на это эффекты влияния природных осмолитов на белковые молекулы были установлены и определены [6,77].

Одним из установленных эффектов влияния осмолитов на белковые структуры является, то, что они могут смещать положение равновесия. При этом величина изменения положения равновесия напрямую зависит от добавляемой концентрации осмолита [6,78–81]. Например, имеются данные показывающие явное изменение положения равновесия с ростом концентрации сахарозы [6]. Помимо этого, эффекты исключенного объема, создаваемые присутствием в реакционной среде различных концентраций осмолитов, могут привести к изменению константы димеризации белка, например, показано что для α-химотрипсина при добавлении 0,15 М концентрации сахарозы константа димеризации возрастает в три раза [6,78]. Используя метод равновесной седиментации, было рассчитано изменение константы димеризации (K_2) в отсутствие осмолитов и кажущейся константы ассоциации ($K_{2,app}$) в присутствии осмолитов, для α-химотрипсина. Сравнение K_2 и $K_{2,app}$ позволило сделать вывод о том, что усиление димеризации α-химотрипсина происходит главным образом за счет эффектов молекулярного краудинга, создаваемого сахарозой. Таким образом, изменение константы димеризации α-химотрипсина имеет прямую зависимость от молярной концентрации сахарозы. [6,82].

Стабилизирующий эффекта глицерина на структуру креатинкиназы при варьировании температуры был установлен с использованием метода дифференциальной сканирующей калориметрии. Было показано, что в присутствии глицерина происходит увеличение величины температуры денатурации креатинкиназы, что положительно сказывается на устойчивости креатинкиназы при воздействии экстремальными температурам [6,83]. Глицерин не единственный природный осмолит, который способен защищать белки от денатурации, такой же способностью обладает, например, глюкоза [9]. Ранее было показано, что 1 М концентрация глюкозы способна защитить пространственную структуру феррицитохрома *c* от денатурации кислотой. В дополнение, феррицитохром *c* способен восстановить свою нативную структуру в присутствии глюкозы [6,84]. Показано, что увеличение размера, добавляемого в реакционную среду, осмолита приводит к более ярко выраженным стабилизирующим эффектам. Несмотря на то, что, в настоящее время, не удалось обнаружить согласования между экспериментальными и теоретическими данными стабилизирующего действия сахаров и глицерина на пространственную структуру белков, был сделан вывод о том, что эффекты молекулярного краудинга оказывают положительно влияние на стабилизацию пространственной структуры белков [6].

Для описания эффектов действия осмолитов на белки используются две гипотезы. Первая гипотеза основана на предположении, что добавление в реакционную среду осмолитов привод к эффектам исключенного объема, приводящим к изменениям в системе. Вторая гипотеза основана на том, что осмолиты связываются с белками, что приводит к описанным выше эффектам увеличения стабильности белковых молекул [6]. При этом, вполне логично, существование мнений о том, что этих двух гипотез недостаточного для полного и всеобъемлющего описания действия осмолитов на белковые структуры [6,85]. Несмотря на это, среди исследователей внутриклеточного поведения ферментативных реакций образовалось два лагеря единомышленников, которые придерживаются различных мнений о главенствующей роли внутриклеточной среды, на которую обязательно нужно обращать внимание. Для одних первостепенным является моделирование эффектов исключенного объема в присутствии структурированной осмолитами реакционной среде [6,74,82,86-92]. Для других первостепенным является моделирование процессов ведущих к изменению гидратации свободной энергии белковых молекул, что приводит к наблюдаемым изменения кинетики ферментативных реакций во внутриклеточных условиях [6,68-72,93-94]. Однако, стоит отметить, что скорее всего с точки зрения методологического подхода эти два подхода относительно главенствующей роли внутриклеточной среды, ведущей к изменению каталитической активности ферментов, ничем не отличаются [7,36,86,89].

1.5. Кооперативные эффекты в ферментативных реакциях

Кооперативные взаимодействия в биологических системах являются неотъемлемым следствием динамической природы макромолекулярных ансамблей. Структурные изменения, которые сопровождают связывание с лигандами, обеспечивают механизм для дальнейшей связи между удаленными областями белковой макромолекулы. Кооперативность ферментов представляет собой проявление этой коммуникационной сети. Возможно, наиболее часто встречающаяся форма кооперативности может быть представлена в виде термодинамических изменений при связывании лиганда с ферментов, где предшествующая ассоциация лиганда изменяет сродство последующего события связывания [95-97]. Ассоциация кислорода с тетрамерным гемоглобином служит прототипом примера термодинамической кооперативности [97-98]. Другая форма кооперативности — кинетическая, может наблюдаться в случае исследования кинетических реакций аллостерических ферментов, в которых ассоциация лиганда происходит в центре связывания, отличном от активного центра, что в свою очередь влияет на скорость трансформации субстрата [99,100]. Аспартат-карбамоилтрансфераза является классическим примером кинетических кооперативных эффектов внутри ферментативной системы при аллостерических взаимодействия [101]. В случае аспартат-карбамоилтрансферазы, упомянутая выше, кооперативность заключается во множественности связывании лиганда различными сайтами связывания, зачастую эти сайты связывания находятся на отдельных мономерных звеньях фермента, которые формируют структуры более высокого порядка. Однако, важно отметить, что эффекты кооперативности также могут возникать в случае отсутствия нескольких сайтов связывания в структуре фермента и без формирования его макромолекулярной олигомеризации [97,102-106]. При этом, существуют работы, в которых утверждается что эффекты кооперативности внутри ферментативной системы крайне редко наблюдаются для мономерных ферментов с одиночными лиганд-связывающими сайтами, кинетика которых не подчиняющихся классическим представлениям теории Михаэлис-Ментен [104-107].

Наиболее изученным примером кинетической кооперативности в ферментативных системах является глюкокиназа человека — фермент, который играет ключевую роль в поддержании постоянного уровня глюкозы в организме [108]. Глюкокиназа представляет собой мономерный фермент, который содержит один сайт связывания с глюкозой. Повышение концентрации глюкозы приводит к сигмоидальному изменению кинетики ферментативной реакции глюкокиназы, что свидетельствует о положительной кооперации [109,110]. Физиологическое значение этого фермента, как основного датчика содержания глюкозы в организме, привело к разнообразным структурным и механистическим исследованиям глюкокиназы в последнее десятилетие. Огромное количество проведенных ранее исследований глюкокиназы позволило сделать данный фермент модельной системой для понимания принципов кооперативности в мономерных ферментативных системах.

1.5.1. Классификация и количественная оценка кооперативности

Кооперативность может влиять на термодинамические или кинетические свойства биологической системы. Термодинамические эффекты кооперативности обычно наблюдаются в виде изменения аффинности связывания лиганда, обусловленной присутствием дополнительного лиганда, который занимает структурно отличающийся сайт связывания [95,96]. Кинетическая кооперативность, напротив, наблюдается в виде отклонения от гиперболической кинетики стационарной реакции ферментативного процесса [99]. Кооперативность в мономерных ферментах с одиночными лиганд-связывающими сайтами является исключительно кинетической по происхождению. Следовательно, уравнение Михаэлиса-Ментен, недостаточно для описания зависимости скорости ферментативной реакции от изменяющейся концентрации субстрата. Таким образом, необходимы новые математические методы для описания скорости реакции мономерных ферментов с одним сайтом связывания, которым свойственны эффекты кооперативности [97].

В принципе, кинетическая кооперативность в мономерных ферментах может быть представлена с помощью модификации широко используемых моделей, первоначально разработанных для изучения баланса кооперативности в олигомерных системах. Тем не менее, наиболее часто используемый подход заключается в изменении уравнения Михаэлиса-Ментен на формулировки, предложенной Арчибальдом Хиллом [111]. В этом подходе степень кооперативности отражается значением коэффициента Хилла (n). Когда значение n = 1, система классифицируется как некооперативная и формализм Хилла упрощает стандартное уравнение Михаэлиса-Ментен. Когда n < 1, система имеет отрицательную кооперативность (наблюдается субстратное ингибирование, приводящее к уменьшению скорости ферментативной реакции), и когда n > 1, система имеет положительный кооперативный эффект (связывание с субстратом ведет к увеличению скорости ферментативной реакции). Если формализм Хилла используется для описания системы, которой свойственна термодинамическая кооперативность, как , например, в случае связывания кислорода с гемоглобином, n имеет максимальное значение, равное количеству лиганд-связывающих сайтов присутствующих в макромолекулярном ансамбле [111,112]. При этом, стоит еще раз напомнить, что коэффициент Хилла не имеет целочисленного значения в случаях описания эффектов кооперативности мономерного фермента с одним лиганд-связывающим сайтом. В данном случае, он просто служит удобной мерой относительной величины кооперативного эффекта [97].

1.6. Индивидуальные характеристики моноферментных реакций, входящих в состав биферментной и триферментной систем, и их каталитическая активность в вязких средах

1.6.1. Характеристика сопряженной биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза

Биферментная НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза система представляет из себя сопряженную систему, выделенную из биолюминесцентных бактерий, которая катализируется НАДН:ФМН-оксидоредуктазой (Р) и люциферазой (Л), соответственно. Схема катализируемой реакции представлена ниже:

$$\text{НАДН} + \text{ФМН} + \text{H}^+ \xrightarrow{\textit{НАДН:ФМН-оксидоредуктаза}} \text{НАД}^+ + \text{ФМН}\cdot\text{H}_2 \qquad (7)$$

$$\text{ФМН}\cdot H_2 + RCHO + O_2 \xrightarrow{\textit{люцифераза}} \text{ФМН} + RCOOH + H_2O + h\nu \qquad (8)$$

В результате первой реакции, катализируемой Р, происходит восстановление ФМН с помощью восстанавливающего реагента НАДН (схема 7). Формально процесс выглядит как присоединение водорода. Однако в таком полярном растворителе, как вода, перенос водорода складывается из переноса протона и электрона: $H = e^- + H^+$. При этом НАДН переходит в НАД$^+$, передавая молекуле ФМН протон и два электрона с образованием ФМН·Н$^-$ (депротонированнная форма восстановленного флавина) [113]. В водных растворах при нейтральных значениях pH восстановленный флавин на 90% состоит из депротонированной формы и только на 10% из ФМН·H_2, который образуется в результате отрыва протона от подходящего донора, например, воды. С помощью этой реакции в системе на протяжении довольно большого интервала времени происходит постоянная наработка ФМН·H_2, в результате чего поддерживается постоянное (стационарное) свечение. Вторая реакция, катализируемая люциферазой, является биолюминесцентной. В этой реакции восстановленный флавин и алифатический альдегид окисляются кислородом. В результате реакции образуется окисленная форма флавина, жирная кислота, а также испускается квант света. В связи с этим, бактерии имеют специальные ферментативные системы, способствующие восстановлению ФМН и карбоновой кислоты исключительно для нужд биолюминесценции. Считается, что восстановление ФМН в бактериальных клетках происходит в реакции, катализируемой НАДН:ФМН-оксидоредуктазой. Флавинмононуклеотид (ФМН или рибофлавин фосфат) является одним из двух коферментов, один кофермент является производным от рибофлавина (витамин В2), другой флавинадениндинуклеотида (ФАД). Соответственно, у светящихся бактерий восстановленный ФМН (ФМН·H_2) является важнейшим компонентом для осуществления люминесцентной реакции [13]. Известно, что флавины широко используются в качестве кофакторов в ферментативных реакциях. Функциональная часть флавиновой молекулы изоаллоксазиновое кольцо, связывает два электрона в качестве акцептора. Ферменты, которые используют флавин в качестве кофактора, называются флавопротеины, они могут непосредственно реагировать с кислородом. Таким образом, некоторые флавопротеины классифицируют, как оксидазы [14,114-115].

Большое количество работ посвященных исследованию механизмов взаимодействия субстратов и продуктов биолюминесцентной реакции с молекулой люциферазы, а также действию различных модификаторов на ее активность позволило получить информацию о функциональной топографии молекулы люциферазы. По структуре люциферазы из четырех основных видов светящихся бактерий (*Vibrio harveyi, Photobacterium leiognathi, Photobacterium fisheri, Photobacterium phosphoreum*) представляют собой αβ -гетеродимер с молекулярной массой около 80000 Да (рисунок 1.2.).

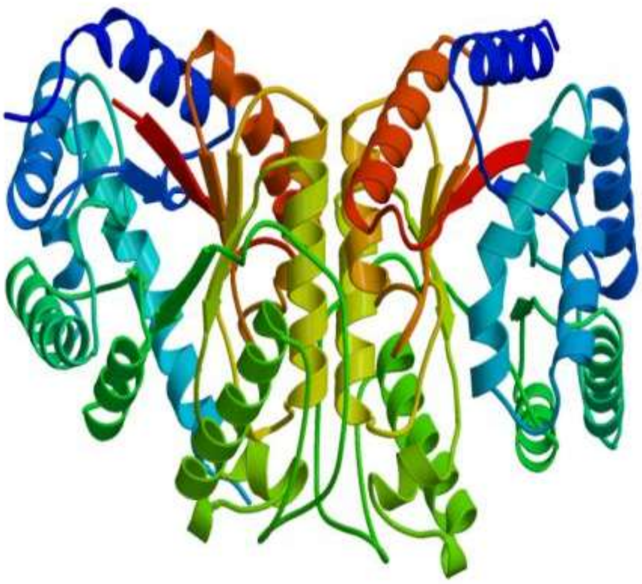


Рисунок 1.2. — Пространственная структура бактериальной люциферазы *Vibrio harveyi*. Воспроизведено из [116]

Все бактериальные люциферазы состоят из двух не идентичных субъединиц: α и β, 40-44 кДа и 35-40 кДа, соответственно, с 30% гомологией как между α - и β-субъединицами, так и среди люцифераз из различных видов бактерий. Предполагается, что активный центр расположен преимущественно на α-субъединице. β-субъединица, в свою очередь, необходима для активации акта люминесценции и также она отвечает за термостабильность фермента и его взаимодействие с восстановленным флавином [13-14,116].

В настоящее время определена кристаллическая структура люциферазы *V.harveyi*, замороженной при температуре t = -160°C в метиловом эфире полиэтиленгликоля, с разрешением 2.4Å и 1.5Å. Молекула люциферазы имеет вид параллелепипеда с размерами 75x45x40. Обе субъединицы складываются в однодоменный (α/β)8-бочонок [116-117]. Такая структура люциферазы ранее была корректно предсказана на основе структуры luxF и трехмерной модели α-субъединицы бактериальной люциферазы. α- и β-субъединицы имеют идентичную топологию. Две субъединицы связаны большой соприкасающейся поверхностью, центр которой занят структурой, представляющей собой параллельно связанный спиральный пучок. В центре пучка – парные псевдооси вращения, связывающие α и β-субъединицы (рисунок 1.2.). Спирали α_2 и α_3 каждой субъединицы из спирального пучка с двумя α_2 спиралями, очень плотно упакованы. Спиральные оси на 6.05Å в стороне от наиболее плотной точки имеют перекрестный 30^o угол. Оси пучков α- и β-субъединиц связаны вращением на 80^o и смещением на 34^o [116-117].

Согласно литературным данным, люциферазы бактерий содержат в своей аминокислотной последовательности от 7-8 остатков триптофана. Из них пять остатков являются строго консервативными и присутствую во всех видах бактериальных люцифераз: три на α-субъединице (в положении 194, 250, 277), два на β-субъединице (182, 194). Trp40 и Trp182 на α-субъединице также консервативны, что характерно для всех люцифераз кроме люцифераз из одного штамма — *Photobacterium leognathi*. Люциферазы бактерий рода *Photobacterium leognathi* в целом отличаются от других люцифераз отсутствием в составе α-субъединицы Trp131 [118]. Спектр флуоресценции бактериальной люциферазы имеет максимум при длине волны 330 нм [119].

Несмотря на проведенные исследования кристаллической структуры бактериальной люциферазы *Vibrio harveyi*, до сих пор остается нерешенным вопрос связанный с механизмом переноса, восстановленного флавина ФМН·H_2

между НАДН:ФМН-оксидоредуктазой и бактериальной люциферазой. Существуют косвенные свидетельства, как независимой работы этих ферментов, так и образования прочного комплекса между ними [14,114-115]. Так, в работах, предполагающих существование промежуточного комплекса между НАДН:ФМН-оксидоредуктазой и бактериальной люциферазой, доказывается возможность существования близкого расположения генов, которые кодируют белки, способствующие восстановлению альдегида и люциферазы. Такое последовательное положение кодируемых белков позволяют не нарушать эффективность образования альдегидного комплекса, который необходим бактериальной люциферазе для обеспечения непрерывного свечения бактерий [5,13-14,120-121]. Недавно, метод молекулярного докинга был использован для изучения возможности образования промежуточного комплекса между бактериальной люциферазой и НАДН:ФМН-оксидоредуктазой. В проведенном авторами исследовании было проведена регистрация величины электростатического взаимодействия между пространственными структурами двух этих ферментов для того, чтобы оценить количество взаимовыгодных положений между молекулами НАДН:ФМН-оксидоредуктазы и люциферазы, и сделать вывод о возможности существовании промежуточного комплекса между ферментами. Результаты исследования показали отсутствие какой-либо специфичности между кристаллическими структурами бактериальной люциферазы и НАДН:ФМН-оксидоредуктазы *Vibrio harveyi* на основе их электростатического взаимодействия. При этом, авторы отдельно обращают внимание на то, что математическое моделирование предсказало существование конфигурации, в которой возможна прямая передача восстановленного $ФМН \cdot H_2$ между активными центрами оксидоредуктазы и люциферазы [14].

1.6.2. Влияние осмолитов и краудинг-агентов на кинетические характеристики бактериальной люциферазы

Ранее было проведено исследование по влиянию различных природных осмолитов и краудинг агентов на кинетические характеристики двух видов люцифераз светящихся бактерий *Photobacterium leiognathi* и *Vibrio harveyi*. В качестве со-растворителей были использованы: ацетонитрил, ацетон, этанол, метанол, формамид, диметилсульфоксид (ДМСО), глицерин и этиленгликоль. Было установлено, что все используемые со-растворители ингибируют каталитическую активность двух видов исследуемых люцифераз. Кроме того, было экспериментальнo показано, что зависимость интенсивности свечения люцифераз от концентрации вязких агентов имеет вид колоколообразной кривой (рисунок 1.3.).

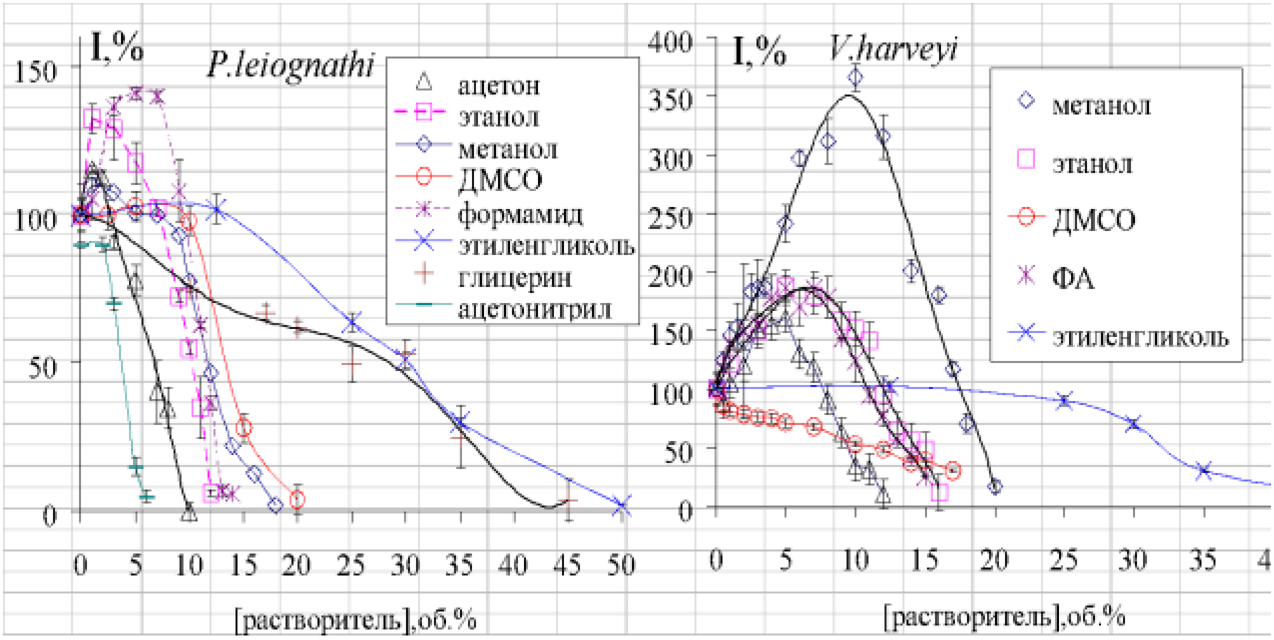


Рисунок 1.3. — Зависимость интенсивности свечения реакции люцифераз *P.leiognathi* и *V.harveyi* от концентрации вязких агентов, выраженной в объемных процентах. Воспроизведено из [5].

Для описания полученных кривых зависимостей от концентрации используемых вязких агентов, автором, были введены следующие параметры: C_a - концентрация вязкого агента, при которой наблюдается максимальная активация интенсивности свечения; $C_{кр}$ - диапазон концентраций вязкого агента, в котором происходит увеличение начальной скорости реакции; C_{50} - пороговая концентрация вязкого агента, при которой происходит потеря половины ферментативной активности бактериальной люциферазы.

Из рисунка 1.3. видно, что добавление в реакционную смесь концентраций вязких агентов от 1 до 10 об. % приводит к активации интенсивности свечения светоизлучения люциферазы *V.harveyi*, при концентрациях больше 10 % вязкие агенты вызывают незначительную активацию интенсивности свечения *V.harveyi*. Противоположная зависимость влияния вязких агентов наблюдается в присутствии *Photobacterium leiognathi*. Как видно из рисунка 1.3., даже небольшие добавляемые концентрации вязких агентов (от 1% до 5%) приводят к монотонному уменьшению интенсивности светоизлучения *Photobacterium leiognathi*. Также стоит отметить, что добавление концентраций вязких агентов больше 10% приводит к ингибированию кинетических параметров люциферазы *Photobacterium leiognathi* на 50% и более. В случае с люциферазой *V.harveyi* такой картины не наблюдалось. Исходя из полученного результата, автором работы был сделан вывод о том, что люцифераза *V.harveyi* является менее чувствительной к воздействию исследуемых вязких агентов, чем люцифераза *Photobacterium leiognathi*.

В дополнении к вышеописанному, автором исследования было проведено исследование влияния вязких агентов на кинетические параметры биолюминесцентной реакции, такие как константа спада светоизлучения (k_{dec}) и изменение квантового выхода (Q) в присутствии вязких агентов. Было установлено, что величина k_{dec} для люцифераз *V.harveyi* и *Photobacterium leiognathi* не изменяется в исследованном диапазоне концентраций вязких агентов, которые приводят к активации интенсивности свечения люцифераз, и не претерпевает резких изменений при введении пороговых концентраций вязких агентов, приводящих к ингибированию интенсивности свечения исследуемых люцифераз. Необходимо отметить, что полученные изменения константы спада светоизлучения люциферазы *V.harveyi* зависят от природы используемого вязкого агента. Например, k_{dec} светоизлучения уменьшается в ацетоне, но не изменяется или растет в спиртах. Изменения константы спада биолюминесценции люциферазы *Photobacterium leiognathi* определяются длиной цепи используемого альдегида, а не природой или концентрацией исследуемых вязких агентов.

Относительно величины Q биолюминесцентной реакции, автором было показано, что квантовый выход люциферазы *P.leiognathi* в присутствии различных вязких агентов определяется изменением начальной скорости реакции и слабо зависит от константы спада реакции. Квантовый выход биолюминесцентной реакции, катализируемой люциферазой *V.harveyi* зависит как от начальной скорости реакции, так и от константы спада.

Изменение константы Михаэлиса-Ментен ($К_м$) по альдегиду, являющимся одним из субстратов биолюминесцентной реакции, для люцифераз *V.harveyi* и *P.leiognathi* в присутствии вязких агентов зависит от длины цепи используемого в исследовании альдегида. Исходя из полученных результатов, автор делает вывод о том, что при использовании тетрадеканаля ($С_{14}$) изменения значения $К_м$ связаны с вкладом гидрофобных взаимодействий между люциферазой и альдегидными субстратами, в то время как, при использовании $С_{12}$ и $С_{10}$ основной вклад в изменение кинетических параметров, исследуемых биолюминесцентных систем, вносят электростатические взаимодействия.

Следует отметить то, что автор исследования отмечает, что степень влияния вязких агентов на кинетические характеристики исследуемых люцифераз помимо типа используемого субстрата определяется типом взаимодействия между вязким агентом и люциферазой. Так, вязкие агенты, добавление которых в реакционную среду приводит к активации интенсивности свечения люциферазы являются неконкурентными активаторами по отношению к $С_{14}$, а вязкие агенты, ингибирующие интенсивность излучения люцифераз являются конкурентными ингибиторами [5].

Стоит отметить, что описанные выше результаты влияния вязких агентов на кинетические характеристики двух видов люцифераз *V.harveyi* и *Photobacterium leiognathi* были проведены автором без варьирования температурного диапазона.

1.6.3. Структурные характеристики лактатдегидрогеназы

Фермент лактатдегидрогеназа (ЕС 1.1.1.27, ЛДГ) является одним из ключевых ферментов клеточного гликолиза, который участвует в регуляции сложно управляемого и высокоорганизованного анаэробного гликолиза. ЛДГ является цитоплазматическим ферментом, который обратимо катализирует восстановление пировиноградной кислоты в молочную кислоту:

$$\text{НАД}^{+} + \text{лактат} \xrightleftharpoons{\text{лактатдегидрогеназа}} \text{НАДН} + \text{пируват} \qquad (9)$$

Равновесие представленной на схеме 9 реакции обычно сдвинуто в сторону образования лактата. Стоит отметить, что ЛДГ способна формировать до 15 изомеров [122]. Несмотря на то, что первые образцы очищенной молекулы ЛДГ были получены в 1940 г., лишь в 1964 году были получены данные, подтверждающие то, что с точки зрения пространственной организации ЛДГ является тетромером с молекулярной массой 140 кДа (Рисунок 1.4.) [123-124].

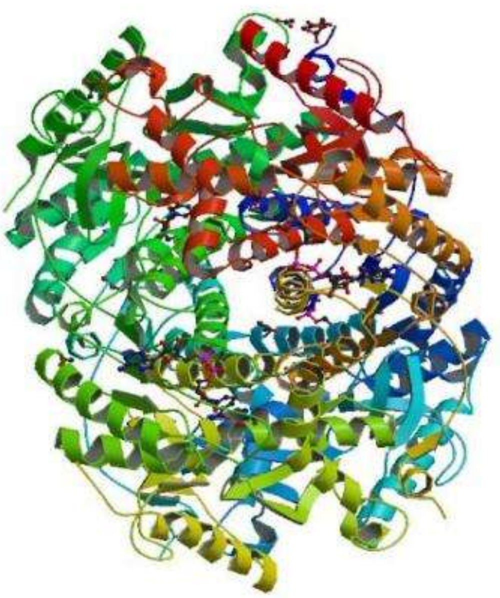


Рисунок 1.4. — Кристаллическая структура лактатдегидрогеназы из мышц кролика в комплексе с НАДН и оксаматом. Воспроизведено из [125].

Имеются данные о том, что ЛДГ была обнаружена в цитоплазме как высших организмов, так и простейших - грибы, крабы, бактерии. Зачастую высвобождение ЛДГ во внутриклеточную среду происходит за счет разрушения клеток гомогенизатором или когда они испытывают осмотический шок. Существуют данные, показывающие, что лактатдегидрогеназа из *E.coli* и других микроорганизмов может быть активирована путем добавления пирувата или нуклеотидтрифосфата [123].

Пространственная структура ЛДГ состоит из 329 аминокислотных остатка. Все полученные кристаллические структуры ЛДГ, выделенные из разных тканей организма, имеют различные N- и C-концевые последовательности (со 128 по 130 аминокислотный остаток), но, несмотря на это они характеризуются высокой степенью гомологичности. Однако существуют и исключения, так аминокислотные остатки с 298 до 315 у ЛДГ свиньи H4 значительно отличаются от такой же последовательности аминокислотных остатков ЛДГ морской акулы. В дополнении, ЛДГ сердечной мышцы может иметь один дополнительный аминокислотный остаток на C-конце по сравнению с ЛДГ мышечной ткани. Также, для всех ЛДГ было выявлено, что они не содержат дисульфидных мостиков и каких-либо металлов.

