

На правах рукописи



Лоншакова-Мукина Виктория Ивановна

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ И
БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ ФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ СВЕЯЩИХСЯ
БАКТЕРИЙ В ГЕЛЕОБРАЗНОЙ СРЕДЕ КРАХМАЛА И ЖЕЛАТИНА**

1.5.2. Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Красноярск - 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН) – обособленном подразделении Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук (ИБФ СО РАН) и Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ)

Научный руководитель: **Есимбекова Елена Николаевна**
кандидат биологических наук, доцент

Официальные оппоненты: **Евтюгин Геннадий Артурович**
доктор химических наук, профессор
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (ФГАОУ ВО КФУ), г. Казань, заведующий кафедрой аналитической химии

Кусайкин Михаил Игоревич
доктор биологических наук, доцент
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук (ТИБОХ ДВО РАН), г. Владивосток, ведущий научный сотрудник лаборатории химии ферментов, заместитель директора по научной работе

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (ФГБОУ ВО МГУ), г. Москва

Защита диссертации состоится «21» декабря 2022 года в 11:00 на заседании диссертационного совета 24.1.228.03 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН) по адресу: 660036, г. Красноярск, Академгородок, д. 50, стр. 50.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБФ СО РАН и на сайте <http://www.ibp.ru>

Автореферат разослан «___» октября 2022 года

Учёный секретарь
диссертационного совета



Дементьев Дмитрий Владимирович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Наличие широкого ряда ингибиторов у фермента бутирилхолинэстеразы, среди которых фосфорорганические соединения, карбаматы, хлорорганические соединения и другие вещества, являющиеся токсичными для организма теплокровных животных, привело к широкому использованию бутирилхолинэстеразы в качестве аналитической системы, применяемой для контроля содержания данных соединений в образцах различных сред. В свою очередь биферментная система светящихся бактерий NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза показала свою перспективность в разработке интегральных тестов для анализа таких ингибиторов, как фенолы, хиноны и тяжелые металлы. Однако низкая стабильность белков-катализаторов является одной из основных причин, которые тормозят их широкое применение в ингибиторном анализе. В связи с этим интерес к изучению процессов их денатурации не утихает до настоящего времени, и весьма актуальным является поиск условий, обеспечивающих длительное стабильное функционирование ферментов. В живой клетке стабильность ферментов достигается преимущественно за счет их включения в субклеточные структуры, которые представляют собой более устойчивые комплексы. Также нативные белки *in vivo* стабилизируются за счет наличия внутри клетки специализированных факторов природного происхождения. Кроме того, необходимое количество активных молекул белка в клетке поддерживается за счет его ресинтеза. *In vitro* последний фактор невозможно реализовать, в то время как первые упомянутые заслуживают пристального внимания.

Инактивация ферментов под действием температуры сопряжена со структурными изменениями белковой молекулы. Следовательно, изменение каталитической активности белковых катализаторов в результате действия температуры, может служить источником информации для анализа влияния окружения на структуру белковой молекулы в процессе её инактивации.

Цель и задачи исследования. Цель данной работы состоит в анализе влияния гелевого окружения на функционирование бутирилхолинэстеразы и биферментной системы светящихся бактерий NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза для конструирования стабильных многокомпонентных препаратов, применимых в ингибиторном анализе.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Определить значения активационных параметров термической инактивации бутирилхолинэстеразы и биoluminesцентной ферментной системы светящихся бактерий в гелеобразных средах крахмала и желатина.
- 2) Установить кинетические особенности ингибирования бутирилхолинэстеразы модельными ингибиторами в гелеобразных средах крахмала и желатина.
- 3) Подобрать условия иммобилизации бутирилхолинэстеразы и биферментной системы светящихся бактерий NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза, обеспечивающие оптимальную активность и стабильность ферментов при сохранении чувствительности к действию ингибирующих веществ.
- 4) Разработать упрощенный способ тестирования водных проб на наличие веществ антихолинэстеразного действия с использованием многокомпонентного иммобилизованного препарата на основе бутирилхолинэстеразы.

Научная новизна работы. В настоящей работе впервые изучен процесс температурной инактивации бутирилхолинэстеразы лошади в гелеобразных средах, созданных полимерами крахмала и желатина. Установлено, что термическая инактивация бутирилхолинэстеразы представляет собой двухстадийный процесс: диссоциация тетрамерного фермента на мономеры и инактивация образовавшихся мономеров. Проведено сравнение между биофизическими параметрами $\Delta H^\#$ и $\Delta S^\#$ процесса термической денатурации бутирилхолинэстеразы лошади и биферментной системы светящихся бактерий NAD(P)H-FMN-оксидоредуктаза+люцифераза в отсутствие и присутствии высокомолекулярных соединений крахмала и желатина. Показано, что в

присутствии крахмального и желатинового гелей повышается стабильность ферментов при действии повышенных температур. Впервые изучена кинетика ингибирования бутирилхолинэстеразы лошади фосфорорганическими соединениями в гелеобразном окружении желатина и крахмала. Показано, что также как в водном растворе, в растворах крахмала и желатина сохраняется смешанный (конкурентно-неконкурентный) тип ингибирования активности фермента. Разработан новый способ получения стабильных многокомпонентных препаратов на основе бутирилхолинэстеразы и упрощенный способ интегрального определения фосфорорганических пестицидов в образцах сред с использованием данного препарата. Проведена оптимизация состава реагента на основе биферментной системы светящихся бактерий NAD(P)H-FMN-оксидоредуктаза+люцифераза, в результате чего повысилась стабильность ферментов с сохранением чувствительности к действию ингибирующих веществ.

Практическая значимость работы. Проведена экспериментальная проверка возможности применения разработанного ферментативного препарата на основе бутирилхолинэстеразы для интегральной оценки загрязнения водных растворов фосфорорганическими соединениями. Разработан оптимизированный по составу реагент на основе биферментной системы светящихся бактерий NAD(P)H-FMN-оксидоредуктаза+люцифераза, обладающий чувствительностью к действию фенолов, хинонов и тяжелых металлов. Разработанные многокомпонентные иммобилизованные реагенты могут использоваться в качестве тест-объектов для проведения экспресс-методов тестирования сточных вод промышленных предприятий или экологического мониторинга природных вод с целью контроля содержания ингибиторов бутирилхолинэстеразы и ферментов светящихся бактерий.

Положения, выносимые на защиту:

1. Рассчитанные значения активационных параметров термической инактивации бутирилхолинэстеразы и биolumинесцентной ферментной системы светящихся бактерий доказывают стабилизирующий эффект, оказываемый гелеобразным окружением природных полимеров крахмала и желатина.
2. В гелеобразной среде крахмала и желатина сохраняются значения кинетических параметров реакции, катализируемой бутирилхолинэстеразой, и тип ингибирования фермента веществами антихолинэстеразного действия.
3. Оптимизированные по составу многокомпонентные иммобилизованные препараты на основе бутирилхолинэстеразы и NAD(P)H-FMN-оксидоредуктазы+люциферазы характеризуются стабильностью при хранении и чувствительностью к действию ингибиторов.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов подтверждена достаточным объемом данных, их воспроизводимостью, а также использованием современных методов исследования и статистического анализа при проведении научной работы.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на следующих конференциях: 20-я Международная конференция «Методы экологического контроля» (20th International Conference on Environmental Indicators), 16-19 сентября 2013 г., г. Трир, Германия; 10-ая Международная конференция «Стабилизация белков» (10th International Conference on Protein Stabilization), 7-9 мая 2012 г., г. Стреза, Италия; 18-ый Международный симпозиум по биolumинесценции и хемилюминесценции (ISBC 2014), 23 - 28 июня 2014 г., г. Уппсала, Швеция; Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Перспектива Свободный-2016», г. Красноярск, 15-25 апреля 2016 г.; II-ая Международная конференция «Биотехнология материалов – окружающая среда – качество жизни», г. Красноярск, 24–29 сентября 2017 г.; III-ая Международная конференция «Биотехнология материалов – окружающая среда – качество жизни», г. Красноярск, 30 сентября - 04 октября 2018 г.; Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Перспектива Свободный-2019», г. Красноярск, 22-26 апреля 2019 г.; VI

Съезд биофизиков России, г. Сочи, 16-21 сентября 2019 г.; Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Перспектив-2020», г. Красноярск, 20 апреля - 18 мая 2020 г.; Конференция молодых учёных ИБФ СО РАН, г. Красноярск, 20 мая 2020 г.; Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Перспектив-2021», г. Красноярск, 2020 г.; Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2021», г. Москва 12-23 апреля 2021 г.; Конференция молодых учёных ИБФ СО РАН, г. Красноярск, 30 марта 2022 г.

Публикации. По результатам работы опубликовано 29 печатных работ: 10 статей в журналах из списка ВАК РФ (Web of Science, Scopus, РИНЦ), 17 - в сборниках докладов научных конференций; получены 2 патента РФ.

Личный вклад автора заключается в непосредственном участии во всех этапах исследования: от формулировки цели и задач, выбора и постановки методов исследований до проведения экспериментов с последующей интерпретацией и обобщением результатов, а также в подготовке докладов конференций и публикаций.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертация соответствует паспорту специальности 1.5.2. Биофизика. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования «Молекулярная биофизика» паспорта специальности 1.5.2. Биофизика.

Структура и объем работы

Диссертационная работа изложена на 115 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, трех глав с изложением результатов работы, выводов, заключения, списка сокращений и условных сокращений и списка литературы (158 источников, в том числе 114 зарубежных). Диссертация иллюстрирована 29 рисунками и 12 таблицами.