Структурные субъединицы ЛДГ можно описать с помощью соответствующего деления на: а) концевое плечо аминокислотных остатков; б) части, с которой связывается кофермент; в) часть, содержащая каталитически важные аминокислотные остатки. Часть (б) можно также разделить на два мононуклеотид-связывающих домена (B_1 и B_2), такое разделение справедливо для большинства полученных и изученных кристаллических структур ЛДГ. Часть (в) также обычно подразделяется на два домена. Интересной особенностью каждой субъединицы ЛДГ является 20 аминокислотных остатков на N-конце, которые простираются от основного «тела» субъединицы. Это концевое плечо имеет важную роль во взаимодействии между субъединицами. Считается, что ключевая роль домена B_l состоит в связывании молекулы АМФ, а домена B_2 в связывании молекулы НАД$^+$. Мобильная петля ЛДГ расположена на домене B_2, и основная задача этой мобильной петли состоит в связывании пирофосфатной части кофермента в активном центре ЛДГ. При этом стоит отметить, что при связывании кофермента с молекулой ЛДГ происходит изменение пространственной структуры ЛДГ для формирования правильной конформации белковой глобулы, необходимой для акта ферментативного катализа. В формировании этой «правильной пространственной структуры» участвуют аминокислотные остатки аспартат-53 и тирозин-85. Сайт связывания с субстратом находится ближе к центру домена B_2, между сайтом связывания с коферментом - $НАД^+$ и аминокислотным остатком гистидин 195. Стоит отметить, что гистидин 195 наряду с аргинином 109 и 171 необходимы для того, чтобы предоставить партнера для обмена зарядами в ионной паре. У активного центра связывания ЛДГ с субстратом также имеется мобильная петля, которая защищает активный центр от растворителей и удерживает в активном центре заряженные аминокислотные остатки аргинин-109, аргинин-171, гистидин-195, глутамат-107, глутамат-140 и аспартат-168, которые необходимы для активации акта ферментативного катализа [123,126].

Температурный оптимум ЛДГ составляет 37°С. При изучении кинетики термоинактивации ЛДГ, было показано, что при увеличении температуры до 45°С происходит начальный этап инактивация фермента, а при температуре выше 56°С, ЛДГ полностью инактивируется за 15 мин. Также было показано, что процесс температурной инактивации мышечной ЛДГ кролика является полностью необратимым. При этом ренатурация ЛДГ не происходила даже когда авторы исследования медленно охлаждали инактивированную ЛДГ до 4°С в течение 24 часов. Отдельно стоит отметить, что, сравнивая константы скорости инактивации свободного фермента и связанного фермент-субстратного комплекса, при разных температурах, было получено, что константа скорости инактивации свободного ЛДГ намного больше, чем константа скорости инактивации ЛДГ со связанным субстратом. Эти результаты указывают на то, что связь с субстратом приводит к появлению защитных эффектов ЛДГ во время температурной инактивации [127]. Скорее всего, механизм такой защиты заключается в том, что субстрат может связываться с субстрат-связывающими группами, расположенными в активном сайте фермента, что приводит к увеличению конформационной стабильности активного сайта фермента [128-129].

1.6.4. Влияние природных осмолитов на кинетические характеристики лактатдегидрогеназы

Ранее было проведено исследование влияния вязких агентов на кинетические характеристики ЛДГ, выделенной из свиных скелетных мышц. В качестве вязких агентов были использованы различные концентрации глицерина (от 0 до 63%), сахарозы (от 0 до 40%) и этиленгликоль. Значения вязкости реакционной среды при этом варьировались от 0,89 сП до 10,2 сП и 7,1 сП соответственно. Авторами исследования было установлено, что уменьшение кинетической активности ЛДГ в присутствии, в реакционной среде, вязких агентов носит концентрационную зависимость, т.е. активность ЛДГ уменьшается при увеличении добавляемых в систему концентраций вязких агентов (рисунок 1.5.).

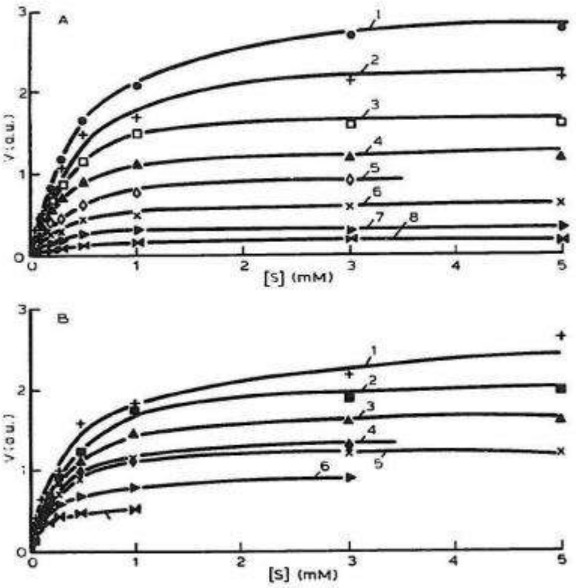


Рисунок 1.5. — Зависимость скорости ферментативной реакции, катализируемой лактатдегидрогеназой, от концентрации субстрата в присутствии вязких агентов различной концентрации: А – глицерин: 1 - контроль, 2 - 17%, 3 - 25%, 4 - 33%, 5 - 41%, 6 - 48%, 7 - 55%, 8 - 63%; В - сахароза: 1 - контроль, 2 - 8,6%, 3 - 17%, 4 - 24%, 5 - 31%, 6 - 37%, 7 - 43%. Воспроизведено из [130].

Помимо этого, авторы отмечали уменьшение величины максимальной скорости ферментативной реакции (V_{max}) с 3,26 относительных единиц активности в буфере (при вязкости реакционной среды η = 0,89 сП) до 2,26 относительных единиц активности при добавлении 30% раствора этиленгликоля (вязкость реакционной среды η = 1,54 сП) и до 1,32 относительных единиц активности при добавлении 50% раствора этиленгликоля (вязкость реакционной среды η = 3,31 сП). Исходя из полученных данных о уменьшении каталитической активности ЛДГ авторами был сделан вывод о том, что незначительное изменение вязкости реакционной среды с 0,89 сП до 1,54 сП приводит к уменьшению величины V_{max} в 1,5 раза. Ингибирование каталитической активности ЛДГ, в присутствии вязких агентов, сохраняется при проведении обратной реакции, в которой происходит окисление лактата, а $НАД^{+}$ является кофактором. Значение величины V_{max} в присутствии 44% сахарозы и 63% глицерина уменьшается до 1,5 относительных единиц активности и 1,3 относительных единиц активности, соответственно. В то время, как величина V_{max} в буфере равна 8,5 относительных единиц активности. Наличие одинаковых эффектов воздействия различных вязких агентов - глицерина, сахарозы и этиленгликоля, на кинетические характеристики ЛДГ и отсутствие корреляций между наблюдаемыми эффектами с таким характеристиками среды, как гидрофобность и диэлектрическая проницаемость, позволило авторам исследования предположить, что вязкость реакционной среды является ключевым фактором, который приводит к ингибированию кинетической активности ЛДГ. Кроме этого, авторы отдельно подчеркивают, что уменьшение активности ЛДГ в присутствии глицерина, сахарозы и этиленгликоля не может быть связано с необратимой инактивацией фермента, так как наблюдаемый эффект полностью обратим. Другими словами, если вязкие агенты заменить на буфер - наблюдается увеличение активности ЛДГ. Присутствие вязких агентов в реакционной смеси уменьшают константу Михаэлиса-Ментен ($К_м$). Так авторами было экспериментально установлено уменьшение $К_м$ в пять раз с 0,1 мМ до 0,02 мМ в присутствии глицерина и сахарозы для прямой реакции с 20 мМ до 2-5 мМ для обратной реакции, катализируемой ЛДГ.

Авторами было сделано предположение, что наблюдаемые эффекты уменьшения активности ЛДГ связаны с изменениями пространственной структуры фермента, которые имеют место быть. Измерение спектров ЛДГ с помощью методов кругового дихроизма и определение времени релаксации молекулы, в присутствии используемых вязких агентов, показало, что присутствие вязких агентов не приводит к изменению пространственной структуры исследуемого фермента. Популярное предположение, основанное на теории Крамерса, о том, что в присутствии вязких агентов наблюдается осложнение диффузии реагирующих веществ, что в свою очередь, ведет к изменению кинетической активности фермента, было отброшено авторами исследования исходя из следующих соображений. Авторы наблюдали слабую зависимость между величинами $K_м$ и k_{cat}, при этом оба эти параметра, с учетом погрешности измерения, имели одинаковую величину в присутствии различных концентраций вязких агентов в реакционной смеси. Одним из возможных объяснений наблюдаемых эффектов, с точки зрения авторов, была гипотеза, выдвинутая Хоффмейстером о том, что присутствие вязких агентов приводит к изменению соотношения аффиности фермента к субстратам реакции и гидратации молекулы фермента, необходимой для связывания фермента с субстратом. Исходя из этой гипотезы, присутствие вязких влияет на степень гидратации ЛДГ, что в свою очередь приводит к изменению величины необходимой энергии для связывания фермента с субстратом в активном центре для инициализации акта ферментативного катализа. С помощью этой гипотезы также можно объяснить упомянутое выше наблюдение о том, что, если вязкие агенты заменить на буфер в системе наблюдается увеличение активности ЛДГ, соответственно величина $K_м$ перестает уменьшаться [130].

Несмотря на высокую ценность полученных результатов, стоит отметить, что авторами не было исследована активность ЛДГ в присутствии вязких агентов при варьировании температурного диапазона.

1.7. Исследование эффективности работы биферментной системы: НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза

Ранее группой авторов был поставлен вопрос о исследовании эффективности работы сопряженной биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза [132]. Интерес к исследованию данного вопроса был связан с тем, что биферментная биолюминесцентная система показала свою широкую возможность применения в экологии, медицине и анализе различных метаболитов [132-134]. В проведенной работе, авторы исследования оценивали эффективность работы сопряженной биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза по введенному ими параметру — f, который представлял собой количество квантов, которое испускается в результате работы ферментов в расчете на одну молекулу НАДН. Математически эффективность работы биферментной системы была представлена в виде:

$$i = f * (d[НАДН]/dt) \qquad (10)$$

, где i – это величина интенсивности свечения биферментной НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза системы, f – величина эффективности работы сопряженной биферментной системы, d[НАДН]/dt – величина расходования НАДН в системе за промежуток времени.

Авторами работы было показано, что величина эффективности работы сопряженной биферментной НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза системы не зависит от содержания НАДН:ФМН-оксидоредуктазы в исследуемой реакционной смеси и концентрации НАДН. Наибольший вклад в величину эффективности работы сопряженной биферментной системы вносят концентрация люциферазы и скорость не ферментативного окисления $FMNH_2$ кислородом (рисунок 1.6) [131]. Также, в работе был проведен модельный эксперимент влияния различных концентраций бычьего сывороточного альбумина на величину эффективности работы сопряженной биферментной системы. Сделано это было исходя из соображений, что биферментная НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза система активно используется для анализа различных биологических жидкостей [132].

(а) (б)

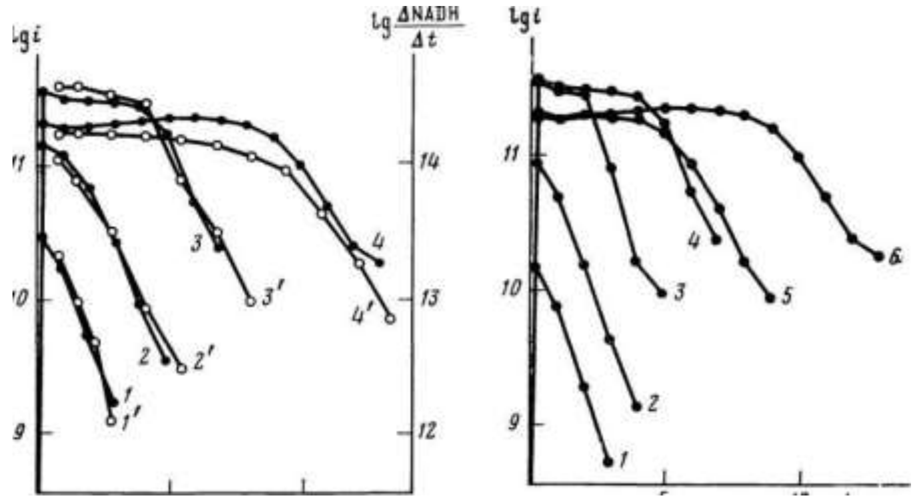


Рисунок 1.6. — Сравнение кривых интенсивности биолюминесценции биферментной системы (*i*, квант•моль$^{-1}$, 1—4) и скорости потребления NADH (dNADH/dt, моль•мин$^{-1}$, 1'—4'). (а) Реакционная смесь объемом 1 мл содержала: 1, 1' —6 мЕ редуктазы, 2,1*10^{-6} М НАДН; 2, 2' — 6 мЕ, редуктазы 1,5*10^{-5} М НАДН; 3, 3' – 12 мЕ редуктазы, 1,0*10^{-4} М НАДН; 4, 4' 6 мЕ редуктазы, 1,0*10^{-4} М НАДН; (б) Кинетика биолюминесценции биферментной системы при различных концентрациях редуктазы и НАДН в реакционной смеси. 1 — 6 мЕ редуктазы, 1,1*10^{-6} М НАДН; 2 — 6 мЕ редуктазы, 7,5*10^{-6} М НАДН; 3 — 12 мЕ редуктазы, 5,2*10^{-5} М НАДН; 4— 12 мЕ редуктазы, 1,0*10^{-4} М НАДН; 5 — 6 мЕ редуктазы, 5,2*10^{-5} М НАДН; 6 – 6мЕ редуктазы, 1,0*10^{-4} М НАДН. Значение f для всех кривых равно 1,1*10^{-3}. Воспроизведено из [131].

Следовательно, наличие посторонних белков в таких жидкостях должно влиять на кинетические параметры биолюминесцентной биферментной системы. Было показано, что при увеличении добавляемых в реакционную среду концентраций бычьего сывороточного альбумина, в диапазоне от 0 до 0,1 мг/мл, величина эффективности работы биферментной биолюминесцентной системы возросла в 2 раза. При этом, при увеличении добавляемых концентраций альбумина, в диапазоне 0,1—0,3 мг/мл, наблюдалось снижение величины эффективности работы системы (рисунок 1.7) [131].

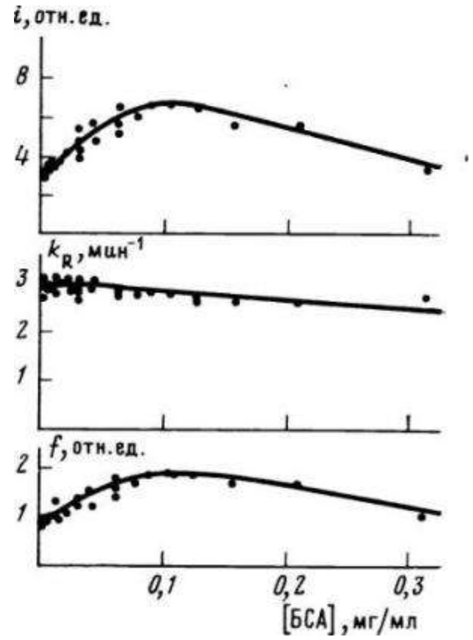


Рисунок 1.7. — Влияние бычьего сывороточного альбумина на кинетические характеристики биферментной системы: i— максимальную интенсивность биолюминесценции; k_R — константу спада биолюминесценции; f — эффективность работы системы. Воспроизведено из [131].

В ходе проделанной работы было установлено несколько способов повышения эффективности работы биферментной НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза системы: 1) замена свободного флавина на флавопротеин, для уменьшения скорости не ферментативного окисления $ФМНН_2$ кислородом 2) помещение НАДН:ФМН-оксидоредуктазы и люциферазы в гетерогенные среды, для создания условий ведущих к образованию мультиферментного комплекса, в котором $ФМНН_2$ передается непосредственно с НАДН:ФМН-оксидоредуктазы на люциферазу; 3) повышение концентрации люциферазы в реакционной смеси для увеличения интенсивности свечения [131].

1.8. Возможность построения полиферментных цепей сопряженных с бактериальной люциферазой

В настоящее время, методы исследования, основанные на использовании явлений хемилюминесценции и биолюминесценции, имеют широкие возможности применения, как в аналитических методах анализа, так и для проведения фундаментальных исследований. Одним из наиболее перспективных путей применения биолюминесценции, необходимым для современного этапа развития клеточной и молекулярной биологии, является способность измерение метаболитов ферментативных реакций путем сопряжения ферментов с люциферазной системой светящихся бактерий [135]. Эта возможность построения сопряженных полиферментных систем играет огромную ценность для исследования внутриклеточного поведения ферментов, в виду того, что ферменты внутри живой клетки функционируют в виде сопряженных полиферментных систем, что, конечно, не является чем-то новым [136]. Как указано на схемах 7-8, реакция свечения бактерий сопровождается с использование восстановленной формы НАДН, через НАДН:ФМН-оксидоредуктазу. Учитывая этот факт, можно сделать вывод, что с ферментативной системой светящихся бактерий могут быть сопряжены различные реакции, в которых происходит восстановление или окисление таких молекул, как ФМН(H_2), НАД(Н), НАДФ(Н). Таким образом, сопряженные мультиферментные системы, с участием различных дегидрогеназ, с ферментами бактериальной биолюминесценции могут быть использованы в аналитических целях для клинической диагностики, пищевой индустрии, оценки качества окружающей среды и так далее [135,15-16].

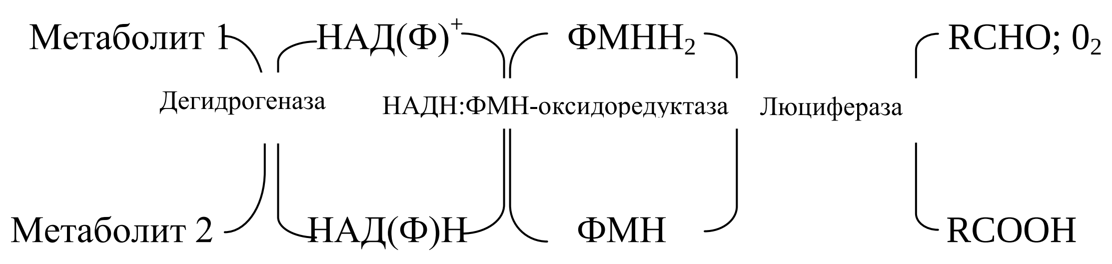


Рисунок 1.8. — Общая схема сопряжения бактериальной люциферазы с различными дегидрогеназами. Воспроизведено из [137].

Способ построения мультиферментных систем, сопряженных с бактериальной люциферазой, графически может быть изображен в виде следующей схемы, представленной на рисунке 1.8. В таблице 1.2. приведены примеры сконструированных и использованных цепей сопряжения различных $НАД^{+}$-зависимых ферментов с сопряженной биферментной системой светящихся бактериальной для аналитических целей.

Таблица 1.2. — Список ферментов, активность которых была определена биолюминесцентным методом, путем их сопряжения с биферментной системой НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза. Воспроизведено из [137].

Фермент
3-Оксибутиратдегидрогеназа
Аланинаминотрансфераза
Алкогольдегидрогеназа
Аспартатаминотрансфераза
Гексокиназа
Гликогенфосфорилаза
Глицериндегидрогеназа
Глутаматдегидрогеназа
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
Изоцитратдегидрогеназа
Креатинкиназа
Лактатдегидрогеназа
Малатдегидрогеназа
Моноаминооксидаза
Протеазы (трипсин, пепсин, химотрипсин)
Сорбит дегидрогеназа
Фенолоксидаза
Фумаратгидратаза

Все перечисленные в таблице 1.2. биолюминесцентные сопряженные системы обладают высокой чувствительность и специфичностью. Хотя по чувствительности они часто уступают методам, использующимся для анализа люциферин-люциферазной системы светляков, они почти не пересекаются с областью применения этой аналитической системы [16,137]. Конструирование сложных систем для измерения концентраций различных метаболитов возможно только после изучения закономерности работы сложных цепей сопряжения ферментов, таких, как зависимость параметров системы от концентрации каждого фермента и их субстратов, возможности перехода системы в стационарное состояние, наличие лимитирующих стадий реакций и другое. Следует отметить практические неограниченные потенциальные возможности использования принципа сопряжения в биолюминесцентном анализе, поэтому число ферментов, активность которых можно определить биолюминесцентным методом, очень велико.

Лактатдегидрогеназа была сопряжена с биферментной биолюминесцентной системой бактерий в качестве построения нового биолюминесцентного метода аналитического контроля. Чувствительность разработанного биолюминесцентного метода определения активности лактатдегидрогеназы составляла 10^{-10} М. При этом стоит обратить отдельное внимание на то, что для уменьшения экспериментальной ошибки определения активности НАД-зависимых дегидрогеназ необходимо уделять особое внимание к выбору оптимальных концентраций НАДН:ФМН-оксидоредуктазы и люциферазы. Данное замечание следует из того, что для определения активности НАД-зависимых дегидрогеназ биолюминесцентным способ обычно используют два главных параметра - интенсивность свечения биолюминесцентной системы (I) и константу спада биолюминесцентной реакции ($k_{сп}$). Также было установлено, что бактериальная люцифераза ответственна за значения интенсивности свечения биолюминесцентной системы, а НАДН:ФМН-оксидоредуктаза определяет величину константы спада биолюминесцентной реакции [12,137-138].

Ранее была проведена исследовательская работа с целью создания стабильного иммобилизованного реагента с участием сопряженной триферментной системы ЛДГ + Р + Л. Авторы исследования отмечают, что создание такого реагента позволит расширить область применения сенсоров по определению уровня лактата в клинической и спортивной медицине, проведения аналитических исследований в области пищевой и питьевой промышленности. В качестве стабилизирующих добавок были использованы: сахароза (С – 0,5 М или 10%), полиэтиленгликоль (ПЭГ) (С- 0,2 мг/мл), бычий сывороточный альбумин (БСА)

(С-10 мг/мл), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (С- 0,1мМ) и дитиотреитол (ДТТ) (С – 100мМ). Помимо этого, в исследовании влияния выбранных стабилизирующих добавок на активность триферментной ЛДГ + Р + Л системы авторы исследования сознательно увеличивали интенсивность биолюминесцентной вспышки добавляя к сопряженной триферментной системе глутамат-пируватаминотрансферазу, в концентрации 0,014 мг/мл, увеличивая тем самым производство НАДН, продукта реакции катализируемой ЛДГ. Добавление глутамат-пируватаминотрансферазы приводило к увеличению биолюминесцентной вспышки триферментной системы на 20%, по сравнению с экспериментальной повторностью, в которой глутамат-пируватаминотрансфераза отсутствовала. В дополнение, опубликованы данные в которых добавление глутамат-пируватаминотрансферазы приводит к увеличению биолюминесцентной вспышки на 117-183% по сравнению с контрольными значениями [139].

Иммобилизация триферментной ЛДГ + Р + Л системы с использованием сахарозы, ПЭГ, БСА, ЭДТА и ДТТ, указанных выше концентраций, не приводит к существенному снижению активности исследуемой триферментной системы, за исключение иммобилизации с участием ЭДТА (рисунок 1.9.).

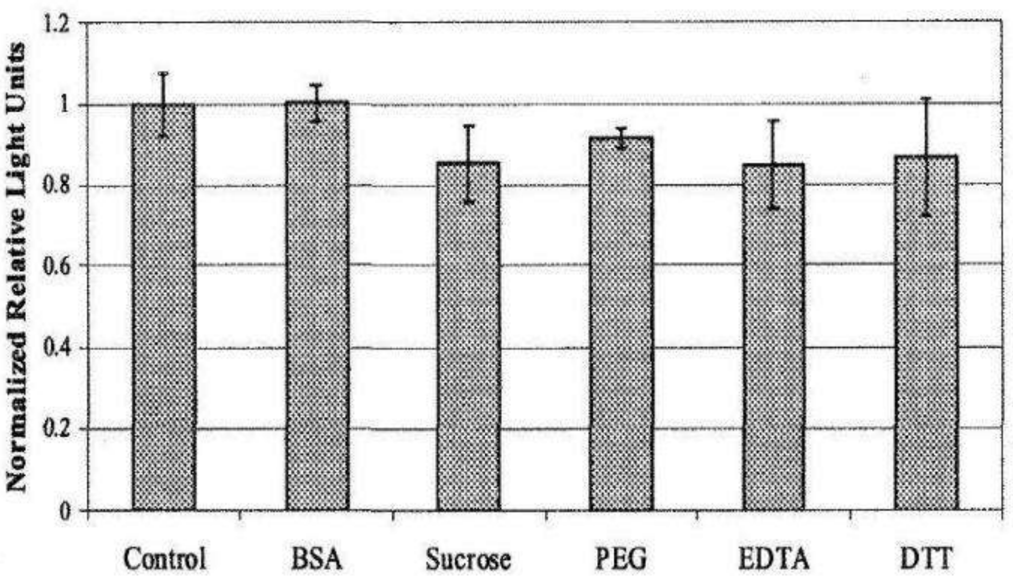


Рисунок 1.9. — Интенсивность свечения биолюминесцентного сенсора, на основе ЛДГ + Р + Л системы, определения уровня лактата в присутствии различных иммобилизирующих агентов. Интенсивность свечения

нормализована относительно контроля. Воспроизведено из [139].

В последующем авторы исследования отказались от использования ЭДТА в качестве иммобилизирующего агента, поскольку в присутствии ЭДТА наблюдалось значительное уменьшение биолюминесцентной активности разрабатываемого биосенсора. Изучение стабильности иммобилизованного реагента, с использованием триферментной ЛДГ + Р + Л системы, проводилось в течение 30 дней, при температуре хранения t = 25°C. Авторами было установлено, что в присутствии ПЭГ и смеси ПЭГ + сахароза + ДТТ иммобилизированный реагент ЛДГ + Р + Л сохраняет наибольшую активность, в то время как, в присутствии других агентов, выбранных для иммобилизации, происходит постепенная потеря активности реагента практически до нуля (рисунок 1.10.).

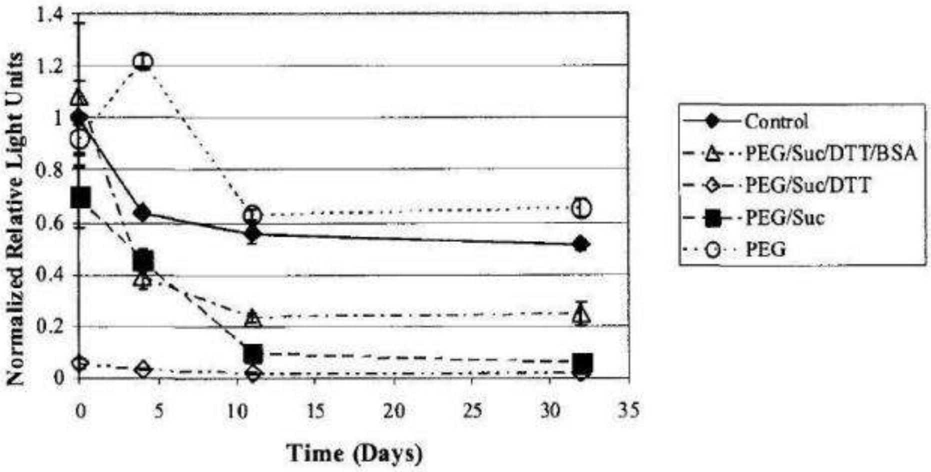


Рисунок 1.10. – Изменение активности иммобилизованного реагента ЛДГ + Р + Л в течение 30 дней. Воспроизведено из [139].

1.9. Заключение к главе

Информация, представленная в Главе 1, подтверждает актуальность выбранной темы исследования. Отдельно подчеркивается важность в адекватном использовании накопленных знаний о механизмах работы ферментативных систем в буферных растворах (*in vitro*) для имитирования внутриклеточных условий их функционирования в гиалоплазме клетки *(in vivo)*. Сложность адаптации полученных знаний в *in vitro* моделях заключается в том, что при моделировании условий функционирования ферментов внутри живой клетки большинство положений классической химии не реализуются в полной мере. Такие нестыковки между *in vitro* и *in vivo* системами связаны с тем, что гиалоплазма клетки представляет собой сложную матрицу густой смеси растворенных в ней молекул и веществ, составляющих 40% от общего клеточного объема, то есть внутриклеточная среда не является гомогенной, при этом вязкость реакционной среды во внутриклеточных условиях отличная от вязкости реакционной среды буферных растворов. В то же время, к сожалению, в публикациях посвященных изучению механизмов действия внутриклеточных условий на кинетику ферментативных реакций никак не обсуждаются принципы и тонкости перехода от исследований принципов функционирования моноферментных реакций во внутриклеточных условиях к исследованию полиферментных реакций в *in vivo* моделях. С этой проблемой современное научное общество должно столкнуться в виду того, что если не все, то большинство ферментов внутри живой клетки функционируют в виде сопряженных полиферментных систем. Другой не менее актуальный вопрос состоит в понимании, какие из ферментов метаболической цепи во внутриклеточных условиях взаимодействуют в комплексе друг с другом. Эта проблема также является актуальной и для понимания механизмов метаболических процессов, происходящих в клетках светящихся бактерий. Использование уникального преимущества биолюминесцентных систем связанного с возможностью конструирования полиферментных цепей сопряжения, включающих от двух до девяти ферментов, сопряженных с бактериальной люциферазой имеет потенциал, чтобы решить и найти ответы на упомянутые выше вопросы.