Список сокращений

$\Delta H^\#$ - энтальпия активации;

$\Delta S^\#$ - энтропия активации;

E_a – энергия активации Аррениуса;

K_m – константа Михаэлиса;

K_m' – кажущаяся константа Михаэлиса;

V_{max} – максимальная скорость реакции;

V_{max}' – кажущаяся максимальная скорость реакции

BChE – бутирилхолинэстераза;

DTNB – 5-5'-дитиобис (2-нитробензойная кислота);

R+L – биферментная система NAD(P)H-FMN-оксидоредуктаза+люцифераза;

S-BCh-I – бутирилтиохолин йодид;

БСА – бычий сывороточный альбумин;

ДТТ – дитиотрейтол;

МИБС – многокомпонентная иммобилизованная биферментная система;

МЭ – меркаптоэтанол;

ПДК – предельно допустимая концентрация;

ФОС – фосфорорганические соединения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы исследований, изложены цели и задачи работы, показана научная новизна и практическая значимость проводимых исследований; сформулированы положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы. В литературном обзоре освещаются основные методы стабилизации ферментов. Приводится характеристика некоторых методов стабилизации ферментов (иммобилизация, стабилизация за счет внесения специализированных добавок). Приводятся результаты применения этих методов для стабилизации ацетилхолинэстераз и биоллюминесцентных ферментных систем. Описываются физические и химические свойства крахмала и желатина, позволяющие использовать их в качестве матриц, стабилизирующих ферменты. В связи с тем, что большинство ферментативных препаратов используются в качестве основы для разработки методов биотестирования (в том числе «экспресс-тестов»), часть литературного обзора посвящена описанию существующих на сегодняшний день ферментативных методов анализа с использованием препаратов на основе холинэстераз и биоллюминесцентных ферментов.

Материалы и методы. В данной главе приводится список используемых реактивов с указанием их изготовителей и степени очистки. Описывается аппаратура, на которой проводилась экспериментальная работа. Излагаются применяемые методы исследования, подробно описываются методики экспериментов.

В работе использовали лиофилизированный препарат высокоочищенных ферментов (КРАБ), содержащий люциферазу (L) из рекомбинантного штамма *Escherichia coli* и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазу (R) из *Vibrio fischeri*, произведенный в лаборатории нанобиотехнологии и биоллюминесценции Института биофизики СО РАН (Красноярск). Один флакон КРАБ содержал 0,5 мг люциферазы и 0,15 единиц активности NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы. Использовали лиофилизированную бутирилхолинэстеразу (BChE) из лошадиной сыворотки («Sigma», Германия), активность BChE составляла 900 U/мг. В работе использовали следующие реактивы: NADH, FMN, меркаптоэтанол, бычий сывороточный альбумин («Serva», Германия); тетрадеканаль («Merck», Германия); дитиотрейтол («Gerbu», Германия); фенолы и хиноны: гидрохинон, резорцин, пирокатехин, бензохинон, толухинон, тимохинон, нафтохинон («Sigma», США); соли металлов: CuSO₄, CoCl₂, HgCl₂ марки ч.д.а.; S-бутирилтиохолин йодид, 5-5'-дитиобис (2-нитробензойная кислота) (DTNB), малатион, глифосат, пиримифосметилл, неостегмин, хлорофос, картофельный крахмал, желатин («Sigma», Германия). Для приготовления растворов использовали 0,05 М калий-фосфатный буфер pH 6,9 и pH 8,1 для ферментативных систем R+L и BChE соответственно.

Измерения кинетики биоллюминесцентных реакций проводили на биоллюминометре Lumat LB 9507 (Berthold Technologies, Германия). Определение оптической плотности образцов проводили на спектрофотометре UVIKON 943 A («Contron Instruments», Италия) и UV-2600 («Shimadzu», Япония). Дозирование препаратов проводили с помощью автоматической станции пробоподготовки ерMotion 5075 фирмы «Eppendorf» (Германия) и автоматического шестиканального микродозатора фирмы «Sartorius» (Финляндия).

Результаты и обсуждения

В данной работе влияние крахмала и желатина на активность (A) BChE определяли по скорости ферментативного гидролиза субстрата S-BCh-I в зависимости от концентрации стабилизаторов в растворе при температуре 25°C (рис. 1). Концентрации крахмала варьировали от 1 до 4,2%, концентрации желатина - от 0,4 до 3%. Данный концентрационный диапазон определен эмпирически, исходя из экспериментальных данных, полученных в процессе изучения препаратов иммобилизованных ферментов [Bezrukikh et al., 2014; Lonshakova-Mukina et al., 2018]. При более низких концентрациях гелевая сетка не образуется [Измайлова и др., 2004; Shiotsubo et al., 1983], к тому же реагенты, полученные на основе низкоконтрированных растворов полимеров, в

процессе высушивания становятся хрупким и непригодными для проведения интегрального анализа. Имобилизованные реагенты на основе более высоких концентраций неудобны в использовании из-за нежелательных кинетических характеристик (длительное время, требующееся для регидратации гелей, приводит к увеличению времени анализа). Кроме того, очень вязкие растворы трудно дозировать при приготовлении имобилизованных препаратов, предназначенных для проведения одного анализа.