ГЛАВА 2. Материалы и методы

2.1. Оборудование

При проведении научно-исследовательской работы было использовано следующее оборудование:

- для взвешивания сухих и сыпучих химических реактивов: весы аналитические AND GR-120 (A&D, Япония);

- для работы с жидкими растворами: дозаторы пипеточные одноканальные «Лайт» (Thermo Scientific, США) различного объема 1-10000 мл; пипетки, флаконы, мешалки магнитные и другое лабораторное оборудование;

- для регистрации биолюминесценции: люминометр 20/20^{n} (Terner BioSystems, США) с набором кювет, микропипетки емкостью от 5 до 300 мкл;

- для термостатирования образцов: циркуляционный термостат VT-8 (Termex, Россия);

-для регистрации спектров флуоресценции и возбуждения ферментов биолюминесцентной системы бактерий (НАДН:ФМН-оксидоредуктазы и люциферазы): люминесцентный сканирующий спектрометр Aminco-Bowman Series 2 (Thermo Spectronic, США), спектрофотометр Cary 5000 (Agilent Technologies, США).

2.2. Химические реактивы

В работе использовали следующие химические реактивы:

- лиофилизированный препарат высокоочищенных ферментов (КРАБ), изготовленный в Лаборатории нанобиотехнологии и биолюминесценции Института биофизики СО РАН (Красноярск), содержащий 0,5 мг люциферазы (Л) ЕС 1.14.14.3 из рекомбинантного штамма *Escherichia coli* (*Photobacterium* *leiognathi*) и 0,15 ед. активности НАДН:ФМН-оксидоредуктазы (Р) ЕС 1.5.1.29 (*Vibrio fischeri*) ;

- препарат L-лактатдегидрогеназы из мышц кролика (тип XI) (Sigma Aldrich, Германия);

- соли для приготовления буферного (контрольного) раствора: гидрофосфат калия (K_2HPO_4), дигидрофосфата калия (KH_2PO_4) (AppliChem, Германия);

- субстраты ферментов для биферментной Р + Л системы: β-никотинамидадениндинуклеотид восстановленный (НАДН), рибофлавин 5’-монофосфат (ФМН) (Serva, Франция); тетрадеканаль (C_{14}) (Merck, Франция);

- субстраты ферментов для триферментной ЛДГ + Р + Л системы: β-никотинамидадениндинуклеотид (НАД$^+$) (AppliChem, Германия); DL-молочная кислота (лактат) (Sigma Aldrich, Германия); рибофлавин 5’-монофосфат (ФМН) (Serva, Франция); тетрадеканаль (C_{14}) (Merck, Франция);

- добавки для моделирования вязких сред: глицерин и сахароза (Gerbu, Германия);

-наночастицы и наноматериалы: однослойные углеродные карбоксилированные нанотрубки (к-ОСУНТ-90А) (ООО «Углерод Чг», Россия), многостенный углеродный наноматериал (наноуглеродный материал активированный «НУМ-А») (ООО «Наноуглеродные материалы», Россия); гидратированный фуллерен C_{60} (C_{60}FWS) (Институт физиологически активных соединений, Украина).

- поллютанты почвы: малатион (Алсико-Агропром, Россия), диазинон (МедиЛис, Россия), хлорид меди (II) двуводный марки чда (НПФ Невский химик, Россия);

2.3. Реакционная смесь для проведения исследований сопряженных ферментативных систем

2.3.1. Реакционная среда для исследований биферментной системы: НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза

Для проведения исследований с помощью биферментной Р + Л системы необходимо приготовить:

а) 0,05 М фосфатный буферный раствор с рН 6,9. Для приготовления фосфатного буфера - 1 М гидрофосфата калия (раствор готовить растворением 149,96 г K_2HPO_4 в 1 л дистиллированной воды) объемом 2,5 мл и 1 М раствор дигидрофосфата калия (раствор готовить растворением 136,09 г KH_2PO_4 в 1 л дистиллированной воды) объемом 2,5 мл поместить в колбу на 100 мл и разбавить дистиллированной водой до метки.

б) затем лиофилизированный препарат высокоочищенных ферментов КРАБ разбавляют в 5 мл 0,05 М фосфатного буферного раствора рН 6,9. Раствор ферментов хранится при температуре -12°С.

в) спиртовой раствор тетрадеканаля (C_{14}) концентрации 0,25%. Спиртовой раствор тетрадеканаля концентрации 0,25% готовят путем разбавления 0,025 мл тетрадеканаля в 10 мл спирта этилового. Для дозирования используют пипетки дозаторы автоматические переменного объема 0,01-0,1 мл и 1-5 мл. Приготовленный раствор может храниться в пенициллиновом флаконе с пробкой при температуре 2÷5°С. Также, необходимо приготовить 0,0025% раствор тетрадеканаля. В пенициллиновый флакон помещают 0,05 мл спиртового раствора тетрадеканаля 0,25% и разбавляют 5 мл фосфатного буфера 0,05М. Для дозирования используют пипетки дозаторы автоматические переменного объема 0,01-0,1 мл и 1-5 мл. Выдерживают 20-30 мин при комнатной температуре, после чего раствор можно использовать в качестве субстрата для Р + Л системы. После проведения исследований на Р + Л системе остатки раствора тетрадеканаля 0,0025% из пенициллинового флакона выливают, повторно для проведения научного исследования не используют.

г) необходимо предварительно приготовить раствор β-никотинамидадениндинуклеотида восстановленного концентрации $4 \cdot 10^{-4}$ М.

Раствор β-никотинамидадениндинуклеотида восстановленного (НАДН) концентрации $4 \cdot 10^{-4}$ М готовят в пенициллиновом флаконе путем разбавления 0,0014 г β-никотинамидадениндинуклеотида восстановленного в 5 мл фосфатного буфера 0,05 М. Для дозирования используют пипетку дозатор автоматический переменного объема 1-5 мл. После проведения исследования остатки раствора β-никотинамидадениндинуклеотида восстановленного из пенициллинового флакона выливают, повторно раствор β-никотинамидадениндинуклеотида восстановленного не используют.

д) необходимо предварительно приготовить $0,5 \cdot 10^{-3}$ М раствор рибофлавина 5'-монофосфата (ФМН). Раствор рибофлавина 5'-монофосфата концентрации $0,5 \cdot 10^{-3}$ М готовят путем разбавления 0,013 г рибофлавина 5'-монофосфата в 5 мл дистиллированной воды. Для дозирования дистиллированной воды используют пипетку мерную с одной отметкой вместимостью 50 мл ГОСТ 29169. Приготовленный раствор может храниться в стеклянной колбе из темного стекла ГОСТ 1770-74 с пробкой при температуре 2÷5°С в течение двух дней. Перед проведением исследования на Р + Л системе с помощью автоматического дозатора из колбы с раствором в пенициллиновый флакон помещают 1-2 мл рибофлавина 5'-монофосфата (в зависимости от плана исследования), выдерживают 20-30 мин при комнатной температуре, после чего раствор можно использовать в экспериментальной деятельности. После проведения исследований на Р + Л системе остатки раствора рибофлавина 5'-монофосфата из пенициллинового флакона выливают, повторно его не используют.

2.3.2. Реакционная среда для проведения исследований трехферментной системы: лактатдегидрогеназа + НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза

Для проведения исследований с помощью триферментной ЛДГ + Р + Л системы необходимо приготовить:

а) 0,05 М фосфатный буферный раствор с рН 6,9. Для приготовления фосфатного буфера - 1 М гидрофосфата калия (раствор готовить растворением

149,96 г K_2HPO_4 в 1 л дистиллированной воды) объемом 2,5 мл и 1 М раствор дигидрофосфата калия (раствор готовить растворением 136,09 г KH_2PO_4 в 1 л дистиллированной воды) объемом 2,5 мл поместить в колбу на 100 мл и разбавить дистиллированной водой до метки.

б) затем лиофилизированный препарат высокоочищенных ферментов КРАБ разбавляют в 5 мл 0,05 М фосфатного буферного раствора рН 6,9. Раствор ферментов хранится при температуре -12°C.

в) раствор, содержащий лактатдегидрогеназу, готовится путем растворения 0,5 мг лиофилизированного препарата лактатдегидрогеназы в 1 мл калий-фосфатного буфера рН 6,9. Раствор хранится при температуре -12°C.

г) раствор DL-молочной кислоты концентрации $15 \cdot 10^{-3}$ М. Раствор DL-молочной кислоты концентрации $15 \cdot 10^{-3}$ М готовят в пенициллиновом флаконе путем разбавления 5,3 мл DL-молочной кислоты в 5 мл дистиллированной воды. Для дозирования используют пипетки дозаторы автоматические переменного объема 1-5 мл. Приготовленный раствор может храниться в стеклянной колбе из темного стекла ГОСТ 1770-74 с пробкой при температуре 2÷5°C в течение двух дней. Перед проведением исследования на ЛДГ + Р + Л системе с помощью автоматического дозатора из колбы с раствором в пенициллиновый флакон помещают 1-2 мл раствора DL-молочной кислоты (в зависимости от плана исследования), выдерживают 20-30 мин при комнатной температуре, после чего раствор можно использовать в экспериментальной деятельности. После проведения исследований на ЛДГ + Р + Л системе остатки раствора DL-молочной кислоты из пенициллинового флакона выливают, повторно их не используют.

д) спиртовой раствор тетрадеканаля (C_{14}) концентрации 0,25%. Спиртовой раствор тетрадеканаля концентрации 0,25% готовят путем разбавления 0,025 мл тетрадеканаля в 10 мл спирта этилового. Для дозирования используют пипетки дозаторы автоматические переменного объема 0,01-0,1 мл и 1-5 мл. Приготовленный раствор может храниться в пенициллиновом флаконе с пробкой при температуре 2÷5°C. Также, необходимо приготовить 0,0025% раствор тетрадеканаля. В пенициллиновый флакон помещают 0,05 мл спиртового раствора тетрадеканаля 0,25% и разбавляют 5 мл фосфатного буфера 0,05М. Для дозирования используют пипетки дозаторы автоматические переменного объема 0,01-0,1 мл и 1-5 мл. Выдерживают 20-30 мин при комнатной температуре, после чего раствор можно использовать в качестве субстрата для Р + Л системы. После проведения исследований на Р + Л системе остатки раствора тетрадеканаля 0,0025% из пенициллинового флакона выливают, повторно для проведения научного исследования не используют.

е) необходимо предварительно приготовить раствор $0,5 \cdot 10^{-3}$ М β-никотинамидадениндинуклеотида ($НАД^+$). Раствор готовят в пенициллиновом флаконе путем разбавления 0,0033 г β-никотинамидадениндинуклеотида в 10 мл фосфатного буфера 0,05 М. Для дозирования используют пипетку дозатор автоматическую переменного объема 1-5 мл. После проведения исследований на ЛДГ + Р + Л системе остатки раствора β-никотинамидадениндинуклеотида из пенициллинового флакона выливают, повторно для проведения исследований на триферментной системе раствор не используют.

ж) необходимо предварительно приготовить $0,5 \cdot 10^{-3}$ М раствор рибофлавина 5’-монофосфата (ФМН). Раствор рибофлавина 5’-монофосфата концентрации $0,5 \cdot 10^{-3}$ М готовят путем разбавления 0,013 г рибофлавина 5’-монофосфата в 5 мл дистиллированной воды. Для дозирования дистиллированной воды используют пипетку мерную с одной отметкой вместимостью 50 мл ГОСТ 29169. Приготовленный раствор может храниться в стеклянной колбе из темного стекла ГОСТ 1770-74 с пробкой при температуре 2÷5°С в течение двух дней. Перед проведением исследования на ЛДГ + Р + Л системе с помощью автоматического дозатора из колбы с раствором в пенициллиновый флакон помещают 1-2 мл рибофлавина 5’-монофосфата (в зависимости от плана исследования), выдерживают 20-30 мин при комнатной температуре, после чего раствор можно использовать в экспериментальной деятельности. После проведения исследований на ЛДГ + Р + Л системе остатки раствора рибофлавина 5’-монофосфата из пенициллинового флакона выливают, повторно его не используют.

2.3.3. Приготовление растворов глицерина и сахарозы

Растворы глицерина (0-50 об.%) и сахарозы (0-40 об.%) готовили разбавлением соответствующего количества навески сухого порошка сахарозы или объема глицерина в фосфатном буфере (pH 6,9). Получаемые концентрации водных растворов природных осмолитов выражали в виде моделируемых значений вязкости. Вязкостные характеристики полученных водно-глицериновых и водно-сахарозных растворов пересчитывали согласно справочным данным [141-142]. В таблицах 2.1. и 2.2. представлены вязкостные характеристики полученных водных растворов глицерина и сахарозы, используемых в исследовании, при температуре t=20°C.

Таблица 2.1. — Динамическая вязкость органического соединения – глицерин [140].

Концентрация глицерина, об. %	0	10	20	40	50
Вязкость (сП) при t=20ºC	1,005	1,31	1,76	3,72	6,00

Таблица 2.2. — Динамическая вязкость органического соединения – сахароза [141].

Концентрация сахарозы, вес. %	0	10	20	30	40
Вязкость (сП) при t=20ºC	1,005	1,26	1,96	3,21	6,20

2.4. Измерение кинетических параметров сопряженных ферментативных систем

2.4.1. Измерение кинетических параметров биферментной системы: НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза

Реакцию для измерения контрольного уровня свечения Р + Л системы проводили в смеси следующего состава: 300 мкл 0,05 М калий-фосфатного буфера pH 6,9; 5 мкл приготовленного раствора КРАБа; 50 мкл 0,0025 % раствора тетрадеканаля (C_{14}); 50 мкл 0,4 мМ раствора НАДН; 10 мкл 0,5 мМ раствора ФМН в дистиллированной воде. Все указанные выше реактивы добавляли последовательно в измерительную кювету. Реакцию инициировали добавлением раствора ФМН. Для измерения активности биферментной Р + Л системы в присутствии различных значения вязкости реакционной среды 0,05 М калий-фосфатный буфер заменяли на водно-органическую смесь, содержащую необходимую концентрацию органического растворителя, выраженную в виде вязкостной характеристики среды.

Влияние водно-органических растворов на активность биферментной Р + Л системы в определяли, вычисляя следующие параметры: максимальная интенсивность свечения ($I_м$) системы; остаточная интенсивность свечения системы ($I_{остаточное} = (I_{м\_эксп}/I_{м\_контр})*100\%$, где $I_{м\_контр}$ – максимальная интенсивность свечения системы полученная в контроле, $I_{м\_эксп}$ – максимальная интенсивность свечения системы в присутствии исследуемого значения вязкости реакционной среды); константа спада светоизлучения ($k_{dec} = (lnI_{80}-lnI_{20})/\Delta t$, где lnI_{80} – натуральный логарифм значения интенсивности свечения системы, составляющей 80% от максимального значения интенсивности свечения системы, lnI_{20} - натуральный логарифм значения интенсивности свечения системы, составляющей 20% от максимального значения интенсивности свечения системы, Δt – промежуток времени за который интенсивность свечения системы падала с 80% до 20%); общего количества высвеченных квантов света ($Q = I_м/k_{dec}$, где $I_м$ – максимальная интенсивность свечения системы, k_{dec} - константа спада светоизлучения) [5,12,13, 142].

2.4.2. Измерение кинетических параметров триферментной системы: лактатдегидрогеназа+ НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза

Реакцию для измерения контрольного уровня свечения Р + Л системы проводили в смеси следующего состава: 300 мкл 0,05 М калий-фосфатного буфера рН 6,9; 5 мкл раствора лактатдегидрогеназы; 10 мкл приготовленного раствора КРАБа; 50 мкл 0,0025 % раствора тетрадеканаля; 50 мкл 15мМ раствора DL-молочной кислоты; 50 мкл 0,5 мМ раствора НАД$^+$; 10 мкл 0,5 мМ раствора ФМН. Все указанные выше реактивы добавляли последовательно в измерительную кювету. Реакцию инициировали добавлением раствора НАД$^+$. Для измерения активности триферментной ЛДГ + Р + Л системы в присутствии различных значения вязкости реакционной среды 0,05 М калий-фосфатный буфер заменяли на водно-органическую смесь, содержащую необходимую концентрацию органического растворителя, выраженную в виде вязкостной характеристики среды.

Влияние водно-органических растворов на активность триферментной ЛДГ + Р + Л системы в определяли, вычисляя следующие параметры: максимальная интенсивность свечения ($I_м$) системы; остаточная интенсивность свечения системы ($I_{остаточное}$ = ($I_{м\_эксп}/I_{м\_контр}$)*100%, где $I_{м\_контр}$ – максимальная интенсивность свечения системы полученная в контроле, $I_{м\_эксп}$ – максимальная интенсивность свечения системы в присутствии исследуемого значения вязкости реакционной среды); константа спада светоизлучения ($k_{dec} = (\ln I_{80}-\ln I_{20})/\Delta t$, где $\ln I_{80}$ – натуральный логарифм значения интенсивности свечения системы, составляющей 80% от максимального значения интенсивности свечения системы, $\ln I_{20}$ - натуральный логарифм значения интенсивности свечения системы, составляющей 20% от максимального значения интенсивности свечения системы, Δt – промежуток времени за который интенсивность свечения системы падала с 80% до 20%); общего количества высвеченных квантов света ($Q = I_м/k_{dec}$, где $I_м$ – максимальная интенсивность свечения системы, k_{dec} - константа спада светоизлучения) [5,12,13, 142].

2.5. Исследование термостабильности биферментной и триферментной системы в реакционных средах различной вязкости

Активность биферментной Р + Л системы изучали в присутствии различных концентраций глицерина (5-50%) и сахарозы (10-40), и в контрольном водном-буферном растворе в диапазоне температур от 20°C до 45°C. Активность триферментной ЛДГ + Р + Л системы в присутствии различных концентраций глицерина (5-50%) и сахарозы (10-40), и в контрольном водном-буферном растворе в диапазоне температур в диапазоне температур от 15°C до 80°C. Ферменты исследуемых биолюминесцентных систем (раствор КРАБа либо раствор ЛДГ + КРАБ) в присутствии 300 мкл 0,05 М калий-фосфатного буфера pH 6,9 либо 300 мкл водно-органической смеси инкубировали в водяной бане в указанном выше диапазоне температур с шагом 5°C, в течение 10 мин. После инкубирования смесь ферментов с буфером либо водно-органической смесью выдерживали при комнатной температуре 5 минут и после проводили измерение интенсивности свечения. Термоинактивацию биферментной и триферментной систем изучали, инкубируя ферменты в течение 10 мин при температурах в интервале от 10 до 50°C в присутствии различных концентраций глицерина и сахарозы и без них (контроль). Значения энергии активации ферментативной реакции определяли графическим способом, построением зависимости Аррениуса (lnk_{dec} от 1/T), где lnk_{dec} – логарифм константы спада светоизлучения при определенной температуре, T – заданная температура в К. Энергия активации определялась на графике по тангенсу угла наклона прямой к оси (1/T)*103, равному –(E_a / 2,3*R), где E_a – энергия активации, R- универсальная газовая постоянная (8,314 Дж/ моль*К) [7,11,36,142].

2.6. Регистрация спектров флуоресценции НАДН:ФМН-оксидоредуктаза и бактериальная люцифераза в вязких реакционных средах

Спектры флуоресценции ферментов - Р и Л, регистрировали с помощью сканирующего спектрометра Aminco-Bowman Series 2 (Thermo Spectronic, США) с шириной щели 2–4 нм в диапазоне длин волн 300–500 нм, длина волны возбуждения 295 нм. Регистрации спектров флуоресценции ферментов биферментной биолюминесцентной системы проводили в смеси следующего состава: 50 мкл раствора КРАБ; 2,5 мл калий-фосфатного буфера или воднобуферного раствора глицерина (5, 10, 25, 50 %), или сахарозы (20, 25, 30, 40 %). Рабочие концентрации глицерина и сахарозы выбирали таким образом, чтобы смоделировать одинаковую вязкость реакционной среды разными по природе водно-органическими растворителями. Величину динамической вязкости реакционной среды брали из химического справочника. Каждый образец подвергался термостатированию в течение 10 минут до начала съёмки при температуре 35°С. Все спектры флуоресценции корректировали в соответствии с чувствительностью ФЭУ к различным длинам волн с помощью встроенной программы. Анализ и обработка полученных результатов проводилась с применением программы Excel из пакета MS Office, а также с помощью управляющей̆ программы люминесцентного спектра Amino Bowman Series 2. Условия регистрации спектров флуоресценции ферментов биолюминесцентной реакции бактерий приведены в таблице 2.3 [143].

Таблица 2.3. — Условия регистрации спектров флуоресценции ферментов биолюминесцентной реакции бактерий.

Компонент	Концентрация	Длина волны возбуждения / регистрации, нм	Спектральная ширина щелей монохроматоров, нм	Напряжения ФЭУ при регистрации спектров, В
Бактериальная люцифераза	$1*10^{-6}$ М	295/335	4	700
НАДН:ФМН-оксидоредуктаза	0,56 ед.акт/мл	295/335	4	790

2.7. Методы биотестирования почвенных образцов, загрязненных поллютантами, с использованием ферментативных систем, различной сложности

Объектом исследования являлись 5 эталонных образцов почв (песок, легкий суглинок, средний суглинок, тяжелый суглинок, чернозём), отобранных в соответствии с ГОСТ 17.4.4.02-84 (2008). Экстракты из почв были приготовлены с использованием дистиллированной воды по следующей технологии: навеску почвы 5 г разводили 5-кратным объемом дистиллированной воды. Данную смесь выдерживали 30 минут при непрерывном перемешивании при комнатной температуре, затем фильтровали. В качестве загрязняющих веществ были выбраны пестициды - малатион и диазинон, а также хлорид меди (II).

Анализ влияния образцов почв на активность ферментативных систем проводили следующим образом. Активность моноферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза оценивали по изменению оптической плотности раствора при 340 нм с использованием спектрофотометра Cary 5000 (Agilent Technologies, США). Реакционная смесь во время работы с моноферментной системой была следующего состава: 660 мкл 0,05 М калий-натрий фосфатного буфера pH 6,9; 40 мкл НАДН:ФМН-оксидоредуктазы (0,15 ед.акт./мл); 30 мкл 0,5 мМ раствора ФМН; 150 мкл 4 мМ раствора НАДН; и 120 мкл дистиллированной воды (контроль) или тестируемого экстракта из почвы. Исследуемый диапазон концентраций токсических веществ для моноферментной системы составлял: 0,085–0,595 мг/л хлорида меди (II), 1,04–10,38 мг/л малатиона, 0,35–0,85 г/л диазинона.

Активность биферментной Р + Л системы оценивали по регистрации интенсивности свечения с помощью люминометра Luminometer $20/20^n$ (Promega, США). Реакционная смесь для проведения биолюминесцентного биотестирования представляла собой: 350 мкл 0,05 М калий фосфатного буфера pH 6,9; 5 мкл раствора ферментов КРАБ; 50 мкл 0,0025%-ного тетрадеканаля; 100 мкл 0,4 мМ раствора НАДН; 10 мкл 0,05 мМ раствора ФМН и 50 мкл дистиллированной воды (контроль) или тестируемого экстракта из почвы. Исследуемый диапазон концентраций токсических веществ для Р + Л системы составлял: 0,015–0,15 г/л хлорида меди (II), 0,0078–0,78 мг/л малатиона, 0,23 –53 г/л диазинона.

Активность триферментной ЛДГ + Р + Л системы оценивали по регистрации интенсивности свечения на люминометре Luminometer $20/20^n$ (Promega, США). Реакционная смесь для проведения биолюминесцентного биотестирования представляла собой: 300 мкл 0,05 М калий-фосфатного буфера pH 6,9; 5 мкл раствора ЛДГ; 10 мкл раствора ферментов КРАБ; 10 мкл 15 мМ раствора DL-молочной кислоты; 100 мкл 0,5 мМ раствора НАД$^+$; 50 мкл 0,0025% раствора тетрадеканаля; 10 мкл 0,5 мМ раствора ФМН и 50 мкл дистиллированной воды (контроль) или тестируемого экстракта почвы. Исследуемый диапазон концентраций токсических веществ для ЛДГ + Р + Л системы составлял: 0,013 – 13 мг/л хлорида меди (II), 0,22–8.8 мг/л малатиона, 0,037–60 г/л диазинона.

Остаточную активность ферментативной системы ($I_{остаточное}$) оценивали по формуле: $I_{остаточное} = (I_{м\_эксп}/I_{м\_контр})*100\%$, где $I_{м\_контр}$ – максимальная интенсивность свечения системы, полученная в контроле, $I_{м\_эксп}$ – максимальная интенсивность свечения системы в присутствии контрольного образца и раствора токсиканта или экстракта из почвы. Также определяли параметр ингибирования системы IC_{20}, за который принимали концентрацию токсиканта при которой величина $I_{остаточное}$ используемой ферментативной системы составляет 80 % [144].

2.8. Методы оценки потенциальной токсичности наноматериалов и нанотрубок с использованием биферментной системы: НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза

Способ получения суспензий из однослойных углеродных карбоксилированных нанотрубок (ОСУНТ) и многостенного углеродного наноматериала (МСУНТ) для проведения биолюминесцентного биотестирования состоял в следующем. Навеску в количестве 0,002 г ОСУНТ или МСУНТ помещали в стеклянную емкость, вносили 20 мл 1 % раствора поверхностно-активного вещества (ПАВ) лаурилсульфата натрия. Полученную суспензию обрабатывали ультразвуком частотой 35 кГц и мощностью 300 Вт в источнике ванного типа «Сапфир ТТЦ» (ЗАО ПКФ «Сапфир», Россия) в течение 10–30 мин. В качестве контрольного раствора использовали раствор ПАВ лаурилсульфата натрия, обработанный аналогичным образом. Из первично полученной смеси готовили серии двукратных разведений до 1:1000 включительно.

Биолюминесцентное биотестирование с использованием Р + Л системы проводили в реакционной среде следующего состава: 300 мкл 0,05 М калий фосфатного буфера pH 6,9; 5 мкл раствора КРАБа; 50 мкл 0,0025% раствора тетрадеканаля; 50 мкл 0,4 мМ раствора НАДН; 10 мкл 0,5 мМ раствора ФМН. Для исследования действия анализируемого образца наночастиц или наноматериала на биферментную систему вначале регистрировали контрольное свечение биферментной системы при добавлении 50 мкл контрольного раствора ПАВ. Далее измеряли интенсивность свечения в присутствии исследуемого образца наночастиц или наноматериала, для этого вместо контрольного раствора ПАВ в кювету вносили 50 мкл исследуемого образца наноматериала заданной концентрации. Реакцию биотеста определяли по величине остаточного свечения - $I_{остаточное} = (I_{м\_эксп}/I_{м\_контр})*100\%$. На основании полученных данных рассчитывали величины токсикологических параметров IC_{20} и IC_{50}, соответствующие концентрациям наночастиц или наноматериалов, вызывающим ингибирование свечения Р + Л системы на 20 или 50 % по сравнению с контрольным уровнем свечения, определяемым в присутствии контрольного образца [145].

2.9. Статистическая обработка результатов

В работе использовали современное научно-исследовательское оборудование и методы исследования. Для проверки достоверности и обоснованности результатов экспериментов, различия между показателями независимых выборок оценивали по критерию Стьюдента (t). Значения считали достоверными при уровне значимости не ниже 95% ($p < 0,05$). Как правило, все эксперименты выполнены не менее чем в трех повторностях и были обработаны методами вариационной статистики. Для статистической обработки результатов использовали пакет прикладных программ EXCEL («Microsoft», США) и Origin 8,1 (OriginLab, США) с подсчетом среднего арифметического значения (M) и стандартного отклонения (s). Ошибка экспериментов не превышала 15%. Обработку спектров флуоресценции НАДН:ФМН-оксидоредуктазы и люциферазы производили с помощью управляющей программы люминесцентного спектра Amino Bawman Series.

ГЛАВА 3. Влияние вязкости реакционной среды на активность би- и триферментных систем

В данной главе представлены результаты исследования о влиянии вязкости реакционной среды в диапазоне от 1 до 6 сП, которая сравнима со значения цитоплазматической вязкости в жидкой фазе. Значения вязкости реакционной среды создавались путем замены добавляемого 0,05 М калий-фосфатного буферного раствора на водно-органические растворы глицерина (5-50%) и сахарозы (10-40%).