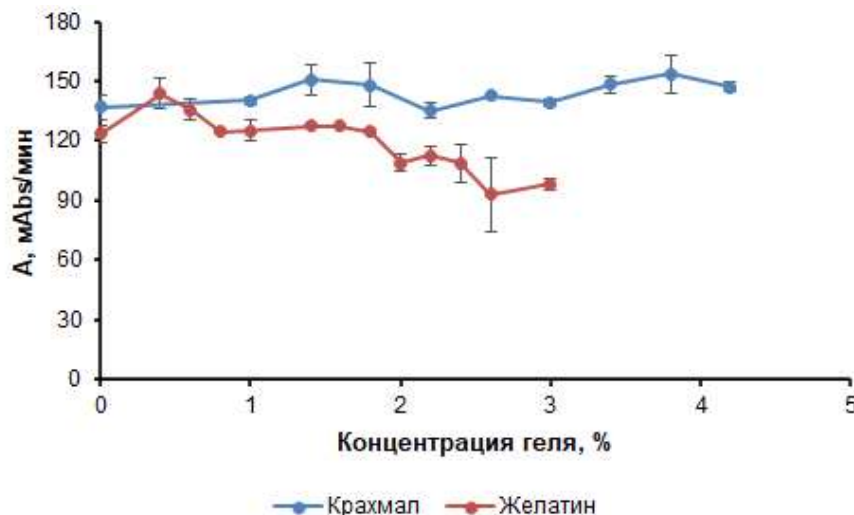


Рисунок 1 – Зависимость активности (A) BChE от концентрации крахмала или желатина [Lonshakova-Mukina et al., 2021].

Наибольшая активность BChE наблюдалась в среде с концентрацией желатина 0,4 - 0,6 %, но эти концентрации ниже критической, необходимой для образования гелей при температуре 25°C (при этой концентрации растворы желатина представляли собой золи). При концентрации желатина от 1 до 2 % активность BChE не менялась, а внесение фермента в растворы с более высокой концентрацией желатина приводило к снижению его активности. Известно, что процессы гелеобразования в желатиновых растворах начинают происходить при более низких температурах и концентрациях по сравнению с аналогичными процессами в крахмальных растворах, таким образом можно объяснить снижение активности фермента в присутствии желатина при его концентрации, превышающей 1,8 % возникающими диффузионными ограничениями. В дополнение к этому стоит отметить, что субстрат S-BCh-I является положительно заряженной молекулой, а при увеличении концентрации желатина увеличивается общее количество аминокислотных остатков лизина, что может приводить к ограничению доступности молекул субстрата для активного центра фермента из-за возникающих электростатических взаимодействий.

Одной из важнейших характеристик ферментов, используемых в аналитических исследованиях, является их температурная стабильность. Данный параметр не только определяет возможность практического применения фермента, но и позволяет количественно оценить степень его стабилизации специализированными добавками или средами, которые используются с целью повышения устойчивости каталитической активности фермента и, как следствие, стабильности аналитического сигнала.

Для исследования механизмов термической инактивации BChE, выделенной из лошадиной сыворотки, и определения биофизических параметров данного процесса выбраны 1,4 % желатиновый и 3 % крахмальный гели. При данных концентрациях полимеров активность BChE сравнима с активностью в водном буферном растворе, помимо этого, данные концентрации подходят для приготовления одноразовых имобилизованных реагентов для анализа веществ антихолинэстеразного действия [Esimbekova et al., 2015].

Для оценки возможного стабилизирующего действия гелеобразных сред крахмала и желатина на ВChE были построены кинетические зависимости температурной инактивации фермента в температурном диапазоне от 55 до 64 °С в координатах уравнения первого порядка. Полученные кинетические зависимости температурной инактивации ВChE при различных температурах, представленные на рисунке 2, демонстрируют сохранение механизма инактивации при использовании желатинового и крахмального гелей в качестве среды, в которой протекает ферментативная реакция.

Во всех исследуемых средах (буфер, крахмал, желатин) кинетические зависимости в координатах первого порядка имеют излом, говорящий о протекании как минимум двух последовательных процессов, характеризующихся разными скоростями: первый – с большей скоростью («быстрая» реакция) и второй – с меньшей скоростью («медленная» реакция). Значения рассчитанных констант скоростей представлены в таблице 1.

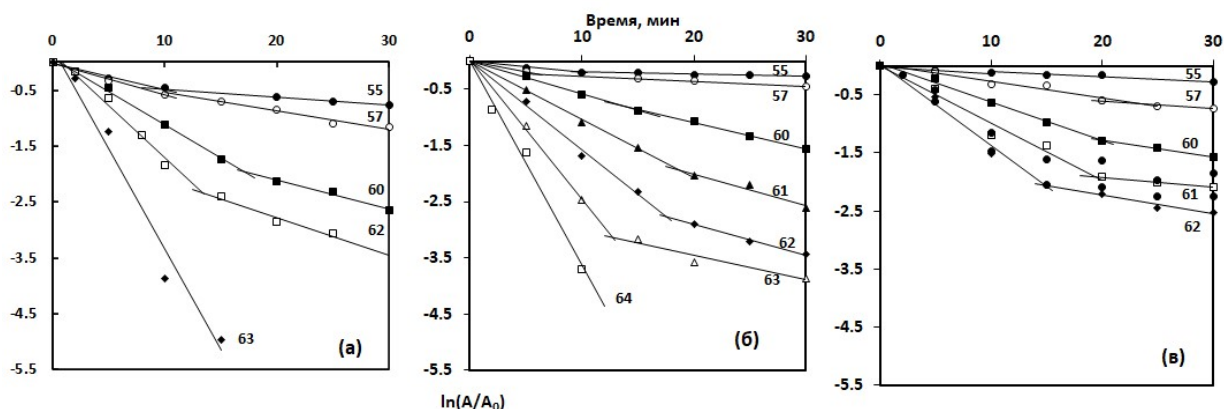


Рисунок 2 – Кинетические зависимости температурной инактивации ВChE при различных температурах в координатах уравнения первого порядка. Номер кривой – значение температуры в °С; (а) в буферном растворе, (б) в желатиновом геле, (в) в крахмальном геле; A_0 – начальная активность ВChE, A – активность ВChE после воздействия исследуемой температуры [Lonshakova-Mukina et al., 2021].