Активность биферментной системы (НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза) и триферментной системы (лактатдегидрогеназа + НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза) была изучена в присутствии значений вязкости реакционной среды (от 1 до 6,2 сП).

3.1. Влияние вязкости реакционной среды на кинетическую активность биферментной биолюминесцентной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза

Экспериментальное изучение кинетических параметров функционирования ферментов биолюминесцентной биферментной системы (НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза) в диапазоне значений вязкости от 1,26 до 6,20 сП показало, что увеличение вязкости реакционной среды изменяет кинетику биферментной биолюминесцентной реакции. На рисунке 3.1. представлена временная кинетика изменения интенсивности свечения биферментной системы в буфере и в присутствии вязкости реакционной среды со значениями 1,26 и 1,31 сП, моделируемыми при добавлении 10% сахарозы и 10% глицерина, соответственно. Из рисунка 3.1. видно, что при моделировании значения вязкости реакционной среды η = 1,26 сП водным раствором 10% сахарозы, происходит значительное изменение профиля кинетики биферментной Р + Л системы. В то время как, при вязкости реакционной среды η = 1,31 сП, созданной водно-глицериновым раствором, существенного изменения профиля кинетики ферментативной реакции не происходит.

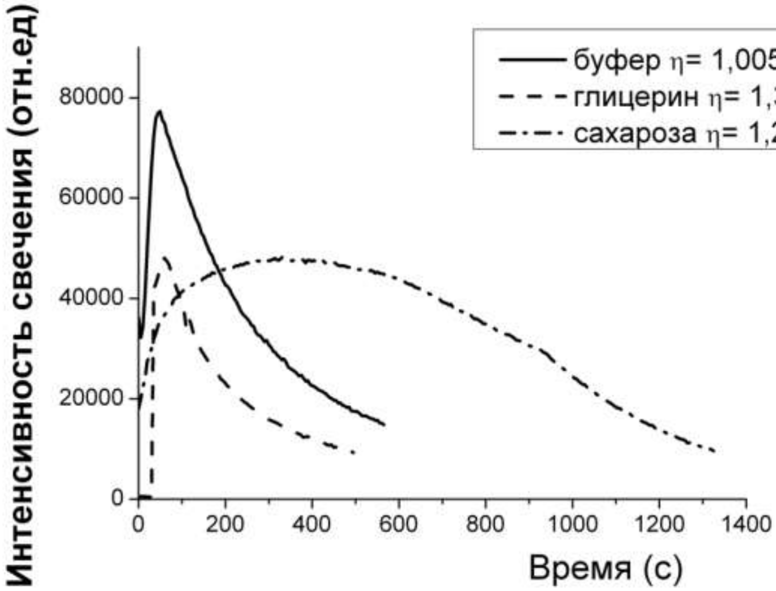


Рисунок 3.1. — Зависимость динамики интенсивности свечения биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза от времени в буферном растворе и при значениях вязкости реакционной смеси η = 1,26 сП и η = 1,31 сП при t=20°C.

При моделировании вязкости реакционной среды водно-глицериновыми растворами кинетический профиль Р + Л системы по своей форме совпадает с контрольным профилем по форме увеличения и спада значений интенсивности свечения. В то время как, при моделировании вязкости реакционной среды путем использования водно-сахарозных растворов наблюдается изменение кинетического профиля Р + Л системы, а именно происходит увеличение времени достижения максимального значения биолюминесцентной вспышки и медленный спад значений интенсивности свечения при достижении ферментативной реакции плато. Скорее всего, регистрируемое изменение кинетического профиля биферментной Р + Л системы связано с тем, что добавление в реакционную среду 10% концентрации водного раствора сахарозы приводит к затруднению диффузионных процессов в системе [7,36], а увеличение времени спада значений интенсивности свечения биолюминесцентной реакции может свидетельствовать о том, что сахароза сильнее глицерина, ограничивает подвижность пространственной структуры [73] бактериальной люциферазы, что приводит к наблюдаемым эффектам. При этом, стоит отметить, что подобные зависимости изменения кинетического профиля Р + Л системы наблюдали для всех исследуемых значений вязкости реакционной среды, моделируемых водно-сахарозными растворами.

В дополнение, следует отметить, что величина $I_м$ биферментной Р + Л системы зависит от вязкости реакционной среды, то есть чем выше значение вязкости реакционной среды, тем меньше значение $I_м$ (рисунок 3.2.).

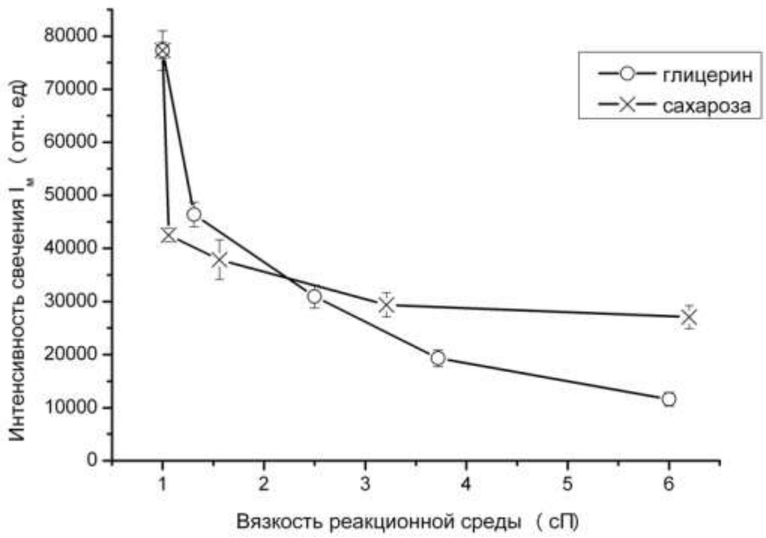


Рисунок 3.2. – Зависимость максимальной интенсивности свечения биферментной Р + Л системы ($I_м$) от вязкости реакционной среды, созданной растворами глицерина или сахарозы, при t=20°C.

Например, при вязкости реакционной среды η = 6 сП, моделируемой 50% водно-глицериновым раствором, величина $I_м$ биферментной Р + Л системы составляла 17% от величины $I_м$ при вязкости реакционной среды η = 1,005 сП (контрольное значение). В присутствии вязкости реакционной среды η = 6,20 сП, моделируемой 40% водным раствором сахарозы, величина $I_м$ биферментной Р + Л системы составляла 36% относительно величины $I_м$ полученной в контрольном растворе. Для ферментативных систем ранее было показано, что чем больше значения вязкости, тем меньше каталитическая активность исследуемой системы

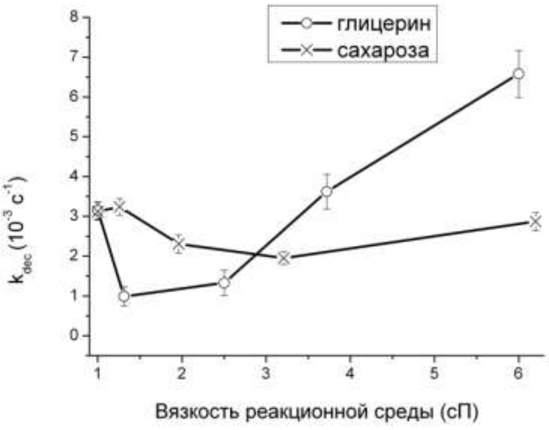
[5,6,130,36], что наблюдается на рисунке 3.2. в присутствии водно-глицериновых и сахарозных растворах.

Таким образом, добавление водно-глицериновых растворов, для изменения вязкости микроокружения биферментной системы Р + Л, приводят к существенному уменьшению величины $I_м$ по сравнению с добавлением водно-сахарозных растворов, но при этом водно-глицериновые растворы не изменяют кинетический профиль биферментной системы Р + Л, по сравнению с водно-глицериновыми растворами (рисунок 3.1). Следовательно, величина $I_м$ не может быть использована в качестве информативного параметра при исследовании влияния вязкости среды больше 3,2 сП, при добавлении водно-сахарозных растворов, на кинетические характеристики ферментативной Р + Л системы, из-за невозможности определить какой фактор обладает наибольшим воздействием на величину $I_м$ биферментной системы - природа используемого агента или вязкость реакционной среды.

На рисунке 3.3. показано влияние водных растворов глицерина и сахарозы на величину константы спада светоизлучения (k_{dec}) (рисунок 3.3.а) и величину общего количества высвеченных квантов света (Q) (рисунок 3.3.б) биферментной системы Р + Л. Из рисунка видно, что с увеличением вязкости микроокружения в Р + Л системе, путем добавления водно-глицериновых растворов, величина k_{dec} монотонно увеличивается и при достижении вязкости реакционной среды $\eta = 6$ сП величина k_{dec} увеличивается в 2 раза по сравнению с контрольным значением. Для водно-сахарозных растворов такого эффекта не наблюдается [146-147].

Вероятнее всего, такое существенное изменение величины k_{dec} при достижении вязкости реакционной до значения $\eta = 6$ сП, при добавлении водно-глицериновых растворов, можно объяснить негативным влиянием вязкости микроокружения на скорость диффузии субстратов и высвобождения продукта реакции из активного центра фермента путем ограничения его структурной подвижности [113,148]. В свою очередь, вязкость реакционной среды, создаваемая добавлением в систему водно-сахарозных растворов, не приводит к существенному изменению величины k_{dec} биферментной Р + Л системы. В присутствии водно-сахарозных растворов, диапазоне значений вязкости от 1,26 до 6,2 сП, наблюдаются некоторые флуктуации величины k_{dec} биферментной системы, но при достижении величины вязкости реакционной среды η = 6,2 сП величина k_{dec} Р + Л системы соответствует контрольным значениям. Исходя из этого можно предположить, что наблюдаемые эффекты влияния водно-сахарозных растворов на кинетические характеристики Р + Л системы зависят от природы используемого агента, а не от вязкостных характеристик имитируемого сахарозой микроокружения.

(а)



(б)

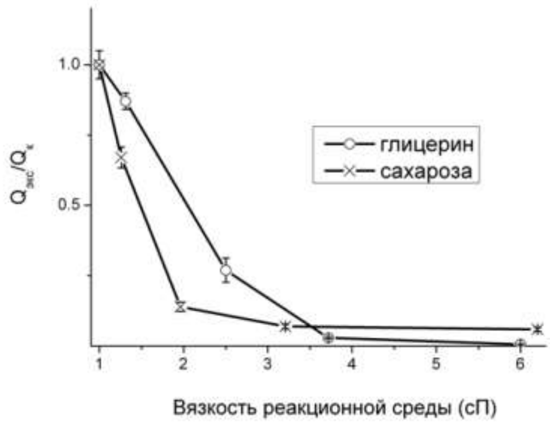


Рисунок 3.3. — Зависимость константы спада светоизлучения (а) и общего количества высвеченных квантов света (б) биферментной Р + Л системы от вязкости реакционной среды при t=20°С.

Величина общего количества высвеченных квантов света (Q) биферментной Р + Л системы не является информативным параметром для изучения влияния вязкости реакционной среды на кинетические характеристики биферментной системы. По представленным зависимостям на рисунке 3.3.б. сложно определить доминирующий фактор, который существенным образом влияет на изменение величины Q биферментной Р + Л системы – природа модельного агента или вязкость реакционной среды [146-147].

Проведённые исследования показывают, что Р + Л система проявляет активность в исследованном диапазоне вязкости реакционной среды от 1 до 6,2 сП. При этом глицерин является наиболее предпочтительным химическим агентом для моделирования эффектов вязкости реакционной среды в исследованной системе. В случае использования сахарозы в качестве модельного агента высока вероятность неправильной интерпретации получаемых результатов из-за возможного существенного влияния природы агента - сахарозы. В дополнение, величины $I_м$ и k_{dec} также являются информативными параметрами системы Р + Л, по которым можно судить о степени влияния вязкости реакционной среды, создаваемой водными растворами глицерина.

3.2. Влияние вязкости реакционной среды на кинетическую активность триферментной системы лактатдегидрогеназа + НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза

Далее было изучено влияние вязкого микроокружения на триферментную сопряженную систему ЛДГ + Р + Л. Ранее было показано, что ЛДГ + Р + Л система имеет высокую чувствительность при анализе метаболитов [16]. На рисунке 3.4. представлена динамика интенсивности свечения во времени для триферментной системы ЛДГ + Р + Л в буфере и в вязких средах, созданных добавлением растворов сахарозы и глицерина. По полученным данным видно, что изменение вязкости реакционной среды существенно изменяет динамику свечения триферментной системы по сравнению с контрольным свечением в буферном растворе с вязкостью η = 1,005 сП. Стоит отметить, что подобные зависимости влияния вязкости реакционной среды на кинетическую активность триферментной системы были получены во всем исследованном диапазоне вязкостей от η = 1,26 сП до η = 6,2 сП. Следовательно, вязкости реакционной среды обладает существенным ингибирующим воздействием на интенсивность свечения триферментной ЛДГ + Р + Л системы, при этом степень ингибирующего воздействия глицерина и сахарозы, которыми моделируются вязкостные эффекты реакционной среды, практически одинакова, что говорит о том, что система чувствительна именно к изменению вязкости реакционной среды и не зависит от природы используемых осмолитов.

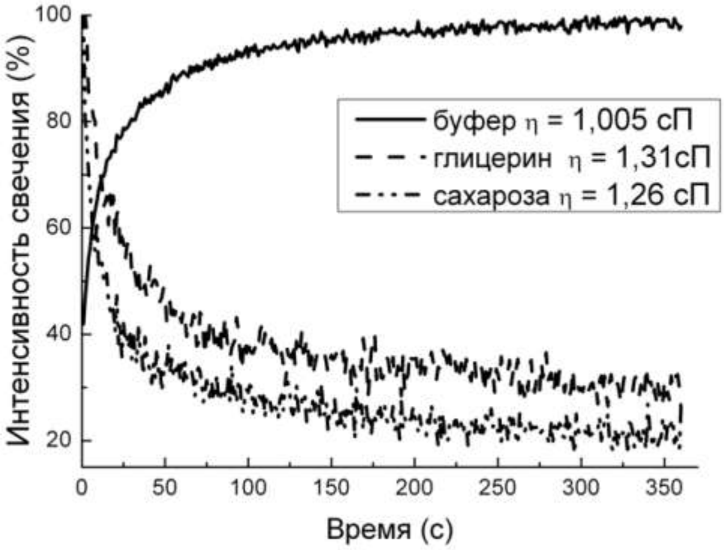


Рисунок 3.4. — Динамика интенсивности свечения триферментной ЛДГ + Р + Л системы от вязкости реакционной среды при t=20°C во времени в буфере и в вязких средах, созданных растворами сахарозы и глицерина.

Зависимость величины k_{dec} для ЛДГ + Р + Л системы от вязкости реакционной среды (рисунок 3.5.а.) имеет сходную зависимость, полученную для Р + Л системы (рисунок 3.3.а.). При добавлении в систему водно-глицериновых растворов, величина k_{dec} для триферментной системы ЛДГ + Р + Л монотонно увеличивается с увеличением вязкости микроокружения и при достижении вязкости η = 6 сП величина k_{dec} увеличивается в 1,2 раза по сравнению с k_{dec} в контроле. Вероятно, такую зависимость можно объяснить, как и для Р+ Л системы негативным влиянием вязкости микроокружения на скорость диффузии субстратов и высвобождения продукта реакции из активного центра фермента путем ограничения его структурной подвижности [113,148].

В свою очередь, вязкость реакционной среды, создаваемая добавлением в систему водно-сахарозных растворов, приводит к уменьшению величины k_{dec} триферментной ЛДГ + Р + Л системы. Например, при достижении величины вязкости реакционной среды η = 6,2 сП величина k_{dec} для ЛДГ + Р + Л системы в 0,7 раз меньше контрольных значений. Исходя из этого можно сделать вывод, что наблюдаемые процессы влияния водно-сахарозных растворов на кинетические характеристики Р + Л системы связаны с действием природы используемого сорастворителя на ферменты, а не с вязкостными характеристиками микроокружения. Такой вывод делается на основании того, что при увеличении вязкости реакционной среды за счёт использования водно-сахарозных смесей должны изменяться скорости диффузионных процессов [73] и, следовательно, увеличиваться константа спада триферментной системы, как в случае для водно-глицериновой среды.

(а) (б)

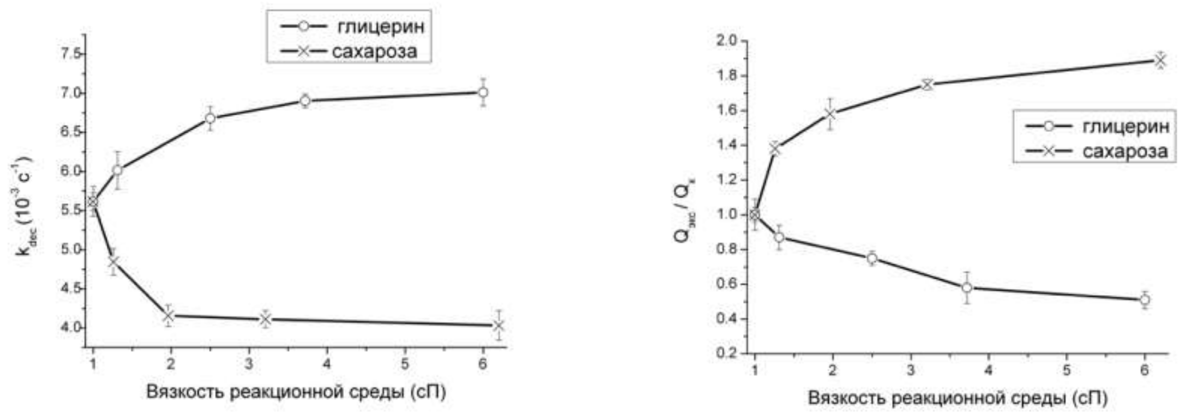


Рисунок 3.5. — Зависимость величины константы спада свечения (k_{dec}) (а) и общего количества квантов света (Q) (б) для триферментной ЛДГ + Р + Л системы от вязкости микроокружения при t=20°С.

Величина общего количества квантов света (Q) в триферментной системе ЛДГ + Р+ Л, на первый взгляд, зависит от химической природы используемых осмолитов. Так, в водно-глицериновых средах величина Q уменьшается, а при использовании водно-сахарозных растворов – увеличивается (рисунок 3.5.б.). В связи с тем, что при расчете величины Q используется величина k_{dec} ЛДГ + Р+ Л системы, с учетом выше сказанного, можно предположить, что величина Q также не является информативным параметром, по которому можно судить о степени воздействия вязкого микроокружения в триферментной системе. [11].

Уменьшение каталитической активности ЛДГ + Р + Л системы при варьировании вязкости реакционной среды, вероятно, связано с высокой чувствительностью ЛДГ к вязкому микроокружению [130]. При этом следует отметить, что интересным и требующим дальнейшего исследования является тот факт, что в работах Демченко с соавторами [131] активность ЛДГ напрямую зависела от добавляемой концентрации глицерина или сахарозы. В нашем случае, подобной концентрационной зависимости между вязкостью реакционной среды и каталитической активностью триферментной системы ЛДГ + Р + Л выявлено не было [11].

3.3. Выводы по главе

Таким образом, показано, что биферментная Р + Л система менее чувствительна к вязкому микроокружению по сравнению с триферментной ЛДГ + Р+ Л системой, что может быть связано с различиями в пространственных структурах между Р, Л и ЛДГ. Водно-глицериновые растворы являются более предпочтительными агентами для имитации вязкости гиалоплазмы, чем водно-сахарозные смеси [146].

ГЛАВА 4. Изучение термостабильности би- и триферментной систем в условиях вязкого микроокружения

4.1. Влияние растворов повышенной вязкости на температурную стабильность биферментной системы: НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза

Температурная зависимость активности биферментной Р + Л системы была исследована в растворах повышенной вязкости, в присутствии сахарозы и глицерина, в диапазоне температур 20-45°С. Было установлено, что увеличение добавляемых концентраций глицерина и сахарозы приводит к сдвигу температурного максимума свечения биферментной системы в сторону более высоких температур, то есть увеличивается термостабильность биферментной системы (рисунок 4.1.).

(а) (б)

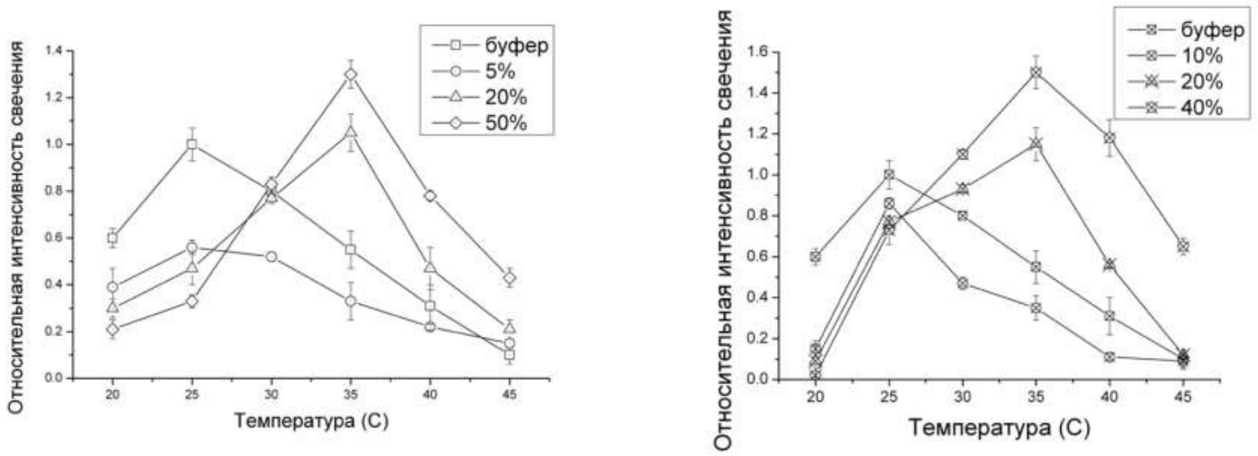


Рисунок 4.1. — Зависимость активности биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза ($I_м$) от температуры среды при различном содержании глицерина (а) и сахарозы (б). Нормировано на $I_м$ свечения реакции в буфере.

При добавлении 50% глицерина и 40% сахарозы максимальные значения $I_м$ биферменой системы были зарегистрированы при температуре 35°С.

Интенсивность свечения Р + Л системы при указанных концентрациях глицерина и сахарозы была в 2 раза выше значений, полученных в буфере при этой же температуре. При этом, известно, что температурный оптимум бактериальной люциферазы находится в диапазоне 22-28°С [142]. При температурах >30°С люцифераза начинает быстро терять активность, что свидетельствует о ограниченности применения сопряженных ферментативных систем с бактериальной люциферазой при температурах выше 30°С. Инактивация НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы происходит при температуре 37°С [142].

В связи с этим, были исследованы кинетические кривые термоинактивации биферментной Р + Л системы при температуре 35°С. Были получены моноэкспоненциальные зависимости спада активности ферментативной Р + Л системы от времени экспозиции при различных концентрациях глицерина (5–50 %) и сахарозы (10–40 %) (рисунок 4.2.).

(а) (б)

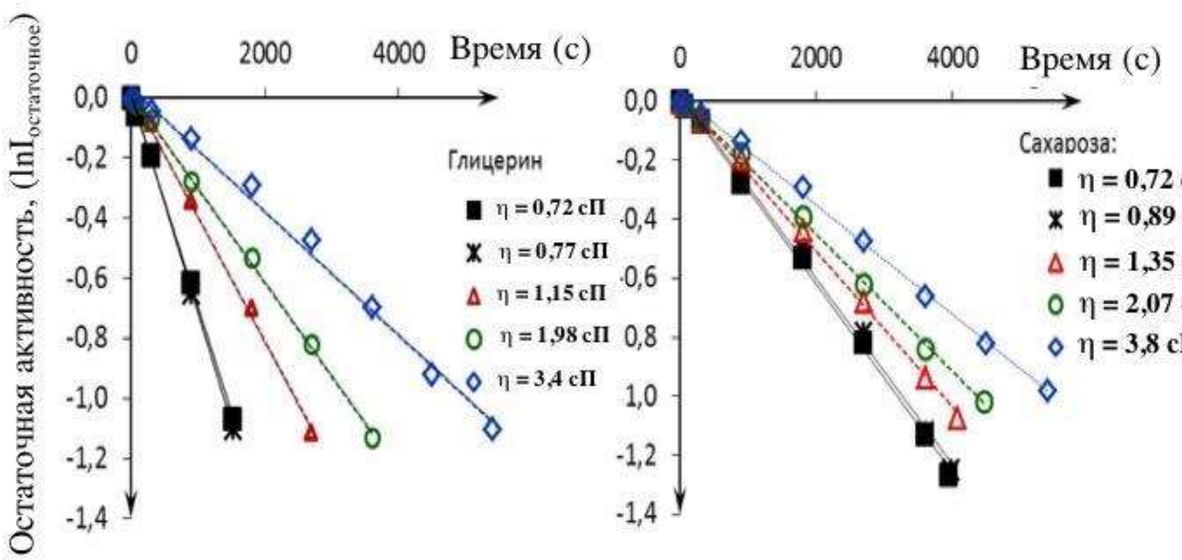


Рисунок 4.2. — Кинетические кривые термоинактивации биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза от вязкости реакционной среды, в присутствии глицерина (а) и сахарозы (б) (полулогарифмические координаты), при температуре 35°С.

Вид полученных зависимостей спада активности биферментной системы во времени свидетельствует о том, что термоинактивация биферментной системы в экспериментальных моделях является мономолекулярным процессом, и значение константы первого порядка скорости инактивации является величиной, напрямую характеризующей термостабильность люциферазы и (или) НАДН:ФМН-оксидоредуктазы в данных условиях [11,147].

Зависимость рассчитанных констант скорости термоинактивации биферментной системы k_{in} от вязкости реакционной среды представлены на рисунке 4.3.

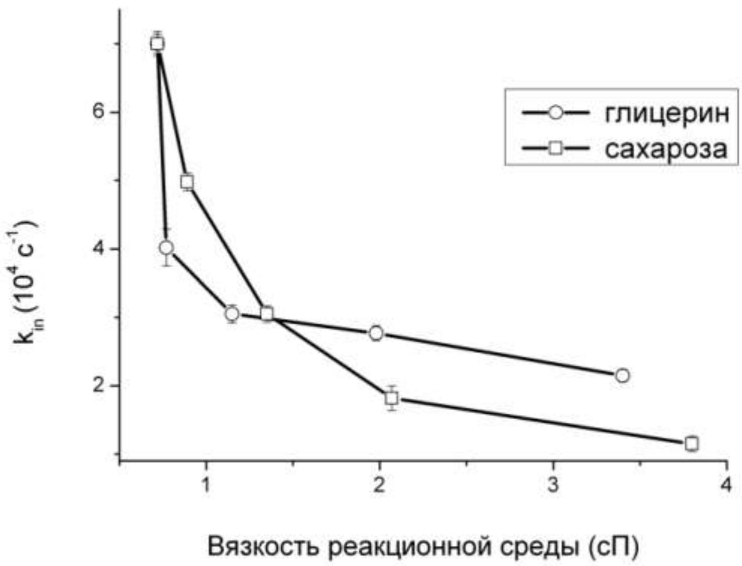


Рисунок 4.3. — Зависимость величины константы скорости инактивации биферментной системы от вязкости реакционной среды при t= 35 °С.

Видно, что величина k_{in} уменьшается с ростом вязкости модельных сред, отражая стабилизирующий эффект глицерина и сахарозы. Также из рисунка 4.3. видно, что зависимости константы скорости инактивации, в присутствии глицерина и сахарозы при близких значениях вязкости реакционной среды, почти совпадают, как по форме кривой, так и по абсолютной величине. Такой результат позволяет предположить, что стабилизирующий эффект изученных вязких сред связан с уменьшением динамической подвижности белковых глобул ферментов, что позволяет им сохранять структуру при повышении температуры. Следовательно, присутствие глицерина и сахарозы в реакционной среде приводит к защите пространственной структуры ферментов биферментной системы Р + Л от воздействия высоких температур (больше 25°С), что приводит к увеличению каталитической активности системы при температуре t = 35°С.

Помимо степени воздействия вязкости реакционной среды на кинетику инактивации биферментной системы, были рассчитаны значения энергии активации ферментативной системы в присутствии сахарозы и глицерина при температуре t= 35 ºС. Полученные значения энергии активации (E_a) составили: 40,2 ± 7,7; 6,5 ± 0,9 и 16 ± 0,8 кДж/моль, в присутствии сахарозы, глицерина и буфера соответственно.

Анализируя значения E_a можно сделать предположение о том, что значения E_a не всегда напрямую связаны с величиной уменьшения каталитической активности фермента. Например, увеличение вязкости реакционной среды до величины 3,8 сП - 3,9 сП, путем добавления 40% сахарозы и 50% глицерина, приводит как к увеличению значения E_a, в случае сахарозы, так и к уменьшению значений E_a, в случае глицерина, по сравнению с контрольным значением.