Таблица 1. Эффективные константы скоростей «быстрой» (k_1 , мин⁻¹) и «медленной» (k_2 , мин⁻¹) реакций термической инактивации ВChE в присутствии 1,4 % желатина, 3 % крахмала или буферного раствора при разных температурах [Есимбекова и др., 2020].

Т, °С	Буфер		1,4 % желатин		3 % крахмал	
	$k_1 \cdot 10^3$	$k_2 \cdot 10^3$	$k_1 \cdot 10^3$	$k_2 \cdot 10^3$	$k_1 \cdot 10^3$	$k_2 \cdot 10^3$
55	47 ± 2	19 ± 1	19,5 ± 1,6	3,8 ± 0,6	12 ± 2	11,0 ± 1,4
57	58 ± 2	32 ± 3	38 ± 2	9,0 ± 0,8	24 ± 3	7,7 ± 1,3
60	53 ± 3	53 ± 4	49 ± 5	46 ± 7	67 ± 9	28 ± 3
61	114 ± 5	48 ± 5	104 ± 5	56 ± 5	98 ± 8	17 ± 2
62	190 ± 20	47 ± 20	160 ± 10	110 ± 8	140 ± 20	33 ± 3
64	-	-	460 ± 50	-	141 ± 9	21 ± 2

Наличие характерного излома позволяет предположить, что, по-видимому, преимущественно реализуется диссоциативный механизм инактивации [Полтораки и др., 1998]. Однако отсутствие зависимости в изменении константы скорости «медленной» реакции от температуры свидетельствует о протекании как минимум еще одного процесса. Во-первых, причиной может являться образование переходного состояния фермента – «плавящейся глобулы» белковой молекулы. Подобные состояния могут наблюдаться для олигомерных ферментов, имеющих достаточно стабильную четвертичную структуру. Субъединицы нативной ВChE, выделенной из сыворотки лошади, соединяются между собой посредством устойчивых S-S-связей, разрыв которых затруднен, так как энергия диссоциации достигает 60 ккал/моль [Cremllyn et al., 1996]. Второй возможной причиной

может являться наличие промежуточных активных форм фермента. Однако следует отметить, что и мономерная BChE из печени кролика [Rush et al., 1981], и трипсин-генерирующий мономерный фермент из лошадиной сыворотки [Cauet et al., 1987] проявляют нелинейное и зависящее от времени снижение активности при нагревании выше 50 °С. Таким образом, сложный процесс инактивации тетрамерной BChE лошади может не зависеть от четвертичной структуры и не обязательно включать последовательный механизм термоинактивации. Исключение составляют зависимости, полученные для бутирилхолинэстеразы в буферном растворе и желатиновом геле при температурах 63 °С и 64 °С соответственно. Данные кривые демонстрируют необратимую инактивацию псевдо-первого порядка.

Для проверки предполагаемого диссоциативного характера инактивации BChE проводили полунативный электрофорез в полиакриламидном геле при температуре 65 °С (рис. 3). Полученное распределение белковых фракций свидетельствует о наличии в растворе нативного фермента двух его различных форм: тетрамерной и димерной, причем содержание димеров преобладает. После температурной обработки (предварительное выдерживание при температуре 65 °С в течение 30 мин) просматривается полоса, соответствующая мономерной форме. Однако в растворе частично сохраняются тетра- и димерные формы BChE, что, по-видимому, приводит к нарушению зависимости в изменении константы скорости медленной реакции от температуры, т.к. все формы фермента являются каталитически активными [Eriksson et al., 1979].

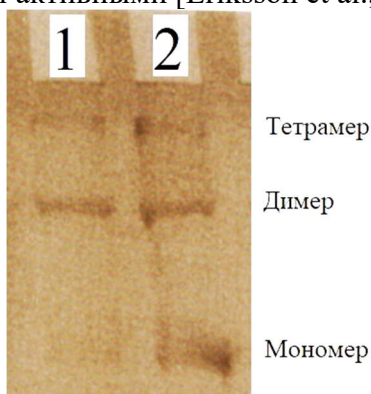
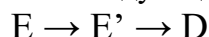


Рисунок 3 – BChE, распределенная с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, с применением кумасси для окрашивания фракций. Дорожка 1 – нативная BChE, дорожка 2 – BChE, предварительно выдержанная при температуре 65 °С в течение 30 мин.

Известно, что нелинейная кинетика инактивации наблюдается и для ацетилхолинэстераз из различных источников [Coleman et al., 1963; Millar et al., 1974; Massoulie et al., 1975; Vigny et al., 1978; Edwards et al., 1983; Rakonczay et al., 1985; Yagüe-Guirao et al., 1986], а также для бутирилхолинэстераз [Cauet et al., 1987; Vigny et al., 1978, Rush et al., 1981]. Из этих данных можно заключить, что термическая инактивация BChE, выделенной из лошадиной сыворотки, не может быть описана простой кинетикой первого порядка. Исходя из вышеизложенного следует, что термическая инактивация BChE лошади представляет собой сложную реакцию, состоящую не менее чем из двух стадий, которые, в свою очередь являются суммой ряда элементарных стадий. Во-первых, обратимая стадия, т. е. диссоциация на мономеры и частичное разворачивание молекул в результате температурного нарушения нековалентных взаимодействий, стабилизирующих нативное свернутое состояние. Во-вторых, необратимая стадия, вызванная различными ковалентными модификациями, зависящими от температуры (дисульфидный обмен, гидролиз пептидных связей, расщепление боковых цепей и т.д.) [Masson et al., 1988].

Общий путь реакции можно изобразить следующей минимальной схемой:



где E обозначает нативный активный свернутый фермент, E' — обратимый частично диссоциированный и/или «расплавленный» фермент, а D — необратимо инактивированное состояние. Предполагается, что каждое состояние представляет собой популяцию белковых молекул, более или менее различающихся по конформации.

Таким образом, общую кинетику температурной инактивации, наблюдаемую при температурах от 55 °С до 63 °С, можно описать с помощью функции, состоящей как минимум из двух экспоненциальных членов [Henley et al., 1986]:

$$A_i/A_0 = Be^{-k_1t} + (1 - B)e^{-k_2t} \quad (1)$$

где A_i — остаточная активность BChE после воздействия температуры в течение времени t , B — предэкспоненциальный множитель, k_1 и k_2 — константы скоростей реакций «быстрой» (диссоциации на мономеры и/или «плавления» тетрамерного фермента) и «медленной» (денатурации) стадий соответственно.

Для количественной оценки стабильности бутирилхолинэстеразы вычисляли активационные параметры ($\Delta G^\#$, $\Delta H^\#$, $\Delta S^\#$) реакции температурной инактивации, используя основное уравнение теории активированного комплекса (уравнение Эйринга):

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = -\frac{\Delta H^\#}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^\#}{R} + \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) \quad (2)$$

$$\Delta G^\# = \Delta H^\# - T\Delta S^\# \quad (3)$$

где R — универсальная газовая постоянная, T — абсолютная температура, k_B — константа Больцмана, h — постоянная Планка.

Используя уравнение Аррениуса (4), рассчитывали значения энергий активации для последовательно сменяющих друг друга «быстрого» и «медленного» процессов, которые представляют собой диссоциацию на мономеры и денатурации образовавшихся мономеров соответственно.

$$k_i = Be^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (4)$$

где E_a — энергия активации.

Значения констант скоростей термоинактивации k_1 и k_2 для «быстрой» и «медленной» стадий инактивации рассчитывали, как тангенс угла наклона кривой температурной инактивации BChE в отсутствие и присутствии стабилизирующих добавок для каждой температурной зависимости. На рисунке 4 (а, б) представлены зависимости констант скоростей «быстрой» и «медленной» реакций от температуры в координатах Аррениуса.

Энергия активации Аррениуса процесса температурной инактивации в буферном растворе составила 47 ± 1 ккал/моль и 30 ± 4 ккал/моль для «быстрой» и «медленной» стадии соответственно. В присутствии крахмального геля значения энергии активации Аррениуса составляют 72 ± 3 и 37 ± 3 ккал/моль, в присутствии желатинового геля значения равны 67 ± 2 и 100 ± 30 ккал/моль для «быстрой» и «медленной» стадий соответственно. Увеличение энергии активации температурной инактивации BChE в присутствии крахмального и желатинового гелей свидетельствует о стабилизации фермента в гелеобразных средах крахмала и желатина.

С использованием классического термодинамического уравнения Эйринга (2) были определены активационные параметры $\Delta H^\#$, $\Delta S^\#$, $\Delta G^\#$, характеризующие температурную инактивацию BChE (таблица 2). Видно, что в растворе желатина энтальпия и энтропия активации процесса термоинактивации увеличивается как для первой стадии термоинактивации, так и для второй. В растворе крахмального геля энтальпия и энтропия активации термоинактивации увеличиваются для «быстрой» стадии термоинактивации, для «медленной» стадии термоинактивации указанные параметры уменьшаются.