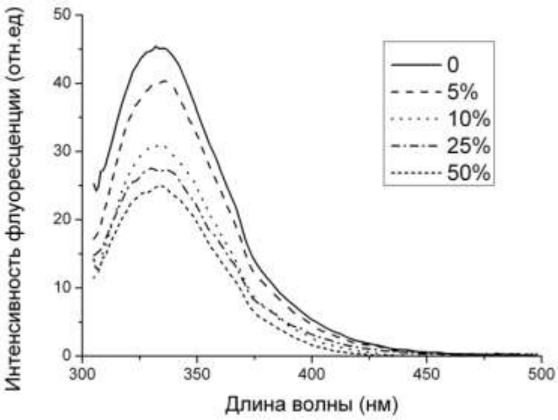
Скорее всего полученные значения E_a характеризуют ограничение пространственной подвижности белковых глобул в присутствии используемых осмолитов [7]. Следовательно, в присутствии сахарозы происходит существенное ограничение пространственной подвижности белковых глобул, необходимой для акта ферментативного катализа, по сравнению с буферными и водно-глицериновыми растворами. Примечательно, что при добавлении водно-глицериновых растворов происходит уменьшение величины E_a биферментной системы в 2,5 раза по сравнению с контрольным значением, что, вероятнее всего, может быть объяснено тем, что присутствие водно-глицеринового раствора приводит к образованию особого термодинамического состояния системы путем формирования «оптимальной» пространственной структуры фермента [5,7]. Полученный результат еще раз подтверждает факт о том, что глицерин является предпочтительным осмолитом для моделирования вязкости реакционной среды в биферментной Р + Л системе.

4.2. Исследование спектров флуоресценции ферментов биолюминесцентной реакции бактерий - НАДН:ФМН-оксидоредуктазы и люциферазы в вязких средах

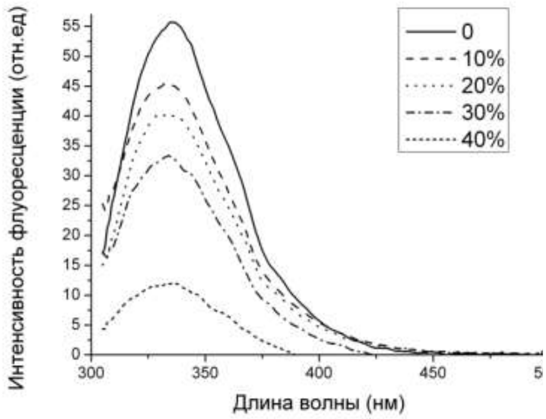
Для дополнительной оценки степени стабилизации белковых глобул в Р + Л системе при экстремальных температурах было проведено исследование спектров флуоресценции НАДН:ФМН-оксидоредуктазы (Р) и бактериальной люциферазы (Л) в присутствии используемых концентраций глицерина (5-50%) и сахарозы (10-40%) при температуре 35°С. Выбор данного значения температуры обусловлен тем, что при данной температуре активность изучаемых ферментов в буферных растворах значительно понижается. Так, оптимальная температура для бактериальной люциферазы находится в диапазоне 22-28°С. Люцифераза начинает достаточно быстро инактивироваться при температуре больше 30°С. Инактивация НАДН:ФМН-оксидоредуктазы происходит при температуре 37°С путем разворачивания фермента и диссоциации НАДН$_2$. При температурах выше 37°С экспоненциально начинает увеличиваться константа инактивации НАДН:ФМН-оксидоредуктазы [143]. Ранее нами было показано, что в вязких средах, при добавлении в реакционную смесь 50% глицерина или 40% сахарозы температурная стабильность биферментной Р + Л системы увеличивается на 10°С и максимум каталитической активности биферментной системы наблюдается при температуре +35°С [147,149]. В связи с этим, для получения информации о возможных структурных изменениях ферментов биферментной системы в вязких средах, которые стабилизируют ферменты от термоинактивации, спектры флуоресценции исследовали при температуре 35°С.

Результаты исследования показали, что при увеличении вязкости реакционной среды путем добавления, как глицерина, так и сахарозы наблюдается монотонное уменьшение интенсивности флуоресценции НАДН:ФМН-оксидоредуктазы, что объясняется концентрационным тушением внешних триптофанов. При этом в присутствии глицерина не наблюдается сдвиг максимальной длины волны флуоресценции этого НАДН:ФМН-оксидоредуктазы (рисунок 4.4. (а-б)). В присутствии различных концентраций сахарозы наблюдали гипсохромный сдвиг (около 5 нм) спектров флуоресценции НАДН:ФМН-оксидоредуктазы, который может быть вызван уменьшением подвижности близлежащих к триптофановым флуорофорам групп белка [151].

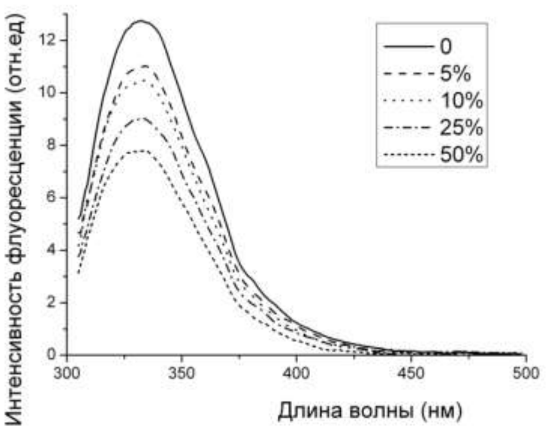
(а)



(б)



(в)



(г)

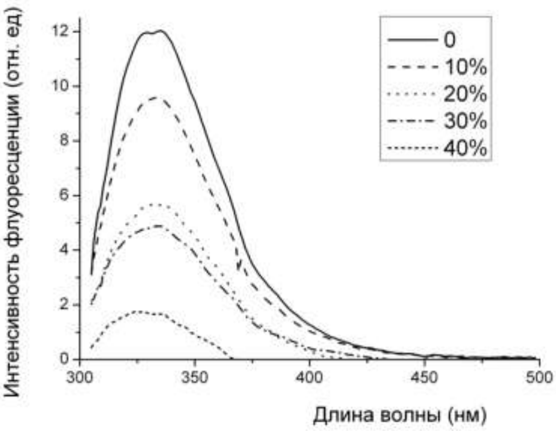


Рисунок 4.4. — Спектры флуоресценции НАДН:ФМН-оксидоредуктазы в растворах глицерина (а) и сахарозы; (б) люциферазы в растворах глицерина (в) и сахарозы (г), при температуре t = 35°C.

По более быстрому уменьшению значения интенсивности флуоресценции НАДН:ФМН-оксидоредуктазы в присутствии сахарозы, по сравнению с глицерином можно сделать вывод, что сахароза является более сильным тушителем флуоресценции НАДН:ФМН-оксидоредуктазы. Таким образом, по форме спектров флуоресценции НАДН:ФМН-оксидоредуктазы в присутствии глицерина и сахарозы при температуре 35°С не происходит изменений в пространственной структуре фермента.

Интенсивности спектров флуоресценции бактериальной люциферазы при температуре 35°С (рисунок 4.4. (в-г)) уменьшаются с увеличением вязкости реакционной среды как при добавлении сахарозы, так и глицерина, что также может быть вызвано концентрационным тушением внешних триптофанов. Также, как и в случае с НАДН:ФМН-оксидоредуктазой более интенсивное тушение флуоресценции в сахарозе по сравнению с глицерином свидетельствует, о том, что сахароза, являясь более полярным растворителем, является и более сильным тушителем флуоресценции люциферазы. В глицерине значения величины λ_{max} не изменялось, тогда, как при добавлении сахарозы был зарегистрирован гиспохромный сдвиг спектров флуоресценции фермента. Гипсохромный сдвиг спектров флуоресценции люциферазы, в присутствии сахарозы, можно объяснить уменьшением эффекта воздействия сахарозы на триптофановые остатки, экспонированные в среду, согласно структурным особенностям люциферазы это могут быть αTrp194 и αTrp271 [143,152].

Положение максимума спектра флуоресценции люциферазы и НАДН:ФМН–оксидоредуктазы , λ = 330 нм подтверждает тот факт, что наибольший вклад в спектр флуоресценции вносят «внутренние» триптофановые остатки, так как известно, что максимум спектра флуоресценции трипфона в воде наблюдается при λ = 347 нм [151].

Полученные спектры флуоресценции для люциферазы и НАДН:ФМН-оксидоредуктазы констатируют отсутствие конформационных изменений в третичной и вторичной структуре белков в вязких средах, моделируемых различными концентрациями глицерина и сахарозы, что подтверждается отсутствием существенных сдвигов максимумов в спектрах флуоресценции ферментов. Поскольку тушение флуоресценции выбранными растворителями при одном и том же значении вязкости наблюдается в большей степени в сахарозе, можно сделать вывод, что существенную роль в процессе тушения играет природа растворителя, а не только физико-химический параметр – вязкость [143].

4.3. Влияние растворов повышенной вязкости на температурную стабильность триферментной системы: лактатдегидрогеназа + НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза

Исследование влияния растворов повышенной вязкости на термостабильность триферментной ЛДГ + Р + Л системы проводили в присутствии и отсутствии вязких растворителей в диапазоне температур от 15 – 80°С. На рисунке 4.5. показана зависимость интенсивности свечения триферментной системы от температуры в буфере и в растворах 5% глицерина и 10% сахарозы

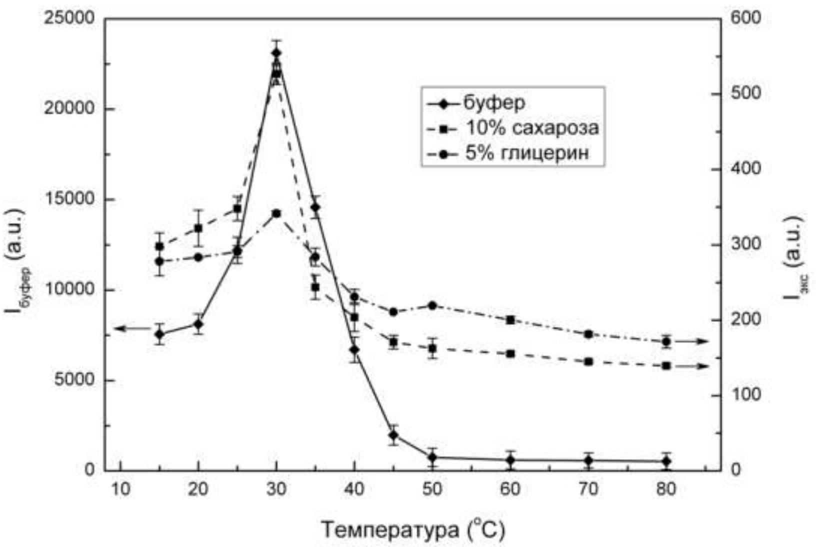


Рисунок 4.5. — Температурная зависимость максимальной интенсивности свечения триферментной системы ЛДГ + Р + Л в присутствии 10% сахарозы и 5% глицерина. Правая Y-ось показывает активность триферментной системы в присутствии осмолитов, левая Y-ось - активность триферментной системы в буфере.

Из рисунка видно, что температурный оптимум триферментной системы составляет 30°С. Также, как и в случае Р + Л системы, присутствие в реакционной среде небольших концентраций глицерина и сахарозы (5-10%) не приводит к изменению активности триферментной системы от температуры. Дальнейшее повышение содержания водно-глицериновых и водно-сахарозных растворов (>10%) в реакционной среде не приводит к повышению температурной резистентности триферментной ЛДГ + Р + Л системы, как это наблюдалось ранее в случае Р + Л системы при температурах выше 25°C (рисунок 4.1.). Кроме этого, как в присутствии водно-глицериновых растворов 20% и 50%, так и в присутствии водно-сахарозных растворов 20% и 40%, в системе перестает наблюдаться явный пик активности ферментативной системы при температуре 30°C (рисунок 4.6.), который наблюдается в контроле и в присутствии 5% глицерина и 10% сахарозы (рисунок 4.2.). Одинаковая степень воздействия различных концентраций глицерина и сахарозы на активность триферментной системы при различных температурах, скорее всего, свидетельствует о доминирующем воздействии вязкости реакционной среды на активность системы ЛДГ + Р + Л, чем природы используемых осмотлитов.

(а) (б)

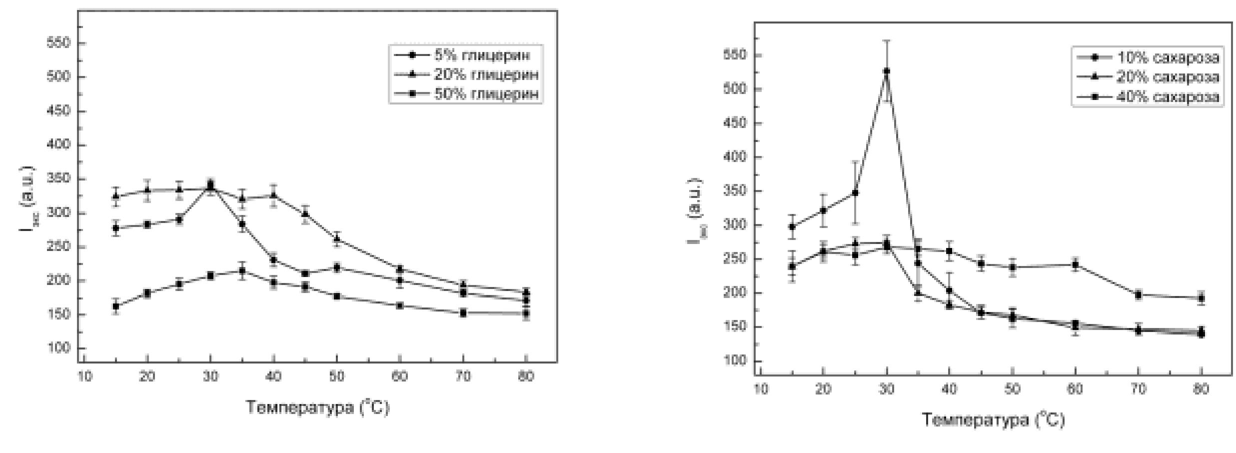


Рисунок 4.6. – Температурная зависимость активности триферментной системы ЛДГ + НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза в присутствии различных концентраций глицерина (а) и сахарозы (б).

Интересным является вопрос о том, почему в триферментной ЛДГ + Р + Л системе не проявляется полученное ранее увеличение каталитической активности Р + Л системы при температуре 35°C в присутствии 50% глицерина и 40%

сахарозы по сравнению с контрольным значением (рисунок 4.1.). В ЛДГ + Р + Л системе, лимитирующим фактором каталитической активности Р + Л системы является ЛДГ, так как в именно от активности ЛДГ зависит скорость насыщения сопряженной системы НАДН, необходимого для функционирования Р + Л системы [11]. Как было показано ранее, присутствие небольших концентраций (0-10%) глицерина и сахарозы незначительно сказываются на уменьшении максимальной скорости реакции (V_{max}) катализируемой ЛДГ. При превышении указанного выше диапазона концентраций органических растворителей у ЛДГ начинает наблюдаться резкое уменьшение величины V_{max}. Установлено что значение V_{max} уменьшается с 8,5 относительных единиц, полученных в контроле, до 1,5 относительных единиц в присутствии 44% сахарозы. В 63% глицерине происходит снижение величины V_{max} ЛДГ в 6,5 раз по сравнению с контрольными значениями [130]. Таким образом, в триферментной ЛДГ + Р + Л системе не происходит насыщение Р + Л системы субстратом НАДН, что ведет к отклонению ферментативной системы от стандартных условий [153]. Этим же, скорее всего, можно объяснить отсутствие пиков интенсивности свечения триферментной системы в присутствии концентраций глицерина и сахарозы, превышающих 10%, при варьировании температуры.

Причина высокой чувствительности ЛДГ к вязкому микроокружению до сих пор не выяснена. Исходя из расшифрованной пространственной структуры ЛДГ и Л, два этих фермента содержат мобильную петлю в районе активного центра, которая способствует более крепкой посадке субстрата в активный центр и защищает его от воды и других растворителей [116,122]. Сравнивая чувствительности ЛДГ и Л к вязким средам можно сделать вывод, что Л менее чувствительна к вязкому микроокружению, видимо за счет более подвижной и эластичной пространственной структуры, чем ЛДГ [11]. Так, например, для моноферментной Л и биферментной Р + Л систем было показано, что в присутствии глицерина и сахарозы, в концентрация от 0-15%, наблюдается низкая чувствительность данных ферментативных систем к вязкости реакционной среды [5,146]. С чем связана наблюдаемая высокая чувствительность ЛДГ к вязкому микроокружению – на этот вопрос, в настоящее время, нет единого ответа. Одни авторы считают, что наибольший вклад в вязкостную зависимость активности ЛДГ вносит уменьшение подвижности мобильной петли около активного центра. Доказательством этого предположения служит тот факт, что активность ЛДГ уменьшается прямо пропорционально добавляемой концентрации глицерина или сахарозы [130]. В тоже время, есть исследователи, которые считают, что основным лимитирующим параметром в акте катализа ЛДГ является процесс формирования фотонного состояния у аминокислотного остатка His192, расположенного в активном центре фермента. Ранее было показано, что вязкое микроокружение может приводить к уменьшению эффективного образования фотонного состояния His192 [122,125]. Кроме этого, существуют предположения о том, что процессы открытия/закрытия мобильной петли около активного центра ЛДГ и процесс формирования фотонного состояния His192 должны проходить в одной временной координате, а повышенная вязкость микроокружения может нарушать эти сопряженные процессы, что приводит к резкому уменьшению каталитической активности ЛДГ [122, 130].

Как и в случае для биферментной системы, были рассчитаны значения энергии активации (E_a) ЛДГ + Р + Л системы в присутствии сахарозы и глицерина при температуре t= 35ºC, чтобы выявить дополнительные условия, приводящие к наблюдаемой низкой температурной стабильности триферментной системы. Полученные значения энергии активации составили: 85,7 ± 0,1; 35,1 ± 0,9 и 77,5 ± 0,8 кДж/моль в присутствии сахарозы, глицерина и буфера, соответственно. Как было указано выше, значения E_a характеризуют ограничение пространственной подвижности белковых глобул в присутствии модельных агентов, моделирующих значения вязкости реакционной среды [7]. Следует отметить, что, во-первых, в присутствии сахарозы происходит существенное ограничение пространственной подвижность белковых глобул, входящих в состав триферментной системы, чем в буфере и в присутствии глицерина. Такая же манера ограничения пространственной подвижности белковых глобул наблюдалась и для Р + Л системы. Во-вторых, в присутствии водно-глицериновых растворов происходит уменьшение величины E_a триферментной системы в 2,2 раза по сравнению с контрольным значением, похожий тренд уменьшения величины E_a был получен при исследовании биферментной системы.

Примечательно, что, несмотря на формирование более благоприятных, с точки зрения термодинамики, условий в триферментной системе в присутствии глицерина в системе не наблюдается никаких позитивных изменений каталитической активности системы. Скорее всего, лимитирующим фактором триферментной системы является активность ЛДГ. Как было показано ранее, значительное уменьшение активности ЛДГ происходит при увеличении добавляемых в реакционную смесь концентраций глицерина и сахарозы более 40 об. % [130]. Полученные нами результаты, показывают, что даже присутствие в реакционной среде 10-20 об. % осмолитов негативно сказывается на каталитической активности ЛДГ, что ведет к отклонению ферментативной системы от стандартных условий [153]. Этим же, скорее всего, можно объяснить отсутствие максимумов интенсивности свечения триферментной системы в присутствии концентраций глицерина и сахарозы, превышающих 10%, при варьировании температурных условий.

Инактивация триферментной системы соответствует кинетике реакции второго порядка, причем инактивация ЛДГ + Р + Л системы включает в себя два разных механизма, которые последовательно сменяют друг друга и происходят с разными скоростями. Как известно, ЛДГ, Р и Л имеют четвертичную структуру и представляют собой тетрамерный фермент, гомодимер и гетеродимер, соответственно [115,117,124]. Следовательно, первой стадией инактивации триферментной системы, вероятно, является диссоциация ферментов на субъединицы. Полулогарифмические кривые инактивации ЛДГ + Р + Л системы представляют собой два «линейных» участка (рисунок 4.7). Диссоциация ферментных субъединиц соответствует первому «линейному» графику. После диссоциации происходит необратимая денатурация фермента, которой соответствует второй «линейный» участок кинетической кривой термоинактивации. Таким образом, термоинактивация триферментной ЛДГ + Р +

Л системы может быть объяснена диссоциативным механизмом, который характерен для большинства олигомерных белков [11, 126,127].

(а) (б)

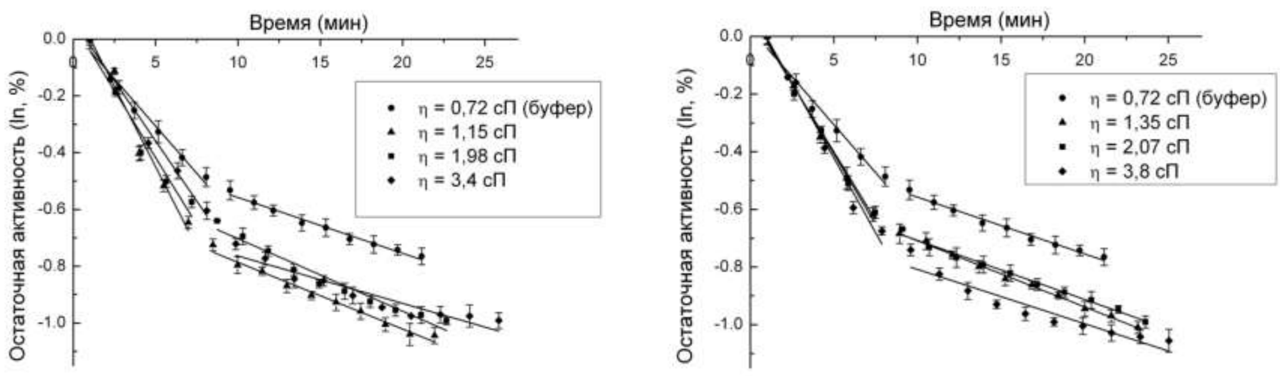


Рисунок 4.7. — Термоинактивация триферментной системы ЛДГ + Р + Л в присутствии глицерина (а) и сахарозы (б) при 35 °С. Концентрации глицерина и сахарозы выражены в виде значений вязкости.

4.4. Выводы по главе

Проведенные исследования активности биферментной и триферментной систем при варьировании значений вязкости реакционной среды и температуры показали: во-первых, повышенные значения вязкости реакционной среды приводят к повышению термостабильности биферментной Р + Л системы. В Р + Л системе наблюдается увеличение каталитической активности при температуре 35°С в присутствии 50% глицерина и 40% сахарозы. Во-вторых, вязкое микроокружение сказывается на пространственной подвижности исследуемых ферментов. При этом на основании полученных значений E_a, имитирование эффектов вязкости реакционной среды путем добавления водно-сахарозных растворов ведет к более существенному ограничению пространственной подвижности ферментов в исследуемых системах, чем при добавлении водно-глицериновых растворов. Существенное ограничение пространственной подвижности в присутствии сахарозы скорее всего связано с высокой гидрофильностью молекул сахаров, добавление сахаров в большем количестве приводит к увеличению общей фракции упаковки раствора. Таким образом, такой высоко упакованный раствор, как «шуба» защищает пространственную структуру белков от воздействия критических для них температур [9].

Отдельно стоит отметить, что несмотря на то, что в присутствии глицерина происходит снижение значения E_a для триферментной ЛДГ + Р + Л системы, в 2,2 раза по сравнению с контрольным значением, в системе все не увеличение каталитической активности ЛДГ + Р + Л системы, как например, в случае Р + Л системы (рисунок 4.1). Другими словами, три сопряженных фермента в системе не используют сформировавшееся энергетически выгодное положение для реализации кооперативных взаимодействий, которые являются неотъемлемыми и представляют собой часть коммуникационной сети в макромолекулярном ансамбле ферментов [97]. Данный факт, позволяет ввести новый критерий оценки адекватного ферментативного конструирования ферментативных систем по изменению параметра термостабильности сопряженных ферментативных систем.

ГЛАВА 5. Оценка возможности применения полиферментных систем *in vitro* в качестве тест-систем в биолюминесцентных ферментативных биотестах для оценки загрязнения почв поллютантами и определения потенциальной токсичности наноматериалов

Глава 5 содержит информацию о перспективах применения полиферментных систем с люциферазой в биолюминесцентных ферментативных биотестах для оценки токсичности наноматериалов, пестицидов и тяжелых металлов на основе анализа чувствительности сконструированных Р + Л и ЛДГ + Р + Л систем к этим веществам.

5.1. Анализ чувствительности растворимой биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза к одностенным и многостенным углеродным нанотрубкам и наноматериалам

В работы было проведено исследование влияния коммерчески доступных одностенных и многостенных углеродных нанотрубок и химически модифицированного фуллерена на активность биферментной Р + Л системы. В качестве контрольного раствора использовали раствор лаурилсульфата натрия концентрации 1 мг/л. Установлено, что лаурилсульфат натрия указанной концентрации не оказывает влияния на активность растворимой биферментной системы светящихся бактерий. Показано, что одностенные углеродные нанотрубки (ОСУНТ) производства ООО «Углерод Чг» ингибируют активность растворимой биферментной Р + Л системы (рисунок 5.1). Эффективные действующие концентрации ОСУНТ, вызывающие снижение максимальной интенсивности свечения Р + Л системы на 50 % (IC_{50}) и 20 % (IC_{20}) составляют 0,18 и 0,04 мкг/мл, соответственно. Результаты получены с учетом оптических свойств и внесеных необходимых корректировок показаний интенсивности свечения биферментной системы в присутствии ОСУНТ.

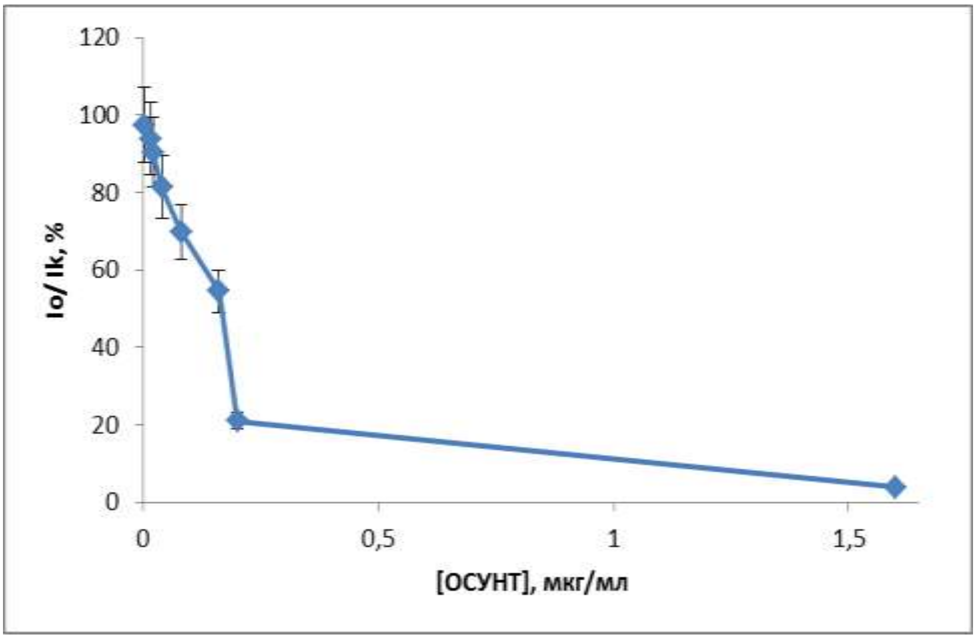


Рисунок 5.1. — Зависимость остаточной интенсивности свечения растворимой биферментной Р + Л системы от концентрации ОСУНТ.

Также было установлено, что многостенное углердное нановолкно (МСУНТ) оказывает ингибирующее воздействие на растворимую биферментную Р + Л систему (рисунок. 5.2).