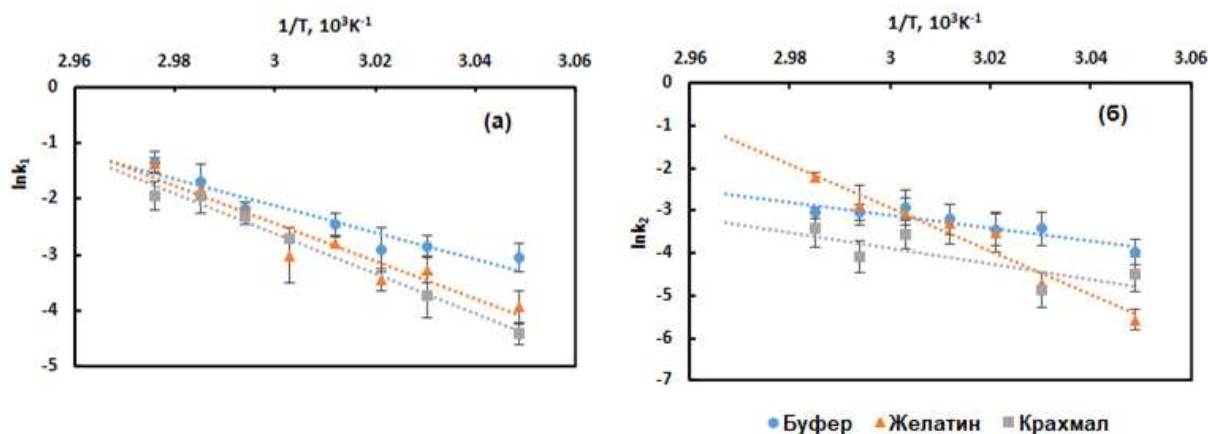


Рисунок 4 – Зависимости констант скоростей реакций k_1 (а) и k_2 (б) от температуры в координатах Аррениуса для реакции температурной инактивации BChE [Lonshakova-Mukina et al., 2021].

Вычисленные значения изменения свободной энергии процесса температурной инактивации BChE для обоих процессов температурной инактивации изменяются в пределах 20 до 23 ккал/моль. Данные значения согласуются со значениями свободной энергии, полученными для большинства белков.

Таблица 2 – Активационные параметры реакции температурной инактивации бутирилхолинэстеразы [Lonshakova-Mukina et al., 2021].

	$\Delta H_1^\#$, ккал/моль	$\Delta H_2^\#$, ккал/моль	$\Delta S_1^\#$, кал/(К·моль)	$\Delta S_2^\#$, кал/(К·моль)
Калий-фосфатный буфер	41 ± 5	32 ± 2	79 ± 2	34 ± 3
3 % крахмал	61 ± 3	22 ± 2	140 ± 10	$-2,03 \pm 0,05$
1,4 % желатин	58 ± 6	110 ± 10	150 ± 20	260 ± 20

Процесс потери нативной структуры белка сопровождается существенным увеличением энтропии и энтальпии, что приводит к изменению энтропии активации $\Delta S^\#$ и энтальпии активации $\Delta H^\#$. В присутствии желатинового геля энтропия активации процесса диссоциации меньше энтропии активации процесса термоинактивации, это может быть связано с тем, что активированный комплекс олигомерного фермента более организован, по сравнению с активированным комплексом фермента второй стадии термоинактивации. В крахмальном геле наблюдается противоположный эффект. В его окружении энтропия активации медленного процесса отрицательна. По-видимому, в окружении крахмала процессы анфолдинга фермента блокированы за счет сохранения гелеобразной структуры при повышенных температурах. Более того, известно, что при повышении температуры макровязкость растворов крахмала изменяется не существенно по сравнению с его микровязкостью, значения которой уменьшаются [Gulnov et al., 2016], что приводит к уменьшению степеней свободы переходного состояния реакции термической денатурации отдельных мономеров BChE в гелеобразной среде крахмала при отсутствии диффузионных ограничений для движения малых молекул субстрата. Положительное значение изменения свободной энергии для обоих процессов свидетельствует об отсутствии самопроизвольности протекания процесса температурной инактивации как в водном буферном растворе, так и в присутствии гелеобразных сред.

Таким образом, добавление различных стабилизирующих веществ значительно повышает термостабильность BChE. Стабилизация ферментов в основном обусловлена уменьшением молекулярных и субмолекулярных движений или молекулярных колебаний [Bromberg et al., 2008]. Известно, что низкомолекулярные стабилизаторы повышают стабильность BChE, например, снижаются активационные параметры температурной

инактивации фермента в присутствии оксида дейтерия [Masson et al., 1988]. В то же время олигомерный белок все еще инактивируется в двухфазном процессе.

В нашем исследовании мы использовали физический гель, так как при охлаждении растворов желатина происходит образование тройных спиралей коллагенового типа. Сетки желатинового геля образуются при температуре ниже 40°C и при концентрации желатина выше критической концентрации гелеобразования. В зависимости от температуры желатин может иметь различную дисперсионную структуру: при температуре ниже температуры гелеобразования ($T < T_g$) желатин гелеобразный; если температура выше температуры гелеобразования ($T > T_g$), желатин является коллоидом. При температуре, равной температуре гелеобразования ($T = T_g$), желатин находится в переходном состоянии золь-гель [de Carvalho et al., 1997; Rapon et al., 2002]. В нашем исследовании мы имеем дело с растворами желатина низкой концентрации, которые способны к гелеобразованию при температуре ниже 27°C. Таким образом, используемый в настоящей работе 1,4%-ный желатиновый гель обладает низкой термостабильностью. Следовательно, при высоких температурах тройные спирали коллагенового типа «плавятся», а желатин превращается из геля в золь. Тем не менее, рассчитанные в настоящей работе значения энергии активации термической инактивации свидетельствуют о стабилизирующем влиянии желатиновой среды на BChE. По-видимому, в исследованном диапазоне температур этот стабилизатор препятствует процессам разворачивания, так как общая вязкость желатинового раствора, безусловно, снижается с повышением температуры [Gulnov et al., 2016].