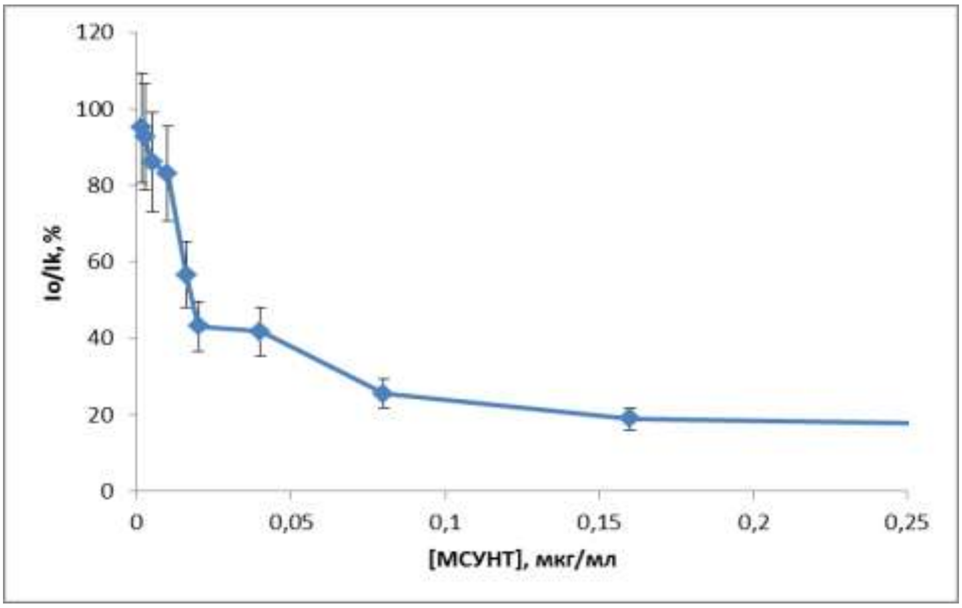


Рисунок 5.2. — Зависимость остаточной интенсивности свечения растворимой биферментной Р + Л системы от концентрации МСУНТ.

Эффективные действующие концентрации МСУНТ, вызывающие снижение максимальной интенсивности свечения растворимой системы на 50% и 20% составляют 0,018 и 0,012 мкг/мл, соответственно.

Так же было исследовано влияние образцов гидратированных фуллеренов (C_{60}FWS) с исходной концентрациями 20 и 105 мкМ на активность растворимой биферментной Р + Л системы. Исходные препараты представляли собой жидкости, запаянные в стеклянные ампулы по 10 мл. На рисунке 5.3. представлена зависимость остаточной интенсивности свечения Р + Л системы от концентрации C_{60}FWS в реакционной смеси. Из рисунка видно, что растворы C_{60}FWS оказывают незначительный ингибирующий эффект на интенсивность свечения растворимой биферментной Р + Л системы. Из-за незначительной степени влияния исследованных растворов фуллеренов на активность биферментной системы, значения параметра IC_{50} для C_{60}FWS определить не удалось, значение параметра IC_{20} составило 5,2 мкМ [145].

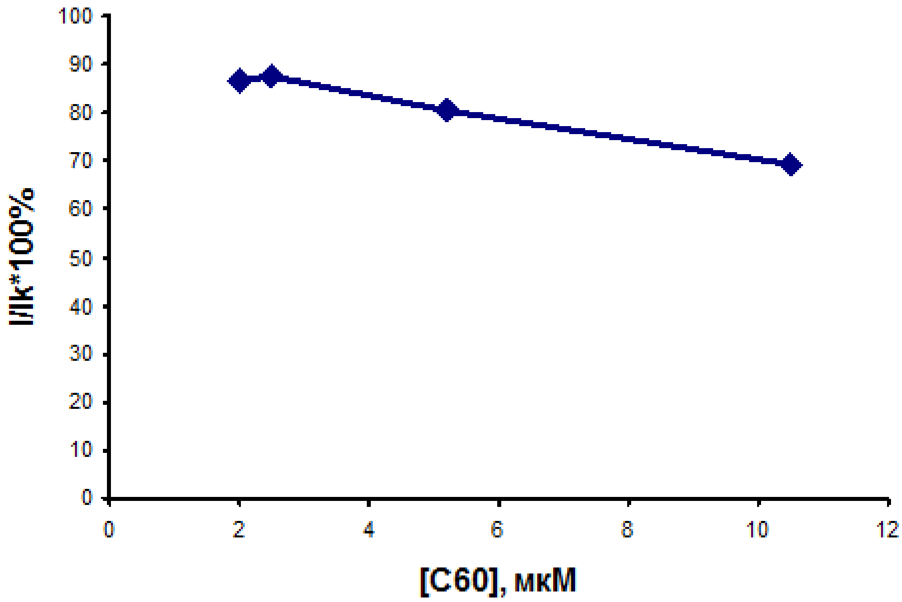


Рисунок 5.3. — Зависимость остаточной интенсивности свечения биферментной Р + Л системы от концентрации гидратированных фуллеренов C_{60}FWS в реакционной смеси.

В дополнении, было исследовано действие продукта «Вода с гидратированным фуллереном C_{60}» на растворимую биферментную систему (коммерческий продукт

«Water of life»). При добавлении 50 мкл исследуемого образца в реакционную смесь остаточное свечение Р + Л системы составляло 87,4%. Поэтому продукт «Вода с гидратированным фуллереном C_{60}» является не токсичным и может использоваться в качестве стандартного (контрольного) образца при исследовании потенциальной токсичности водных растворов наноматериалов [154].

В таблице 5.1. приведены значения параметров ингибирования IC_{50} и IC_{20}, полученные на основе экспериментальных данных по изучению влияния наноматериалов разных классов на биолюминесцентную Р + Л тест-систему.

Таблица 5.1. — Значения параметров ингибирования IC_{50} и IC_{20} (мг/л) определенных во время оценки влияния УНТ на интенсивность свечения растворимой Р + Л системы.

Анализируемый материал		Растворимая биферментная Р + Л система	
		IC_{50}	IC_{20}
Наноматериалы на основе углерода	ОСУНТ	0,16 ± 0,03	0,04 ± 0,01
	МСУНТ	0,012 ± 0,003	0,004 ± 0,001
	Фуллерены	н/о	3,7 ± 0,7

Из таблицы видно, что для большинства исследованных образцов наночастиц и наноматериалов характерно ингибирующее воздействие на активность биолюминесцентной Р + Л тест-системы. Стоит отметить, что наибольшей чувствительностью Р + Л система обладает к МСУНТ образцам. Обнаруженое ингибирующее действие углеродных наноматериалов (УНТ) на биферментную Р + Л систему согласуется с полученными ранее результатами, другими авторами. Например, в работе по определению токсического действия УНТ на интенсивность свечения люминесцентных бактерий, было обнаружено стимулирующее действие УНТ на светящиеся бактерии после 30–45 минут их инкубации в растворе с УНТ, что, по-видимому, связано с адаптацией метаболических процессов у бактерий, снижающих токсическое действие УНТ

[155]. Действительно, увеличение времени контакта между бактериями и УНТ до 180 минут и дольше приводило к значительному ингибирующему эффекту вместо стимуляционных эффектов [155-156]. Кроме того, было установлено, что величина токсикологического параметра IC_{50} для ОСУНТ и МСУНТ, при использовании в качестве тест-системы клетки светящихся бактерий на 2–3 порядка выше по сравнению со значениями, представленными в таблице 5.1. [156-157].

О возможной потенциальной опасности попадания исследованных УНТ в окружающую среду можно судить по величине - прогнозируемая концентрация наночастиц в окружающей среде (ПКН). Рассчитанные значения ПНК для углеродных нанотрубок составляют 0,001–0,8 нг/л и 3,69–32,66 нг/л для поверхностных вод и сточных вод очистных сооружений, соответственно [158]. Хотя полученные значения IC_{50}, приведенные в таблице 5.1., для УНТ значительно выше, чем рассчитанные значения ПНК, в ситуации резкого увеличения производства и использования УНТ можно сделать вывод о потенциальной токсичности этих материалов для живых организмов (прежде всего на молекулярном уровне).

В отличие от наноматериалов на основе углеродных нанотрубок, водные растворы $C_{60}HyFn$ представляют больший интерес, поскольку производители предлагают использовать их в качестве стандартного (эталонного) образца при тестировании различных наноструктур и наноматериалов на предмет их токсикологических характеристик и экологической безопасности [154]. Кроме того, правительство Министерства здравоохранения Украины одобрило промышленное использование растворов «гидратированного концентрата фуллерена C_{60}» в качестве одной из антиоксидантных добавок в пищевой, парфюмерной, косметической, биотехнологической и микробиологической промышленности [159]. Рекомендуемый диапазон концентраций $C_{60}HyFn$ в конечном продукте по последнему протоколу Министерства составляет 0,1 мкг/л – 1 мг/л. При этом стоит отметить, что концентрация $C_{60}HyFn$ выше 0,5 мг/л оказывает существенного ингибирующее действие на биферментную Р + Л тест-систему [145].

Таким образом, исследованные УНТ образцы обладают ярко выраженным ингибирующим эффектом на ферментативную Р + Л систему светящихся бактерий, что свидетельствует об отрицательном влиянии УНТ на молекулярный уровень биологических систем. Р + Л система обладает высокой чувствительностью к МСУНТ и ОСУНТ-образцам, и не обладает высокой чувствительностью к C_{60}HyFn. Ингибирующий эффект УНМ на активность биферментной системы уменьшается в следующем порядке: МСУНТ> ОСУНТ> C_{60}HyFn, что коррелирует с выявленными ранее эффектами токсичности УНТ при проведении биолюминесцентного анализа с использованием клеток светящихся бактерий [145,155]. Таким образом, биферментная Р + Л система подходит для выявления потенциальной токсичности УНМ и может быть использована в качестве тест-системы при разработке новых методов скрининга токсичности различных наноматериалов. Анализ, на основе Р + Л системы, прост, занимает всего 2-3 минуты и имеет чувствительность сравнимую или превосходящую с другими, используемыми в настоящий момент, методами токсикологического анализа [145,160].

5.2. Сравнение чувствительности моно-, би- и триферментной систем к пестицидам и ионам металлов для оценки возможности их использования в качестве биотестов для экологического мониторинга почв

Объектом исследования являлись 5 эталонных образцов почв (песок, легкий суглинок, средний суглинок, тяжелый суглинок, чернозём), отобранных в соответствии с ГОСТ [161]. Экстракты из почв были приготовлены с использованием дистиллированной воды по следующей технологии: навеску почвы 5 г разводили 5-кратным объёмом дистиллированной воды. Данную смесь выдерживали 30 мин при непрерывном перемешивании при комнатной температуре, затем фильтровали. В качестве загрязняющих веществ выбраны пестициды малатион и диазинон, а также хлорид меди (II). На первом этапе исследовали действие водных растворов токсикантов малатиона, диазинона, хлорида меди (II) на активность трех ферментативных систем Р, Р + Л и ЛДГ + Р + Л (таблица 5.2., образец $_{д}$H2O). По параметру ингибирования IC_{20} установлено, что моноферментная Р система малочувствительна к воздействию водных растворов малатиона (IC_{20} >> ПДК). Поэтому в экспериментах по оценке чувствительности Р системы к токсикантам, содержащимся в экстрактах из почв, малатион был исключен. При работе с би- и триферментной системами анализировали воздействие на активность ферментов каждого из трех токсикантов.

Таблица 5.2. — Параметр ингибирования IC_{20} (мг/кг) для исследованных загрязнителей при использовании ферментативных тест-систем Р, Р + Л и ЛДГ + Р + Л.

Образец	Малатион			Диазинон			Хлорид меди (II)		
	Р	Р+Л	ЛДГ+ Р+Л	Р	Р+Л	ЛДГ+ Р+Л	Р	Р+Л	ЛДГ+ Р+Л
дH_2O	4400	39	2	350	1,3	0,35	0,4	0,06	0,004
Песок	-	30	1	1500	1,15	0,15	169,8	0,21	0,004
Легкий суглинок	-	600	20	300	9	3	6,35	0,12	0,004
Средний суглинок	-	130	20	1800	2,4	0,5	17	0,03	0,16
Тяжелый суглинок	-	18,5	8	300	16,5	0,15	21,25	0,55	0,04
Чернозем	-	39	1	3000	1,7	0,3	255	0,7	0,0045
ПДК	1,0[162]			0,1[162]			3,0[163]		

На следующем этапе исследовали влияние на ферментативные системы пяти незагрязненных образцов почв с различным содержанием гумуса: песка, легкого суглинка, среднего суглинка, тяжелого суглинка и чернозёма. Показано, что из пяти почвенных экстрактов на активность моноферментной Р системы существенное ингибирующее воздействие оказывает только экстракт из чернозема ($I_{остаточное}$ = 65%). Активность биферментной Р + Л системы существенно снижалась в присутствии трех из исследуемых почвенных образцов: легкого суглинка ($I_{остаточное}$ = 19%), среднего суглинка ($I_{остаточное}$ = 40%) и чернозема ($I_{остаточное}$ = 20%). На активность триферментной ЛДГ + Р + Л системы ингибирующее воздействие оказали экстракты из песчаной почвы ($I_{остаточное}$ = 56%), тяжелого суглинка ($I_{остаточное}$ = 59%) и чернозема ($I_{остаточное}$ = 36%). В дальнейшем для исключения влияния компонентов незагрязненной почвы на результаты ферментативного тестирования в качестве контроля использовали водный экстракт из почвы соответствующего типа.

Так же, были проведены модельные эксперименты оценки чувствительности ферментативных систем к воздействию токсических веществ при их внесении непосредственно в экстракты из почв. Варьируя концентрацию загрязнителя, определяли значения его параметра ингибирования IC_{20}, показывающего предел чувствительности к нему ферментативной системы (таблица 5.2.). Установлено, что смешивание токсикантов с экстрактом из почв в большинстве случаев приводит к снижению их ингибирующего воздействия на ферментативные системы. Особенно это выражено для хлорида меди, чувствительность к которому падает на три и один порядок при тестировании этого токсиканта в экстракте из чернозема с помощью моно- и биферментной Р + Л систем, соответственно, и на один порядок при его тестировании в экстракте из среднего суглинка с помощью ЛДГ + Р + Л системы.

Кроме того, сравнительный анализ активности ферментных систем в присутствии загрязненных и незагрязненных экстрактов почв показал, что активность моноферментной Р системы в присутствии экстрактов почв, загрязненных хлоридом меди, не отличается от активности фермента в присутствии экстрактов незагрязненных почв. Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что моноферментная Р система не позволяет фиксировать загрязнение почв хлоридом меди на уровне, близком к ПДК для данного вещества [144].

В дополнение, была изученность возможность формирования комплексного метода биотестирования почвенных образцов с помощью широкого класса ферментативных тест-систем. Это было сделано на основе предположения о том, что для точного и комплексного токсикологического анализа почвенных образцов необходимо большое количество используемых ферментативных систем. Для проверки этого предположения была проведена оценка ингибирующего эффекта почвенных токсикантов на функционирование следующих ферментативных систем *in vitro*: моноферментные реакции, катализируемые алкогольдегидрогеназой (АДГ), трипсином (Тр), бутирилхолинэстеразой (БуХЭ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой (Г6ФД), НАДН:ФМН-оксидоредуктазой (Р); биферментная система, катализируемая НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза (Р + Л); триферментные системы: НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза + глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ + Р + Л); НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза + алкогольдегидрогеназа (АДГ + Р + Л). Исследование действия водных растворов хлорида меди (II) на ферментативные системы *in vitro* выявило ограничения используемых оптических методов оценки активности ферментов, выбранных ферментативных систем. В частности, использованный в работе метод анализа активности БуХЭ является непригодными для установления токсического эффекта хлорида меди (II) на данный фермент, так как ионы тяжелых металлов изменяют структуру красящего комплекса, вследствие чего создается ложное представление об ингибировании активности БуХЭ [164]. Следует отметить, что ферментативные системы *in vitro* различались по чувствительности к хлориду меди. Увеличение чувствительности к водным растворам хлорида меди (II) наблюдалось в следующей последовательности: АДГ <Р <Р + Л <ЛДГ + Р + Л.

Вследствие ограничений используемых аналитических методов, не удалось установить достоверных закономерностей влияния пестицидов - малатиона и диазинона, на функционирование следующих моноферментных реакций: АДГ, Тр, Р и Г6ФД. Данное ограничение связано с ложными эффектами стимулирующего действия пестицидов на активность ферментов из-за высоких значений оптической плотности растворов малатиона и диазинона на используемой в анализе длине волны регистрации сигнала [165].

На основе проведенных исследований по анализу чувствительности ферментативных систем, различного уровня сложности, к разным классам токсических веществ показано, что первоначально предлагаемое количество ферментативных методов для включения в комплексную тест-систему является избыточным, поскольку некоторые ферментативные реакции не чувствительны к воздействию модельных токсикантов. При этом, важно отметить, что при выборе ферментативных систем для боитестирования эти системы должны проявлять избирательную чувствительность к определенным классам токсикантов и разным типам почв, для обеспечения всестороннего ответа при оценке загрязнения сред сложного состава [165]. В дополнение, полученные в работе результаты указывают на широкие возможности для управления чувствительностью ферментативных биотестов к токсикантам в почве за счет удлинения цепи сопряжения ферментов или подбора системы, подверженной наименьшему влиянию естественных компонентов почвы. Действительно, показано, что повышение сложности системы (от моно- до триферментной) в несколько раз увеличивает чувствительность ферментативного биотеста (таблица 5.2). Однако, с другой стороны, исследование выявило трудности проведения ферментативного биотестирования почв, связанные с активным влиянием экстрактов из почв как на активность ферментативных систем, так и на их взаимодействие с токсикантами. Полученные результаты о различном воздействии незагрязненных экстрактов из почв на три ферментативные системы – Р, Р + Л и ЛДГ + Р + Л, открывают возможности для конструирования специализированных ферментативных биотестов для целей мониторинга экологической безопасности почв различного компонентного состава и загрязненности [144].

5.3. Разработка программного обеспечения для сравнения стандартной активности ферментативных биотестов при тестировании степени загрязнения почвенных образцов

Решение проблемы интерпретации результатов исследований сред сложного состава может быть найдено путем привлечения проб – стандартов сравнения. При таком подходе при исследовании проб учитывается собственное влияние образца. Успех поиска стандарта напрямую зависит от метода измерений и приближений. Чаще всего для поиска расстояния между объектами, обладающими количественными характеристиками и одинаковой размерности, используют эвклидово пространство. Входными данными является массив векторов m ×n, где m - количество атрибутов стандартного образца почвы, а n - количество стандартов. Для удобства представления было проведено реконструирование данные до вида матрицы:

$$X = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \cdots & x_{1n} \\ x_{21} & x_{22} & \cdots & x_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{m1} & x_{m2} & \cdots & x_{mn} \end{bmatrix} \quad (1)$$

На вход поступают введенные данные по одному экспериментальному образцу почвы, которые преобразуются в один вектор-столбец размерности m ×1

$$Y = \begin{pmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_n \end{pmatrix} \quad (2)$$

Процесс поиска максимально приближенного стандартного образца происходит путем прохождения данных по сетке подбора значений (рисунок 5.4.). На выходе алгоритма получаем найденный стандартный образец. Перед отображением данных на одном графике происходит процесс унифицирования данных для их единообразия по формуле $y = (y_i/y_{max})*100\%$. Приведение всех данных к одной шкале позволяет точнее оценить вклад каждого из параметров, отображая их на одном графике в одном масштабе.

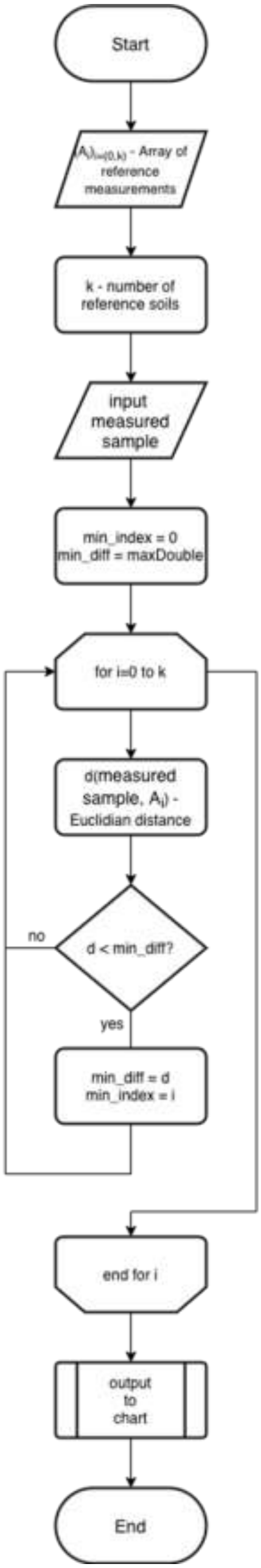
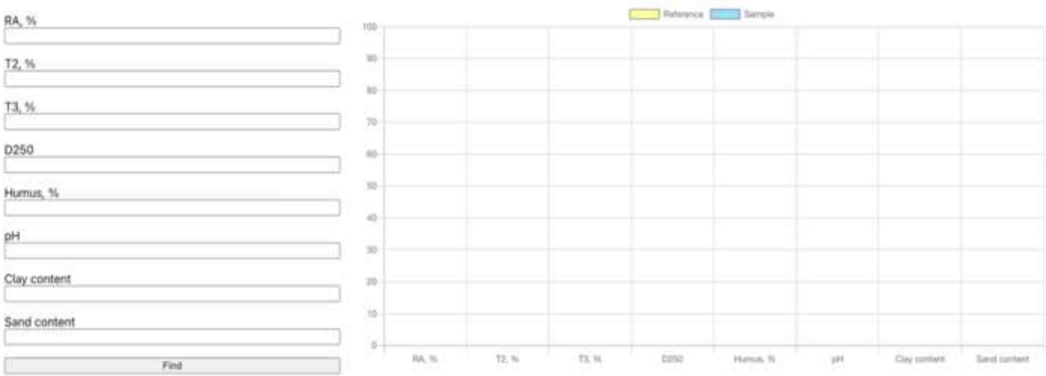


Рисунок 5.4. — Блок-схема поиска референса с минимальным отклонением с использованием евклидова расстояния.

Для заполнения базы данных программы информацией о стандартных почвенных грунтах и их влиянии на ферментативные системы, был исследован 51 образец условно чистых модельных почв и грунтов. Образцы почвенных грунтов имели разный гранулометрический состав, $pH_{сол}$ и сильно отличались по содержанию гумуса, который изменяется в очень широких пределах, от 0,37 до 8,50%, с переходом через 1, 3, 5%. Содержание физической глины колебалось от 8,6 до 47,5%, а разновидности были представлены связным песком, супесью, легким, средним и тяжелым суглинками. Значения pH солевой суспензии также были различным, от 5,45 до 8,00 единиц, что указывает на слабокислую, близкую к нейтральной, нейтральную, слабощелочную и щелочную реакцию среды. Анализ всех полученных данных позволяет утверждать, что в опытах, для наполения програмного обеспечения данными, были использованы самые различные почвы и породы с широким спектром варьирования основных свойств.

Было изучено влияние водных вытяжек из стандартных прочвенных грунтов на моно-, би- и триферментные системы. Для моноферментной БуХЭ системы значительного ингибирования почвенным экстрактами не наблюдалось. Показатель остаточной активности (ОА,%) системы не опускался ниже 95%. Для части образцов наблюдался обратный эффект активации (увеличение ОА относительно контроля), в отдельных случаях ОА достигала уровня 155%. Остаточное свечение (T^2, %) биферментной системы находилось в диапазоне от 49% до 103%. Наибольший ингибирующий эффект на активность Р + Л системы оказывали образцы почвенных грунтов из групп с большим содержанием гумуса и более тяжелым гранулометрическим составом. Остаточное свечение триферментной системы (T^3, %) изменялось в диапазоне от 22% до 100%, что говорит об её высокой чувствительности к компонентам почвы. По полученным результатам воздействия образцов стандартных почвенных образцов прослеживается четкая закономерность от группы проб: чем тяжелее почва по гранулометрическому составу, тем выше оптическая плотность экстракта из этой почвы. Вышеперечисленные измеренные параметры в совокупности с почвенным характеристиками (содержание гумуса, pH и гранулометрический состав) вносили в программу. Данные стандарты были собраны, описаны, проанализированы, после чего категоризированы, приведены к общему виду и добавлены в общую базу данных. Таким образом, база данных состоит из 51 почвенного образца эталона, разделенных на 17 категорий – типов (условные обозначения категорий почвенных грунтов). В каждой из категорий по три различных примера эталона.

(а)



(б)

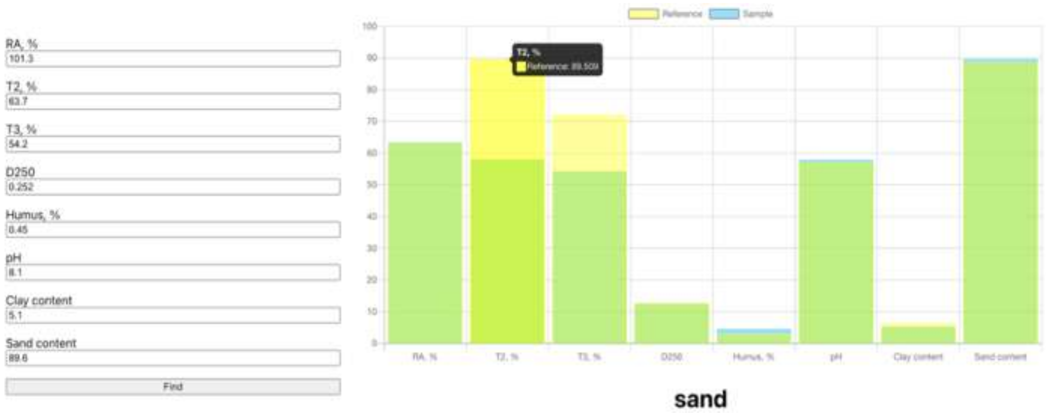


Рисунок 5.5. — Внешний вид программы: (а) при запуске из браузера; (б) при заполнении полей ввода и подборе подходящего стандартного почвенного грунта.

На языке программирования JavaScript была разработана программа, опирающаяся на алгоритм (Рисунок 5.4.). Суть работы программы заключается в том, что при вводе экспериментальных данных программа находит запись информации об образце сравнения и передает данные о стандарте и введенном образце на библиотеку с графиками (chart.js). После чего найденный стандартный и анализируемый образец отображаются на совмещенном графике. Внешний вид программы включает в себя поля ввода, кнопку вывода данных и графическую область. При запуске программы поля ввода данных не заполнены (Рисунок 5.5.а.).

В программе предусмотрено также отображение столбцов стандарта и пробы по отдельности, которое включается и выключается при выборе соответствующей категории в легенде в верхней части графика (Рисунок 5.6.).

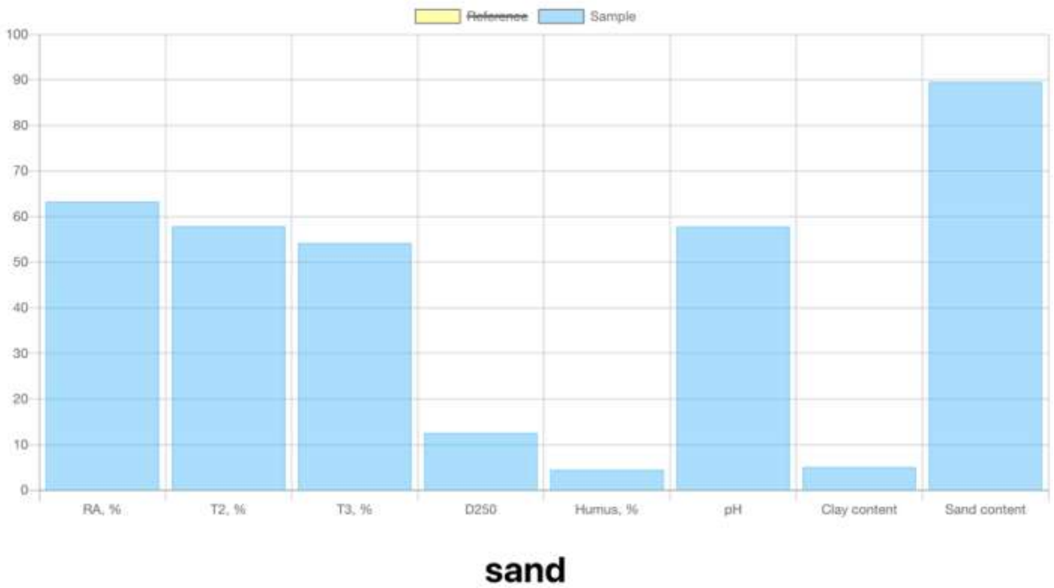


Рисунок 5.6. — Внешний вид графического блока программы, категория «reference» не активна, отображаются данные только для «sample».

Явным преимуществом программы является наличие вариативных стандартных почвенный грунтов, информация о которых уже содержится в ней, и подбор стандарта сравнения на основе почвенных характеристик для анализируемых образцов. Принцип построения программы позволяет, при условии предварительного отбора и анализа почв и почвенных грунтов, характерных для различных территорий, вносить их в базу данных программы в качестве стандартных почвенных образцов [166].

5.4. Выводы по главе

В результате проведенных исследований, во-первых, была показана возможность применения биферментной Р + Л биолюминесцентной системы в качестве тест-объекта для определения потенциальной токсичности использования УНТ. При этом, стоит отметить, что Р + Л система обладает высокой чувствительностью к МСУНТ-образцам. Кроме этого, биферментатная Р + Л система является более чувствительной, чем методы определения токсичности УНТ с использованием светящихся бактерий. Во-вторых, определение чувствительности ферментативных систем различной сложности, позволили заложить основы концепции комплексной оценки загрязнения почвы, в которой заключение о наличии токсических веществ в анализируемой пробе делаются на основе ингибирования ими ферментативных реакций, отвечающих за проявление разных функций живого организма, таких как свечение, дыхание и других, принятых как тестовые функции в классическом биотестировании с использованием живых объектов (светящиеся бактерии, дафнии, водоросли и так далее). В концепции комплексной оценки загрязнения почв, основанной на использовании набора ферментативных тестов, установлены закономерности воздействия разных классов токсикантов на активность отдельных моноферментных или олигоферментных цепей сопряжения, выбранных в качестве потенциальных тест-объектов - маркеров загрязнения. Для комплексной ферментативной тест-системы выбраны ферментные системы, обладающие максимальной чувствительностью к разным классам токсикантов – моноферментные системы (БуХЭ, Р), биферментная Р + Л система и триферментная система ЛДГ + Р + Л. Показана возможность использования ферментативных тестов вместо живых организмов при биотестировании сложных природных сред. В-третьих, было разработано специализированное программное обеспечение ферментативного биосенсора для анализа загрязнения почв и почвенных грунтов. Данная программа содержит информацию о характеристиках стандартных почвенных грунтов и влиянии водных экстрактов из этих почв на три ферментативные системы (БуХЭ, Р + Л, ЛДГ + Р + Л). Эту информацию можно рассматривать как фоновое ингибирование, которое оказывается на компоненты биологического модуля биосенсора со стороны почвенных образцов, что является ценной составляющей. Программа может найти широкое применение в области экологического мониторинга [166].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования влияния вязкости реакционной среды на активность би- и триферментной систем позволили установить, что биферментная Р + Л система является потенциально пригодной для создания экспериментальной модели исследования внутриклеточного поведения ферментов. Исследованная Р + Л система удовлетворяет большинству предъявляемых, в настоящее время, требований к ферментативным системам для исследования их поведения во внутриклеточных условиях [167-169]. Предложенный критерий оценки эффективности взаимодействия сопряженных ферментов по изменению термостабильности показал, что в триферментной системе ЛДГ + Р + Л теряется сопряжение по НАДН при увеличении вязкости микроокружения, в то время как эффективность сопряжения ферментов в биферментной системе Р + Л сохраняется.

Практические аспекты проведенного исследования показали возможность применения биферментной Р + Л системы в качестве тест-системы для определения потенциальной токсичности использования наноматериалов и наночастиц. Кроме этого, были заложены основы для формирования концепции комплексной оценки загрязнения почв, основанной на использовании набора ферментативных тестов. Были установлены закономерности воздействия разных классов токсикантов на активность отдельных моноферментных и олигоферментных цепей сопряжения, выбранных в качестве потенциальных тест-объектов и маркеров загрязнения.

ВЫВОДЫ

1. Изменение кинетических и термодинамических параметров биферментной (НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза) и триферментной (лактатдегидрогеназа + НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза) систем в растворах повышенной вязкости реакционной среды показало, что для моделирования физико-химических характеристик клеточной гиалоплазмы предпочтительнее использовать водные растворы глицерина.

2. Показано, что присутствие в реакционной среде глицерина и сахарозы ведет к повышению термостабильности биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза при температурах выше +30°С. Увеличение термостабильности системы в растворах повышенной вязкости можно интерпретировать как интегральный показатель эффективности работы ферментов сопряженных с бактериальной люциферазой для оценки возможности образования мультиферментного комплекса в конструируемых системах.

3. Показано, что сочетание биферментной (НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза) системы с субстратами (НАДН, ФМН, тетрадеканаль) и глицерином или сахарозой может быть использовано для построения экспериментальной модели эффективного взаимодействия ферментов в метаболических фрагментах в условиях вязкости реакционной среды, стилизующей внутриклеточные значения.

4. На примере биолюминесцентного биотеста для оценки степени загрязнения почвенных экосистем и оценки потенциальной токсичности наноматериалов показано, что повышение сложности системы (от моно- до триферментной) увеличивает чувствительность биотеста, поэтому управление чувствительностью ферментативных биотестов возможно при использовании ферментативных комплексов разной сложности.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах:

1. Kratasyuk, V. A. Software for matching standard activity enzyme biosensors for soil pollution analysis / V. A. Kratasyuk, E. M. Kolosova, **O. S. Sutormin**, V. I. Lonshakova-Mukina, M. M. Baygin, N. V. Rimatskaya, I. E. Sukovataya, A. A Shpedt // Sensors. — 2021. — V. 21. — P. 1017.

2. Колосова, Е. М. Комплексный ферментативный биотест для оценки загрязнения почвы / Е. М. Колосова, **О. С. Сутормин**, Е. Н. Есимбекова, В. И. Лоншакова-Мукина, В. А. Кратасюк // Доклады академии наук. — 2019. — № 1. — С. 103-107.

3. Сутормин, О. С. Ферментативное биотестирование почв: сравнение чувствительности к токсикантам моно-, би-и триферментной систем / **О. С. Сутормин**, Е. М. Колосова, Е. В. Немцева, О. В. Искорнева, А. Е. Лисица, В. С. Матвиенко, Е.Н. Есимбекова, В. А. Кратасюк // Цитология. — 2018.— № 10. — С. 826-829.

4. Sutormin, O. S. Effect of viscosity on efficiency of enzyme catalysis of bacterial luciferase coupled with lactate dehydrogenase and NAD(P)H:FMN-Oxidoreductase / **O. S. Sutormin**, I. E. Sukovataya, S. Pande, V. A. Kratasyuk // Molecular Catalysis. — 2018. — V. 458. —P. 60-66;

5. Esimbekova, E. N. Bioluminescent enzyme inhibition-based assay to predict the potential toxicity of carbon nanomaterials / E. N. Esimbekova, E. V. Nemtseva, A. E. Bezrukikh, G. V. Jukova, A. E. Lisitsa, V. I. Lonshakova-Mukina, N. V. Rimatskaya, **O. S. Sutormin**, V. A. Kratasyuk. // Toxicology in Vitro. — 2017. — V. 45. —P. 128-133.

6. Сутормин, О. С. Спектры флуоресценции ферментов биолюминесцентной реакции бактерий в вязких средах / **О. С. Сутормин**, И. Е. Суковатая, В. А. Кратасюк // Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология. — 2014. — № 7. — С. 20–26.

7. Сутормин, О. С. Влияние вязкости реакционной среды на кинетику биферментной биолюминесцентной системы НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза / **О. С. Сутормин**, И. Е. Суковатая, В. А. Кратасюк // Известия Алтайского государственного университета. — 2013. — № 3. — С. 47-51.

8. Сутормин, О. С. Стабилизирующий эффект глицерина и сахарозы на биферментную систему светящихся бактерий НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза / **О. С. Сутормин**, И. Е. Суковатая, В. А. Кратасюк // Вестник Оренбургского государственного университета. — 2013. — № 10. — С. 148-151.

<ins>Тезисы докладов всероссийских и международных конференций</ins>:

1. Sutormin, O. S. Bioluminescent Experimental Model for Investigation Enzyme Behavior under Viscous Cellular Conditions / **O. S. Sutormin**, V.A. Kratasyuk // Abstracts from the International e-Conference on "Sustainable Development after COVID-19: Environmental issues and challenges", 01-02 June 2020. — 2020. — P. 19.

2. Сутормин, О. С. Экспериментальная модель взаимодействия ферментов в би-и триферментных цепях сопряжения ферментов с люциферазой в условиях, приближенных к внутриклеточным / **О. С. Сутормин**, И. Е. Суковатая, В. А. Кратасюк // Сборник научных трудов VI Съезда биофизиков России, 16-21 сентября, Сочи, Россия. — 2019. — С. 396-397.

3. Sutormin, O. S. Sensitivity comparison of double- and triple- bioluminescent enzyme systems to soil toxicants / **O. S. Sutormin**, E. M. Kolosova, V. A. Kratasyuk // Abstract book of SETAC Europe 29th Annual Meeting, 26–30 May, Helsinki, Finland. — 2019. —P. 317.

4. Sutormin, O. S. Artificial enzyme-based model of living organism for integrated assessment of potential risk of toxicants / **O. S. Sutormin**, V. A. Kratasyuk // Abstract book of the 8th Young Environmental Scientists Meeting, 5 - 10 February, Ghent, Belgium. — 2019. —P. 70.

5. Sutormin, O. S. Influence of viscosity and temperature on coupled bioluminescent enzyme systems / **O. S. Sutormin**, I. E. Sukovataya, V. A. Kratasyuk //

Abstract book of 9th International Congress on Biocatalysis, 26-30 August, Hamburg, Germany. — 2018. — P. 56.

6. Sutormin, O. S. The study of in vivo-like enzyme kinetics based on bacterial luciferase coupled with multi-enzyme systems / **O. S. Sutormin**, I. E. Sukovataya, V. A. Kratasyuk // Abstract book of SETAC Europe 28th Annual Meeting, 13–17 May, Rome, Italy. — 2018. —P. 130.

7. Sutormin, O. S. Viscosity-temperature dependence of enzymatic activity of bacterial luciferase coupled with NAD(P)H:FMN-oxidoreductase and the multi-enzyme system / **O. S. Sutormin**, I. E. Sukovataya, V. A. Kratasyuk // Abstract book of 20th International Symposium for Bioluminescence and Chemiluminescence, - 28-30 May, Nantes, France. — 2018. — P. 183657.

8. Sutormin, O. S. Roles of viscogens on functional stability of bacterial luciferase coupled with multi-enzyme system LDH + NADH:FMN-oxidoreductase / **O. S. Sutormin**, M. S. Nemchinova, I. E. Sukovataya, V. A. Kratasyuk // Abstract book of 19th International Symposium for Bioluminescence and Chemiluminescence, 29 May – 2 June, Tsukuba, Japan. — 2016. — P. 187.

9. Nemchinova, M. S. The effect of viscosity on the thermal stability of coupled multi- enzyme system lactate dehydrogenase + NAD(P)H:FMN-oxidoreductase + bacterial luciferase / M. S. Nemchinova, **O. S. Sutormin**, I. E. Sukovataya, V. A. Kratasyuk / Abstract book of SFM’15 International Symposium ‘Optics and Biophotonics-III’, 21-25 September, Saratov, Russia. — 2015. — Режим доступа: http://sfm.eventry.org/report/1555.

10. Немчинова, М. С. Активность и стабильность ферментов биолюминесцентной системы бактерий в составе полиферментной цепи в вязких средах / М. С. Немчинова, **О. С. Сутормин**, И. Е. Суковатая // Материалы 53-й Международной научной студенческой конференции МНСК-2015: Физические методы в естественных науках, 11-17 апреля, Новосибирск, Россия. — 2015. — С. 67.

11. Тюменцева, Д. И. Влияние вязкости и pH реакционной среды на кинетику полиферментной системы светящихся бактерий / Д. И. Тюменцева, **О. С.**

Сутормин, И. Е. Суковатая // Материалы 53-й Международной научной студенческой конференции МНСК-2015: Физические методы в естественных науках, 11-17 апреля, Новосибирск, Россия. — 2015. — С. 74.

12. Sutormin, O. S. Stabilization of coupled triple enzymatic system NADH:FMN-oxidoreductase-luciferase- lactate dehydrogenase in water–organic solvent systems / **O. S. Sutormin**, I. E. Sukovataya, V. A. Kratasyuk // Abstract book of 10th International Conference on Protein Stabilisation 7-9 May, Lake Maggiore, Italy. — 2014. — P. 192.

13. Sutormin, O. S. Effect of structured microenvironments on stability of coupled enzyme system NADH:FMN-oxidoreductase–luciferase / **O. S. Sutormin**, I. E. Sukovataya, V. A. Kratasyuk // Luminescence. Special Issue: Abstracts of the 18th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, 23-28 June, Uppsala, Sweden. — 2014. — P. 97-98.

14. Sutormin O. S. The effect of surfactants on the sensitivity of coupled luciferase systems of luminous bacteria / **O. S. Sutormin**, G.O. Zhdanova, M.S. Nemchinova, D. I. Tyumentseva // Материалы V международной научно-практической конференции «21 ВЕК: ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ НАУКА И ТЕХНОЛОГИИ». — 2014. — С. 1-2.

15. Sukovataya, I. E. The modeling of viscous microenvironment for the coupled enzyme system of bioluminescence bacteria / I. E. Sukovataya, **O. S. Sutormin**, V. A. Kratasyuk // World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering. — 2013. — № 11. — P. 1070-1072.

16. Sutormin, O. S. Thermal stability of coupled enzyme system NADH:FMN-oxidoreductase–luciferase in solvents of different viscosity / **O. S. Sutormin**, I. E. Sukovataya, V. A. Kratasyuk // Luminescence. Special Issue: Abstracts of the 17th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, 28 May – 2 June, Guelph, Canada. —2012. — №2. — P. 162.

17. Sutormin, O. S. Fluorescence studies of thermal affect on enzymes of coupled enzymatic system of luminous bacteria NADH:FMN-oxidoreductase-luciferase in viscous media / **O. S. Sutormin**, I. E. Sukovataya, V. A. Kratasyuk // Luminescence.

Special Issue: Abstracts of the 17th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, 28 May – 2 June, Guelph, Canada. —2012. — №2. — P. 161.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АДГ — моноферментная система, катализируемая алкогольдегидрогеназой;

АДГ + Р + Л — триферментная система, катализируемая НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза + алкогольдегидрогеназа;

БуХЭ — моноферментная система, катализируемая бутирилхолинэстеразой

Г6ФД — моноферментная система, катализируемая глюкозо-6-фосфат дегидрогеназой;

Г6ФДГ + Р + Л — триферментная система, катализируемая НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза + глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа;

E_a — энергия активации;

КРАБ — лиофилизированный препарат высокоочищенных ферментов НАДН:ФМН-оксидоредуктазы и бактериальной люциферазы (комплект реактивов аналитической биолюминесценции);

Л — моноферментная система, катализируемая бактериальной люциферазой;

ЛДГ — моноферментная система, катализируемая лактатдегидрогеназой;

ЛДГ + Р + Л — триферментная система, катализируемая лактатдегидрогеназой + НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза;

МСУНТ — многостенный углеродный наноматериал;

$НАД^+$ —β-никотинамидадениндинуклеотид;

НАДН — β-никотинамидадениндинуклеотид восстановленный;

ОСУНТ — однослойные углеродные карбоксилированные нанотрубки;

ПКН - прогнозируемая концентрация наночастиц в окружающей среде;

Р — моноферментная система, катализируемая НАДН:ФМН-оксидоредуктазой;

Р + Л — биферментная система, катализируемая НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза;

C_{14} — тетрадеканаль;

Тр — моноферментная система, катализируемая трипсином;

УНТ — углеродные наноматериалы;

ФМН — рибофлавин 5’-монофосфат;

C_{60}FWS — гидратированный фуллерен C_{60};

I — интенсивность свечения ферментативной системы;

$I_{м}$ — максимальная интенсивность свечения ферментативной системы;

$I_{м\_контр}$ — максимальная интенсивность свечения ферментативной системы, полученная в контроле;

$I_{м\_эксп}$ — максимальная интенсивность свечения ферментативной системы в присутствии исследуемого значения вязкости реакционной среды или образца;

$I_{остаточное}$ — остаточная интенсивность свечения ферментативной системы;

IC_{20} — параметр ингибирования ферментативной системы, за который принимали концентрацию токсиканта вызывающую снижение максимальной интенсивности свечения системы на 20%;

IC_{50} — параметр ингибирования ферментативной системы, за который принимали концентрацию токсиканта вызывающую снижение максимальной интенсивности свечения системы на 50%;

k_{dec} — константа спада светоизлучения ферментативной системы;

k_{in} — константа скорости термоинактивации биферментной системы;

V_{max} — величина максимальной скорости ферментативной реакции;

Q — общее количество высвеченных квантов света;

η — вязкость растворителя или реакционной среды;

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Luby-Phelps, K. Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area / K. Luby-Phelps // International review of cytology. — 1999. — V. 192. — P. 189-221.
2. Pastor, I. Effect of crowding by Dextrans in enzymatic reactions / I. Pastor, L. Pitulice, C. Balcells, E. Vilaseca, S. Madurga, A. Isvoran, M. Cascante, F. Mas // Biophysical chemistry. — 2014. — V. 185. — P. 8-13.
3. van Eunen, K. The importance and challenges of in vivo-like enzyme kinetics / K. van Eunen, B. M. Bakker // Perspectives in Science. — 2014. — V. 1. — P. 126-130.
4. Fushimi, K. Low viscosity in the aqueous domain of cell cytoplasm measured by picosecond polarization microfluorimetry / K. Fushimi, A. S. Verkman // The Journal of cell biology. — 1991. — V. 112. — P. 719-725.
5. Суковатая, И. Е. Кинетика биолюминесцентной реакции в нетрадиционных средах : автореф. дис. … канд. биол. наук : 03.00.02 / Суковатая Ирина Егоровна. — Красноярск, 2000. — 21 с.
6. Chebotareva, N. A. Biochemical effects of molecular crowding / N. A. Chebotareva, B. I. Kurganov, N. B. Livanova // Biochemistry (Moscow). — 2004. — V. 69. — P. 1239-1251.
7. Rauscher, A. Internal friction in enzyme reactions / A. Rauscher, I. Derényi, L. Gráf, A. Málnási-Csizmadia // IUBMB life. — 2013. — V. 1. — P. 35-42.
8. Poggi, C. G. Macromolecular crowding and the steady-state kinetics of malate dehydrogenase / C. G. Poggi, K. M. Slade // Biochemistry. — 2015. — V. 2. — P. 260-267.
9. Oshima, H. Effects of sugars on the thermal stability of a protein / H. Oshima, M. Kinoshita // The Journal of chemical physics. — 2013. — V. 138. — P. 06B612_1.

10. Arakawa, T. The stabilization of proteins by osmolytes / T. Arakawa, S. N. Timasheff // Biophysical journal. — 1985. — V. 47. — P. 411-414.

11. Sutormin, O. S. Effect of viscosity on efficiency of enzyme catalysis of bacterial luciferase coupled with lactate dehydrogenase and NAD(P)H:FMN-Oxidoreductase / O. S. Sutormin, I. E. Sukovataya, S. Pande, V. A. Kratasyuk // Molecular Catalysis. — 2018. — V. 458. —P. 60-66.

12. Кратасюк, В. А. Люциферазное биотестирование: биофизические основы, методы и применение : автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.00 / Кратасюк Валентина Александровна. — Красноярск., 1994. — 31 с.

13. Гительзон, И. И. Экологическая биофизика : учебное пособие / И. И. Гительзон, В. А. Кратасюк, В. Н. Лопатин, А. Д. Апонасенко, В. С. Филимонов, В. В. Фишов, З. Г. Холостова, Н. А. Гаевский, Ю. С. Григорьев, А. А. Тихомиров — Москва : Логос, 2002.—328 с.

14. Deeva, A. A. The role of electrostatic interactions in complex formation between bacterial luciferase and NADPH: FMN-oxidoreductase / A. A. Deeva, E. V. Nemtseva, V. A. Kratasyuk // Journal of Siberian Federal University. Biology. — 2018. — V. 10. — P. 106-113.

15. Kudryasheva, N. S. Effect of quinones and phenols on the triple-enzyme bioluminescent system with protease / N. S. Kudryasheva, E. N. Esimbekova, N. N. Remmel, V. A. Kratasyuk, A. J. W. G. Visser, A. J. W. G. van Hoek // Luminescence: the journal of biological and chemical luminescence. — 2003. — V. 18. — P. 224-228.

16. Ugarova, N. N. Bioluminescent microassay of various metabolites using bacterial luciferase co-immobilized with multienzyme systems / N. N. Ugarova, O. V. Lebedeva, I. G. Frumkina // Analytical biochemistry. — 1988. — V. 173. — P. 221-227.

17. Экспериментальная модель клетки бактерий: реконструирование метаболических процессов в гиалоплазме: отчет о НИР / Кратасюк В. А. — Красноярск : Сибирский федеральный университет, 2014. — 36 с.

18. Parry, B. R. The bacterial cytoplasm has glass-like properties and is fluidized by metabolic activity / B. R. Parry, I. V. Surovtsev, M. T. Cabeen, C. S. O'Hern, E. R. Dufresne, C. Jacobs-Wagner // Cell. — 2014. — V. 156. — P. 183-194.

19. Fushimi, K. Low viscosity in the aqueous domain of cell cytoplasm measured by picosecond polarization microfluorimetry / K. Fushimi, A. S. Verkman // The Journal of cell biology. — 1991. — V. 112. — P. 719-725.

20. Luby-Phelps, K. The physical chemistry of cytoplasm and its influence on cell function: an update / K. Luby-Phelps // Molecular biology of the cell. — 2013. — V. 24. — P. 2593-2596.

21. Nenninger, A. Size dependence of protein diffusion in the cytoplasm of Escherichia coli / A. Nenninger, G. Mastroianni, C. W. Mullineaux // Journal of bacteriology. — 2010. — V. 192. — P. 4535-4540.

22. Wang, Q. Exploring weak, transient protein–protein interactions in crowded in vivo environments by in-cell nuclear magnetic resonance spectroscopy / Q. Wang, A. Zhuravleva, L. M. Gierasch // Biochemistry. — 2011. — V. 50. — P. 9225-9236.

23. Derham, B. K. The effect of the presence of globular proteins and elongated polymers on enzyme activity / B. K. Derham, J. J. Harding // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics. — 2006. — V. 6. —P. 1000-1006.

24. Minton, A. P. How can biochemical reactions within cells differ from those in test tubes? / A. P. Minton // Journal of cell science. — 2006. — V. 14. — P. 2863-2869.

25. Zhou, H. X. Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences / H. X. Zhou, G. Rivas, A. P. Minton // Annual Review of Biophysics. — 2008. — V. 37. — P. 375-397.

26. Zimmerman, S. B. Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences / S. B. Zimmerman, A. P. Minton // Annual review of biophysics and biomolecular structure. — 1993. — V. 22. — P. 27-65.

27. Роман, С. Г. Влияние шаперонов и краудинга на агрегацию белков : автореф. дис. … канд. физ-мат. наук : 03.01.02 / Роман Светлана Георгиевна. — М., 2012. — 26 с.

28. Phillip, Y. Formation of protein complexes in crowded environments–from in vitro to in vivo / Y. Phillip, G. Schreiber // FEBS letters. — 2013. — V. 587. — P. 1046-1052.

29. Breydo, L. The crowd you're in with: effects of different types of crowding agents on protein aggregation / L. Breydo, K. D. Reddy, A. Piai, I. C. Felli, R. Pierattelli, V. N. Uversky // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics. — 2014. — V. 1844. — P. 346-357.

30. Politou, A. Revisiting a dogma: the effect of volume exclusion in molecular crowding / A. Politou, P. A. Temussi // Current opinion in structural biology. — 2015. — V. 30. — P. 1-6.

31. Ferreira, L. A. Role of solvent properties of aqueous media in macromolecular crowding effects / L. A. Ferreira, P. P. Madeira, L. Breydo, C. Reichardt, V. N. Uversky, B. Y. Zaslavsky, // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. — 2016. — V. 34. — P. 92-103.

32. Экспериментальная модель клетки бактерий: реконструирование метаболических процессов в гиалоплазме: отчет о НИР / Кратасюк В. А. — Красноярск : Сибирский федеральный университет, 2015. — 64 с.

33. Пучков, Е. О. Внутриклеточная вязкость: методы измерения и роль в метаболизме / Е. О. Пучков // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. — 2014. — № 1. — С. 3-13.

34. Хоштария, Д. Э. Кинетическое проявление конформационной динамики, сопровождающей ферментативный гидролиз бензоилглицилфениллактата карбоксипептидазой А / Д. Э. Хоштария, Н. Г. Гогуадзе, Е. Ульструп // Биоорганическая химия. — 1991. — № 17. — С. 618-625.

35. Ansari, A. The role of solvent viscosity in the dynamics of protein conformational changes / A. Ansari, C. M. Jones, E. R. Henry, J. Hofrichter, W. A. Eaton // Science. — 1992. — V. 256. — P. 1796-1798.

36. Rauscher, A. A. Temperature dependence of internal friction in enzyme reactions / A. A. Rauscher, Z. Simon, G. J. Szöllősi, L. Gráf, I. Derényi, A. Malnasi-Csizmadia // The FASEB Journal. — 2011. — V. 8. — P. 2804-2813.

37. Liu, L. Gated electron transfer as a probe of the configurational dynamics of peptide‒ protein complexes / L. Liu, J. Hong, M. Y. Ogawa // Journal of the American Chemical Society. — 2004. — V. 1. — P. 50-51.

38. Finkelstein, I. J. Viscosity-dependent protein dynamics / I. J. Finkelstein, A. M. Massari, M. D. Fayer // Biophysical journal. — 2007. — V. 10. — P. 3652-3662.

39. Hasinoff, B. B. Diffusion-controlled reaction kinetics of the binding of carbon monoxide to the heme undecapeptide of cytochrome c (microperoxidase 11) in high viscosity solvents / B. B. Hasinoff // Archives of biochemistry and biophysics. — 1981. — V. 1. — P. 396-402.

40. Walser, R. Viscosity dependence of protein dynamics / R. Walser, W. F. van Gunsteren // Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. —2001. — V. 3. — P. 414-421.

41. Qiu, L. A limiting speed for protein folding at low solvent viscosity / L. Qiu, S. J. Hagen // Journal of the American Chemical Society. — 2004. — V. 11. — P. 3398-3399.

42. Tóth, J. Site directed mutagenesis at position 193 of human trypsin 4 alters the rate of conformational change during activation: role of local internal viscosity in protein dynamics / J. Tóth, Z. Simon, P. Medveczky, L. Gombos, B. Jelinek, L. Szilágyi, L. Gráf, A. Málnási-Csizmadia // Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. — 2007. — V. 4. — P. 1119-1127.

43. Zagrovic, B. Solvent viscosity dependence of the folding rate of a small protein: distributed computing study / B. Zagrovic, V. Pande // Journal of computational chemistry. — 2003. — V. 12. — P. 1432-1436.

44. Zhou, J. S. Gating of photoinduced electron transfer from zinc cytochrome c and tin cytochrome c to plastocyanin. Effects of solution viscosity on rearrangement of the metalloprotein complex / J. S. Zhou, N. M. Kostic // Journal of the American Chemical Society. — 1993. — V. 23. — P. 10796-10804.

45. Kao, Y. T. Protein-flexibility mediated coupling between photoswitching kinetics and surrounding viscosity of a photochromic fluorescent protein / Y. T. Kao, X.

Zhu, W. Min // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 2012. — V. 9. — P. 3220-3225.

46. Beece, D. Solvent viscosity and protein dynamics / D. Beece, L. Eisenstein, H. Frauenfelder, D. Good, M. C. Marden, L. Reinisch, A. H. Reynolds, L. B. Sorensen, K. T. Yue // Biochemistry. — 1980. — V. 23. — P. 5147-5157.

47. Feig, M. Kinetics from implicit solvent simulations of biomolecules as a function of viscosity / M. Feig // Journal of chemical theory and computation. — 2007. — V. 5. — P. 1734-1748.

48. Viswanath, D. S. Viscosity of liquids: theory, estimation, experiment, and data / D. S. Viswanath, T. Ghosh, D. H. L. Prasad, N. V. K. Dutt, K. Y. Rani. — Netherlands : Springer, 2007. — 662 p.

49. Steinhoff, H. J. Residual motion of hemoglobin-bound spin labels and protein dynamics: viscosity dependence of the rotational correlation times / H. J. Steinhoff // European Biophysics Journal. — 1990. — V. 1. — P. 57-62.

50. Ivković-Jensen, M. M. Effects of viscosity and temperature on the kinetics of the electron-transfer reaction between the triplet state of zinc cytochrome c and cupriplastocyanin / M. M. Ivković-Jensen, N. M. Kostić // Biochemistry. — 1997. — V. 26. — P. 8135-8144.

51. Khajehpour, M. Effect of protein dynamics upon reactions that occur in the heme pocket of horseradish peroxidase / M. Khajehpour, T. Troxler, J. M. Vanderkooi // Biochemistry. — 2003. — V. 9. — P. 2672-2679.

52. Wensley, B. G. Experimental evidence for a frustrated energy landscape in a three-helix-bundle protein family / B. G. Wensley, S. Batey, F. A. C. Bone, Z. M. Chan, N. R. Tumelty, A. Steward, L. G. Kwa, A. Borgia, J. Clarke // Nature. — 2010. — V. 7281. — P. 685-688.

53. Zwanzig, R. Diffusion in a rough potential / R. Zwanzig // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 1988. — V. 7. — P. 2029-2030.

54. Heyes, D. J. Solvent-slaved protein motions accompany proton but not hydride tunneling in light-activated protochlorophyllide oxidoreductase / D. J. Heyes, M.

Sakuma, N. S. Scrutton // Angewandte Chemie International Edition. — 2009. — V. 21. — P. 3850-3853.

55. Yedgar, S. Viscosity dependence of O2 escape from respiratory proteins as a function of cosolvent molecular weight / S. Yedgar, C. Tetreau, B. Gavish, D. Lavalette // Biophysical journal. — 1995. — V. 2. — P. 665-670.

56. Uribe, S. Measuring solution viscosity and its effect on enzyme activity / S. Uribe, J. G. Sampedro // Biological procedures online. —2003. — V. 1. — P. 108-115.

57. Almagor, A. Viscous cosolvent effect on the ultrasonic absorption of bovine serum albumin / A. Almagor, S. Yedgar, B. Gavish // Biophysical journal. — 1992. — V. 2. — P. 480-486.

58. Lavalette, D. Microscopic viscosity and rotational diffusion of proteins in a macromolecular environment / D. Lavalette, C. Tétreau, M. Tourbez, Y. Blouquit // Biophysical journal. —1999. — V. 5. — P. 2744-2751.

59. Somogyi, B. Viscosity and transient solvent accessibility of Trp-63 in the native conformation of lysozyme / B. Somogyi, J. A. Norman, L. Zempel, A. Rosenberg // Biophysical chemistry. —1988. — V. 1. — P. 1-13.

60. Hagen, J. S. Solvent viscosity and friction in protein folding dynamics / J. S. Hagen // Current Protein and Peptide Science. — 2010. — V. 5. — P. 385-395.

61. Ohta, Y. Kinetic isotope effect of the L-phenylalanine oxidase from Pseudomonas sp. P-501 / Y. Ohta, E. B. Mukouyama, H. Suzuki // Journal of biochemistry. — 2006. — V. 139. — P. 551-555.

62. Kleinert, T. Solvent composition and viscosity effects on the kinetics of CO binding to horse myoglobin / T. Kleinert, W. Doster, H. Leyser, W. Petry, V. Schwarz, M. Settles // Biochemistry. — 1998. — V. 2. — P. 717-733.

63. Vitkup, D. Solvent mobility and the protein'glass' transition / D. Vitkup, D. Ringe, G. A. Petsko, M. Karplus // Nature structural biology. — 2000. — V. 7. — P. 34-38.

64. Ivković-Jensen, M. M. Effects of temperature on the kinetics of the gated electron-transfer reaction between zinc cytochrome c and plastocyanin. Analysis of

configurational fluctuation of the diprotein complex / M. M. Ivković-Jensen, N. M. Kostić // Biochemistry. — 1996. — V. 35. — P. 15095-15106.

65. Schlarb-Ridley, B. G. Implications of the effects of viscosity, macromolecular crowding, and temperature for the transient interaction between cytochrome f and plastocyanin from the cyanobacterium Phormidium laminosum / B. G. Schlarb-Ridley, H. Mi, W. D. Teale, V. S. Meyer, C. J. Howe, D. S. Bendall // Biochemistry. — 2005. — V. 44. — P. 6232-6238.

66. Gonnelli, M. Glycerol effects on protein flexibility: a tryptophan phosphorescence study / M. Gonnelli, G. B. Strambini // Biophysical journal. — 1993. — V. 65. — P. 131-137.

67. Pabit, S. A. Internal friction controls the speed of protein folding from a compact configuration / S. A. Pabit, H. Roder, S. J. Hagen // Biochemistry. — 2004. — V. 43. — P. 12532-12538.

68. Yancey, P. H. Counteraction of urea destabilization of protein structure by methylamine osmoregulatory compounds of elasmobranch fishes / P. H. Yancey, G. N. Somero // Biochemical Journal. — 1979. — V. 183. — P. 317-323.

69. Yancey, P. H. Living with water stress: evolution of osmolyte systems / P. H. Yancey, M. E. Clark, S. C. Hands, R. D. Bowlus, G. N. Somero // Science. — 1982. — V. 217. — P. 1214-1222.

70. Wang, A. A naturally occurring protective system in urea-rich cells: mechanism of osmolyte protection of proteins against urea denaturation / A. Wang, D. W. Bolen // Biochemistry. — 1997. — V. 36. — P. 9101-9108.

71. Bolen, D. W. The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding / D. W. Bolen, I. V. Baskakov // Journal of molecular biology. — 2001. — V. 310. — P. 955-963.

72. Burg, M. B. Urea and methylamines have similar effects on aldose reductase activity / M. B. Burg, E. M. Peters // American Journal of Physiology-Renal Physiology. — 1997. — V. 273. — P. F1048-F1053.

73. Baskakov, I. Time-dependent effects of trimethylamine-N-oxide/urea on lactate dehydrogenase activity: an unexplored dimension of the adaptation paradigm / I. Baskakov, D. W. Bolen // Biophysical journal. — 1998. — V. 74. — P. 2658-2665.

74. Baskakov, I. Forcing thermodynamically unfolded proteins to fold / I. Baskakov, D. W. Bolen // Journal of Biological Chemistry. — 1998. — V. 273. — P. 4831-4834.

75. Liu, Y. The peptide backbone plays a dominant role in protein stabilization by naturally occurring osmolytes / Y. Liu, D. W. Bolen // Biochemistry. — 1995. — V. 34. — P. 12884-12891.

76. Mashino, T. Effects of urea and trimethylamine-N-oxide on enzyme activity and stability / T. Mashino, I. Fridovich // Archives of biochemistry and biophysics. — 1987. — V. 258. — P. 356-360.

77. Davis-Searles, P. R. Interpreting the effects of small uncharged solutes on protein-folding equilibria / P. R. Davis-Searles, A. J. Saunders, D. A. Erie, D. J. Winzor, G. J. Pielak // Annual review of biophysics and biomolecular structure. — 2001. — V. 30. — P. 271-306.

78. Sherwin, K. E. Effect of sucrose on the dimerization of α-chymotrypsin allowance for thermodynamic nonideality arising from the presence of a small inert solute / K. E. Sherwin, D. J. Winzor // Biophysical chemistry. — 1988. — V. 31. — P. 287-294.

79. Cann, J. R. Effects of molecular crowding on protein self-association: a potential source of error in sedimentation coefficients obtained by zonal ultracentrifugation in a sucrose gradient / J. R. Cann, R. O. Coombs, G. J. Howlett, M. P. Jacobsen, D. J. Winzor // Biochemistry. — 1994. — V. 33. — P. 10185-10190.

80. Chebotareva, N. A. Ultracentrifugal studies of the effect of molecular crowding by trimethylamine N-oxide on the self-association of muscle glycogen phosphorylase b / N. A. Chebotareva, S. E. Harding, D. J. Winzor // European journal of biochemistry. — 2001. — V. 268. — P. 506-513.

81. Chebotareva, N. A. Self-association of phosphorylase kinase from rabbit skeletal muscle in the presence of natural osmolyte, trimethylamine N-oxide / N. A.

Chebotareva, I. E. Andreeva, V. F. Makeeva, B. I. Kurganov, N. B. Livanova, S. E. Harding // Analytical Ultracentrifugation VI. — 2002. — P. 70-76.

82. Patel, C. N. Effects of molecular crowding by saccharides on α-chymotrypsin dimerization / C. N. Patel, S. M. Noble, G. T. Weatherly, A. Tripathy, D. J. Winzor, G. J. Pielak // Protein science. — 2002. — V. 11. — P. 997-1003.

83. Meng, F. G. Osmophobic effect of glycerol on irreversible thermal denaturation of rabbit creatine kinase / F. G. Meng, Y. K. Hong, H. W. He, A. E. Lyubarev, B. I. Kurganov, Y. B. Yan, H. M. Zhou // Biophysical journal. — 2004. — V. 87. — P. 2247-2254.

84. Morar, A. S. Solvent-induced collapse of α-synuclein and acid-denatured cytochrome c / A. S. Morar, A. Olteanu, G. B. Young, G. J. Pielak // Protein Science. — 2001. — V. 10. — P. 2195-2199.

85. Weatherly, G. T. Second virial coefficients as a measure of protein–osmolyte interactions / G. T. Weatherly, G. J. Pielak // Protein Science. — 2001. — V. 10. — P. 12-16.

86. Wills, P. R. Thermodynamic analysis of “preferential solvation” in protein solutions / P. R. Wills, D. J. Winzor // Biopolymers: Original Research on Biomolecules. — 1993. — V. 33. — P. 1627-1629.

87. Wills, P. R. Thermodynamic nonideality in macromolecular solutions: interpretation of virial coefficients / P. R. Wills, W. D. Comper, D. J. Winzor // Archives of biochemistry and biophysics. — 1993. — V. 300. — P. 206-212.

88. Winzor, C. L. Rationalization of the effects of compatible solutes on protein stability in terms of thermodynamic nonideality / C. L. Winzor, D. J. Winzor, L. G. Paleg, G. P. Jones, B. P. Naidu // Archives of biochemistry and biophysics. — 1992. — V. 296. — P. 102-107.

89. Winzor, D. J. Protein-Solvent Interactions / D. J. Winzor, P. R. Wills, R. B. Gregory. — New York : Marcel Dekker, 1995. — P. 483-520.

90. Winzor, D. J. Thermodynamic nonideality of enzyme solutions supplemented with inert solutes: yeast hexokinase revisited / D. J. Winzor, P. R. Wills // Biophysical chemistry. — 1995. — V. 57. — P. 103-110.

91. Poon, J. Effects of molecular crowding on the interaction between DNA and the Escherichia coli regulatory protein TyrR / J. Poon, M. Bailey, D. J. Winzor, B. E. Davidson, W. H. Sawyer // Biophysical journal. — 1997. — V. 73. — P. 3257-3264.

92. Wills, P. R. Direct analysis of solute self-association by sedimentation equilibrium / P. R. Wills, M. P. Jacobsen, D. J. Winzor // Biopolymers: Original Research on Biomolecules. — 1996. — V. 38. — P. 119-130.

93. Timasheff, S. N. Water as ligand: preferential binding and exclusion of denaturants in protein unfolding / S. N. Timasheff // Biochemistry. — 1992. — V. 31. — P. 9857-9864.

94. Timasheff, S. N. The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? / S. N. Timasheff // Annual review of biophysics and biomolecular structure. — 1993. — V. 22. — P. 67-97.

95. Atkinson, D. E. Kinetics of regulatory enzymes: kinetic order of the yeast diphosphopyridine nucleotide isocitrate dehydrogenase reaction and a model for the reaction / D. E. Atkinson, J. A. Hathaway, E. C. Smith // Journal of Biological Chemistry. — 1965. — V. 240. — P. 2682-2690.

96. Atkinson, D. E. Kinetics of regulatory enzymes: Escherichia coli phosphofructokinase / D. E. Atkinson, G. M. Walton // Journal of Biological Chemistry. — 1965. — V. 240. — P. 757-763.

97. Porter, C. M. Cooperativity in monomeric enzymes with single ligand-binding sites / C. M. Porter, B. G. Miller // Bioorganic chemistry. — 2012. — V. 43. — P. 44-50.

98. Adair, G. S. The hemoglobin system VI. The oxygen dissociation curve of hemoglobin / G. S. Adair, A. V. Bock, H. Jr. Field // Journal of Biological Chemistry. — 1925. — V. 63. —P. 529-545.

99. Cornish-Bowden, A. Cooperativity in monomeric enzymes / A. Cornish-Bowden, M. L. Cárdenas // Journal of theoretical biology. — 1987. — V. 124. — P. 1-23.

100. Ricard, J. Cooperative and allosteric enzymes: 20 years on / J. Ricard, A. Cornish-Bowden // European journal of biochemistry. — 1987. — V. 166. — P. 255-272.

101. Allewell, N. M. Escherichia coli aspartate transcarbamoylase: structure, energetics, and catalytic and regulatory mechanisms / N. M. Allewell // Annual review of biophysics and biophysical chemistry. — 1989. — V. 18. — P. 71-92.

102. Ferdinand, W. The interpretation of non-hyperbolic rate curves for two-substrate enzymes. A possible mechanism for phosphofructokinase / W. Ferdinand // Biochemical Journal. — 1966. — V. 98. — P. 278-283.

103. Keleti, T. Effect of steric changes in the protein on the kinetics of enzymic reactions. II. Steady-state treatment of reactions with one substrate / T. Keleti // Acta biochimica et biophysica; Academiae Scientiarum Hungaricae. — 1968. — V. 3. — P. 247-258.

104. Rabin, B. R. Cooperative effects in enzyme catalysis: a possible kinetic model based on substrate-induced conformation isomerization / B. R. Rabin // Biochemical Journal. — 1967. — V. 102. — P. 22-23.

105. Rose, I. A. Role of conformational change in the fumarase reaction cycle / I. A. Rose, J. V. B. Warms, R. G. Yuan // Biochemistry. — 1993. — V. 32. — P. 8504-8511.

106. Rose, I. A. How fumarase recycles after the malate→ fumarate reaction. Insights into the reaction mechanism / I. A. Rose // Biochemistry. — 1998. —V. 37. — P. 17651-17658.

107. Sweeny, J. R. Alternative to allosterism and cooperativity in the interpretation of enzyme kinetic data / J. R. Sweeny, J. R. Fisher // Biochemistry. — 1968. — V. 7.— P. 561-565.

108. Cornish-Bowden, A. Glucokinase: A monomeric enzyme with positive cooperativity / A. Cornish-Bowden, M. L. Cárdenas // Frontiers in Diabetes. — 2004. — V. 16. — P. 125-134.

109. Parry, M. J. Purification and properties of adenosine 5′-triphosphate–D-glucose 6-phosphotransferase from rat liver / M. J. Parry, D. G. Walker // Biochemical Journal. — 1966. — V. 99. — P. 266-274.

110. Storer, A. C. Kinetics of rat liver glucokinase. Co-operative interactions with glucose at physiologically significant concentrations / A. C. Storer, A. Cornish-Bowden // Biochemical Journal. — 1976. — V. 159. — P. 7-14.

111. Hill, A. V. A new mathematical treatment of changes of ionic concentration in muscle and nerve under the action of electric currents, with a theory as to their mode of excitation / A. V. Hill // The Journal of physiology. — 1910. — V. 40. — P. 190-224.

112. Minton, A. P. The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media / A. P. Minton // Journal of biological chemistry. — 2001. — V. 276. — P. 10577-10580.

113. Dmitriev, L. F. Bacterial luminescence: Luminescence mechanism with cyclic peroxide participation and dependence on reactive oxygen species (a hypothesis) / L. F. Dmitriev // Biochimie. — 2000. — V. 82. — P. 237-244.

114. Inouye, S. NAD(P)H-flavin oxidoreductase from the bioluminescent bacterium, Vibrio fischeri ATCC 7744, is a flavoprotein / S. Inouye // FEBS letters. — 1994. — V. 347. — P. 163-168.

115. Koike, H. 1.8 A crystal structure of the major NAD(P)H:FMN oxidoreductase of bioluminescent bacterium Vibrio fischeri: overall structure, cofactor and substrate-analog binding, and comparison with related flavoproteins / H. Koike, H. Sasaki, T. Kobori, S. Zenno, K. Saigo, M. E. Murphy, E. T. Adman, M. Tanokura // Journal of molecular biology. — 1998. — V. 280. — P. 259-273.

116. Campbell, Z. T. Crystal structure of the bacterial luciferase/flavin complex provides insight into the function of the β subunit / Z. T. Campbell, A. Weichsel, W. R. Montfort, T. O. Baldwin // Biochemistry. — 2009. — V. 48. — P. 6085-6094.

117. Fisher, A. J. The 1.5-Å resolution crystal structure of bacterial luciferase in low salt conditions / A. J. Fisher, T. B. Thompson, J. B. Thoden, T. O. Baldwin, I. Rayment // Journal of Biological Chemistry — 1996. — V. 271. — P. 21956-21968.

118. Илларионов, Б. А. Нуклеотидная последовательность генов α-и β-субъединиц люциферазы Photobacterium leiognathi / Б. А. Илларионов // Биоорганическая химия. — 1988. — № 14. — P. 412-415.

119. Ataei, F. Luciferase protection against proteolytic degradation: a key for improving signal in nano-system biology / F. Ataei, S. Hosseinkhani, K. Khajeh // Journal of biotechnology. — 2009. — V. 144. — P. 83-88.

120. Lee, J. Lumazine protein and the excitation mechanism in bacterial bioluminescence / J. Lee // Biophysical chemistry. — 1993. — V. 48. — P. 149-158.

121. Dunlap, P. V. Luminous bacteria / P. V. Dunlap, K. Kita-Tsukamoto // Prokaryotes. — 2006. — V. 2. — P. 863-92.

122. Kolappan, S. Structures of lactate dehydrogenase A (LDHA) in apo, ternary and inhibitor-bound forms / S. Kolappan, D. L. Shen, R. Mosi, J. Sun, E. J. McEachern, D. J. Vocadlo, L. Craig // Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. — 2015. — V. 71. — P. 185-195.

123. Holbrook, J. J. 4 lactate dehydrogenase / J. J. Holbrook, A. Liljas, S. J. Steindel, M. G. Rossmann // In The enzymes. — 1975. — V. 11. — P. 191-292.

124. Jaenicke, R. Molecular weight and quaternary structure of lactic dehydrogenase: 3. comparative determination by sedimentation analysis, light scattering and osmosis / R. Jaenicke, S. Knof // European journal of biochemistry. — 1968. — V. 4. — P. 157-163.

125. Swiderek, K. Modeling of isotope effects on binding oxamate to lactic dehydrogenase / K. Swiderek, A. Panczakiewicz, A. Bujacz, G. Bujacz, P. Paneth // The Journal of Physical Chemistry B. — 2009. — V. 113. — P. 12782-12789.

126. Bolotina, I. A. Investigation of the conformation of lactate dehydrogenase and of its catalytic activity / I. A. Bolotina, D. S. Markovich, M. V. Volkenstein, P. Zavodzky // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology. — 1967. — V. 132. — P. 271-281.

127. Bai, J. H. Kinetics of thermal inactivation of lactate dehydrogenase from rabbit muscle / J. H. Bai, H. J. Wang, D. S. Liu, H. M. Zhou // Journal of protein chemistry. — 1997. — V. 16. — P. 801-807.

128. Wang, Z. Kinetics of inactivation of creatine kinase during modification of its thiol groups / Z. Wang, B. Preiss, C. Tsou // Biochemistry. — 1988. — V. 27. — P. 5095-5100.

129. Xiao, J. Inactivation before significant conformational change during denaturation of papain by guanidine hydrochloride / J. Xiao, S. J. Liang, C. L. Tsou // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology. — 1993. — V. 1164. — P. 54-60.

130. Demchenko, A. P. Kinetics of the lactate dehydrogenase reaction in high-viscosity media / A. P. Demchenko, O. I. Rusyn, E. A. Saburova // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology. — 1989. — V. 998. — P. 196-203.

131. Петушков, В. Н. Изучение эффективности работы биферментной системы NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза светящихся бактерий / В. Н. Петушков, Н. С. Родионова, П. И. Белобров // Биохимия. — 1985. — Т. 50. — С. 401-405.

132. Kratasyuk, V.A. A noninvasive and qualitative bioluminescent assay for express diagnostics of athletes' responses to physical exertion / V. A. Kratasyuk, L. V. Stepanova, R. Ranjan, O. S. Sutormin, S. Pande, G. V. Zhukova, O. M. Miller, N. V. Maznyak, O. A. Kolenchukova // Luminescence. — 2021. — V. 36. — P. 384-390.

133. Kratasyuk, V.A. Bioluminescent enzymatic rapid assay of water integral toxicity / V. A. Kratasyuk, E. N. Esimbekova, A. M. Kondik // Environmental Monitoring and Assessment. —2013. — V. 185. —P. 5909-5916.

134. Esimbekova, E. N. Bioluminescent method to determine non-specific endotoxicosis in therapy / E. N. Esimbekova, V. A. Kratasyuk, V. V. Abakumova // Luminescence: The journal of biological and chemical luminescence. — 1999. — V. 14. — P. 197-198.

135. Roda, A. Analytical chemiluminescence and bioluminescence: latest achievements and new horizons / A. Roda, M. Guardigli // Analytical and bioanalytical chemistry. — 2012. — V. 402. — P. 69-76.

136. Lodish, H. Molecular Cell Biology Eighth Edition / H. Lodish, A. Berk, C. A. Kaiser, M. Krieger, A. Bretscher, H. Ploegh, A. Amon, K. C. Martin. — New York : W. H. Freeman and Company, 2016. — 1280 p.

137. Ugarova, N. N. Immobilized bacterial luciferase and its applications / N. N. Ugarova, O. V. Lebedeva // Applied biochemistry and Biotechnology. — 1987. — V. 15. — P. 35-51.

138. Petuschkov, V. N. Bioluminescent assay of NAD-dependent hydrogenase activity / V. N. Petuschkov, O. A. Guseinov // Applied Biochemistry and Microbiology. — 1992. — V. 28. — P. 907-911.

139. Girotti, S. Bioluminescent flow sensor for the determination of L-(+)-lactate / S. Girotti, B. Grigolo, E. Ferri, S. Ghini, G. Carrea, R. Bovara, A. Roda, R. Motta, R. Petilino // Analyst. — 1990. — V. 115. — P. 889-894.

140. Segur, J. B. Viscosity of glycerol and its aqueous solutions / J. B. Segur, H. E. Oberstar // Industrial & Engineering Chemistry. — 1951. — V. 43. — P. 2117-2120.

141. Telis, V. R. N. Viscosity of aqueous carbohydrate solutions at different temperatures and concentrations / V. R. N. Telis, J. Telis-Romero, H. B. Mazzotti, A. L. Gabas // International Journal of food properties. — 2007. — V. 10. — P. 185-195.

142. Tyulkova, N. A. Comparative study of temperature effects on bacterial luciferases / N. A. Tyulkova, T. P. Sandalova // Biochemistry (Moscow). — 1996. — V. 61. — P. 205-214.

143. Сутормин, О. С. Спектры флуоресценции ферментов биолюминесцентной реакции бактерий в вязких средах / О. С. Сутормин, И. Е. Суковатая, В. А. Кратасюк // Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология. — 2014. — Т 7. — С. 20-26.

144. Сутормин, О. С. Ферментативное биотестирование почв: сравнение чувствительности к токсикантам моно-, би-и триферментной систем / О. С. Сутормин, Е. М. Колосова, Е. В. Немцева, О. В. Искорнева, А. Е. Лисица, В. С. Матвиенко, Е.Н. Есимбекова, В. А. Кратасюк // Цитология. — 2018.— № 10. — С. 826-829.

145. Esimbekova, E. N. Bioluminescent enzyme inhibition-based assay to predict the potential toxicity of carbon nanomaterials / E. N. Esimbekova, E. V. Nemtseva, A. E. Bezrukikh, G. V. Jukova, A. E. Lisitsa, V. I. Lonshakova-Mukina, N. V. Rimatskaya, O. S. Sutormin, V. A. Kratasyuk. // Toxicology in Vitro. — 2017. — V. 45. — P. 128-133.

146. Сутормин, О. С. Влияние вязкости реакционной среды на кинетику биферментной биолюминесцентной системы НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза / О. С. Сутормин, И. Е, В. А. Кратасюк // Известия Алтайского государственного университета. — 2013. — № 3. — С. 47-51.

147. Сутормин, О. С. Стабилизирующий эффект глицерина и сахарозы на биферментную систему светящихся бактерий НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза / О. С. Сутормин, И. Е. Суковатая, В. А. Кратасюк // Вестник Оренбургского государственного университета. — 2013. — № 10. — С. 148-151.

148. Ellis, R. J. Macromolecular crowding: obvious but underappreciated / R. J. Ellis // Trends in biochemical sciences. — 2001. — V. 26. — P. 597-604.

149. Sutormin, O. S. Thermal stability of coupled enzyme system NADH:FMN-oxidoreductase–luciferase in solvents of different viscosity / O. S. Sutormin, I. E. Sukovataya, V. A. Kratasyuk // Luminescence. Special Issue: Abstracts of the 17th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, 28 May – 2 June, Guelph, Canada. — 2012. — V. 2. — P. 162.

150. Gupta, M. N. Enzyme function in organic solvents / M. N. Gupta // European Journal of Biochemistry. — 1992. — V. 203. — P. 25-32.

151. Lakowicz, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy / J. R. Lakowicz. — Singapore : Springer, 2013. — 698 p.

152. Sutormin, O. S. Fluorescence studies of thermal affect on enzymes of coupled enzymatic system of luminous bacteria NADH:FMN-oxidoreductase-luciferase in viscous media / O. S. Sutormin, I. E. Sukovataya, V. A. Kratasyuk // Luminescence. Special Issue: Abstracts of the 17th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, 28 May – 2 June, Guelph, Canada. —2012. — V. 2. — P. 161.

153. Bisswanger, H. Enzyme assays / H. Bisswanger // Perspectives in Science. — 2014. — V. 1. — P. 41-55.

154. Andrievsky, G. Is the C60 fullerene molecule toxic?! / G. Andrievsky, V. Klochkov, L. Derevyanchenko // Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures. — 2005. — V. 13. — P. 363-376.

155. Deryabin D. G. Application of the inhibition of bacterial bioluminescence test for assessment of toxicity of carbon-based nanomaterials / D. G.Deryabin, E. S. Aleshina, L. V. Efremova // Microbiology. — 2012. — V. 81. — P. 492-497.

156. Zarubina, A. P. Biotesting the biological effects of single-wall carbon nanotubes using bioluminescent bacteria test-system / A. P. Zarubina, E. P. Lukashev, L. I. Deev, I. M. Parkhomenko, A. B. Rubin // Nanotechnologies in Russia. — 2009. — V. 4. — P. 871-875.

157. Zheng, H. Rapid determination of nanotoxicity using luminous bacteria / H. Zheng, L. Liu, Y. Lu, Y. Long, L. Wang, K. P. Ho, K. Y. Wong // Analytical Sciences. — 2010. — V. 26. — P. 125-128.

158. Gottschalk, F. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO2, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions / F. Gottschalk, T. Sonderer, R. W. Scholz, B. Nowack // Environmental science & technology. — 2009. — V. 43. — P. 9216-9222.

159. Приказ Министерства здравоохранения Украины от 27 декабря 2012 года №1130 “Об утверждении Порядка проведения подтверждения соответствия условий производства лекарственных средств требованиям надлежащей производственной практики” [Электронный ресурс]. — Режим доступа: http://continent-online.com/Document/?doc_id=31328575#pos=0;0

160. Mendizábal, C. G. Preparing the EU Innovation Plan / C. G. Mendizábal // JRC Newsletter. — 2010. Режим доступа: http://www.aerohabitat.eu/uploads/media/JRS_-_newsletter_2010_03.pdf.

161. ГОСТ 17.4.4.02-84—2008 Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа. — М. : Стандартинформ, 2008. — 7 с.

162. ГН 1.2.3111-13—2014 Гигиенические нормативы содержания пестицидов в объектах окружающей среды (перечень). — М. : Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014. — 131 с.

163. ГН 2.1.7.2041-06—2006 Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в почве. — М. : Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006 — 15 с.

164. Nunes, B. The use of cholinesterases in ecotoxicology / B. Nunes // Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. — 2011. — V. 212. — P. 29-59.

165. Колосова, Е. М. Комплексный ферментативный биотест для оценки загрязнения почвы / Е. М. Колосова, О. С. Сутормин, Е. Н. Есимбекова, В. И. Лоншакова-Мукина, В. А. Кратасюк // Доклады академии наук. — 2013. — № 1. — С. 103-107.

166. Kratasyuk, V.A. Software for matching standard activity enzyme biosensors for soil pollution analysis / V. A. Kratasyuk, E. M. Kolosova, O. S. Sutormin, V. I. Lonshakova-Mukina, M. M. Baygin, N. V. Rimatskaya, I. E. Sukovataya, A. A Shpedt // Sensors. — 2021. — V. 21. — P. 1017.

167. Luby-Phelps, K. The submicroscopic properties of cytoplasm as a determinant of cellular function / K. Luby-Phelps, F. Lanni, D. L. Taylor // Annual review of biophysics and biophysical chemistry. — 1988. — V. 17. — P. 369-396.

168. Verkman, A. S. Aquaporin water channels and endothelial cell function / A. S. Verkman // Journal of anatomy. — 2002. — V. 200. — P. 617-627.

169. van Eunen, K. Testing biochemistry revisited: how in vivo metabolism can be understood from in vitro enzyme kinetics / K. van Eunen, J. A. Kiewiet, H. V. Westerhoff, B. M. Bakker // PLoS computational biology. — 2012. — V. 8. — P. e1002483.