Картофельный крахмал, использованный в настоящем исследовании, обладает высокой растворимостью (82 % при 95°C) и содержит значительное количество ковалентно связанных групп фосфатного моноэфира (0,06-0,10 %), связанных исключительно с молекулой амилопектина картофеля. Отталкивание одноименных зарядов в водных растворах способствует распутыванию отдельных полимерных молекул, таким образом, картофельный амилопектин увеличивает вязкость и «загущающую способность» паст из картофельного крахмала [Appelqvist et al., 1997]. Кроме того, картофельный крахмал имеет низкую критическую концентрацию. Даже 0,1 г сухого крахмала на 100 мл воды дает при 95°C клейстер, в котором набухшие гранулы занимают практически весь объем. Поскольку температурный интервал гелеобразования картофельного крахмала составляет от 59 до 68°C, гелевая структура крахмала не разрушается при температурах термической инактивации BChE, исследуемых в данной работе. Таким образом, увеличение энергии активации процесса термоинактивации, свидетельствовало об увеличении термостабильности фермента в присутствии растворов крахмала и желатина.

Для выявления сходств и различий в поведении белковых молекул в гелеобразной среде природных полимеров было проведено сравнение активационных параметров температурной инактивации ферментов, относящихся к различным классам: BChE (класс: гидролазы) и биферментной системы светящихся бактерий (класс: оксидоредуктазы). В работе [Bezrukikh et al., 2014] авторы показали, что вязкие среды желатина и крахмала в определенных условиях оказывают стабилизирующее действие на ферменты светящихся бактерий. Например, включение люциферазы и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы в желатиновую и крахмальную среды не меняет скорости их термической инактивации в интервале температур 25–43 °C. Рассчитанные значения активационных параметров (таблица 3) позволяют сделать вывод о том, что, так же, как и на BChE, на биферментную систему светящихся бактерий гелеобразные среды крахмала и желатина оказывают стабилизирующее действие.

Стоит отметить, что при использовании растворов желатина происходит уменьшение энтропии активации «быстрой» реакции, которая, по предположению авторов, соответствует процессу диссоциации олигомерных ферментов на мономеры, а энтропия активации «медленной» реакции, складывающейся преимущественно из процессов денатурации образующихся мономеров, напротив увеличивается.

Таблица 3 – Активационные параметры реакции температурной инактивации R + L.

Раствор	$\Delta H_1^\#$, ккал/моль	$\Delta H_2^\#$, ккал/моль	$\Delta S_1^\#$, кал/(К·моль)	$\Delta S_2^\#$, кал/(К·моль)
Калий-фосфатный буфер	37 ± 9	25 ± 5	74 ± 10	28 ± 5
Желатин 1%	28 ± 7	44 ± 10	42 ± 8	89 ± 10
Желатин 5%	22 ± 7	60 ± 10	26 ± 5	150 ± 10
Крахмал 5%	21 ± 8	17 ± 5	21 ± 6	$-3,4 \pm 0,5$

В гелеобразной среде крахмала энтропия активации уменьшается как для «быстрой», так и для «медленной» реакции. Это может быть связано с тем, что процессы термоинактивации системы R + L протекают при более низких температурах (23-48 °С), в то время как термическая инактивация BChE происходит при температурах выше 55 °С. При этом процесс денатурации образовавшихся мономеров системы R + L протекает с $\Delta S^\# < 0$, т.е. при формировании переходного состояния медленной реакции происходит уменьшение степеней свободы образовавшегося комплекса, в первую очередь за счет возникающих в данной среде ограничений вращательного и поступательного движений молекул, в то время как для BChE также наблюдается $\Delta S^\# < 0$ для процесса денатурации мономеров. Данное сходство можно объяснить одинаковым влиянием гелевой структуры крахмала, которая не разрушается при температурах термической инактивации как BChE, так и R + L, в результате чего и происходит увеличение степени организованности образующихся переходных состояний ферментов.

Однако эффект термостабилизации гелеобразными средами крахмала и желатина не очевиден, так как он наблюдается не для всех ферментов. Так, например, в работе [Говорун и др., 2019] рассчитанные значения энергий активации процесса термоинактивации для стадии диссоциации NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы (R) из *Vibrio fischeri* существенно не отличались от соответствующего параметра в буферном растворе и составили 79 ± 9 кДж/моль (в буферном растворе), 79 ± 8 кДж/моль (в 2% крахмале) и 83 ± 12 кДж/моль (в 1% желатине). Тем не менее, было показано, что кинетика процесса инактивации R, так же, как и BChE, в присутствии полимеров не изменяется.

Таким образом, установлено, что в желатиновом геле энтропия и энтальпия активации BChE увеличиваются, как для «быстрого», так и для «медленного» процесса термической инактивации. Следовательно, увеличиваются скорости как диссоциации BChE на мономеры, так и процесса инактивации образующихся мономеров. В крахмальном геле энтропия и энтальпия активации BChE увеличиваются для «быстрого» процесса, для «медленного» процесса – уменьшаются. Следовательно, увеличивается скорость диссоциации BChE на мономеры, скорость процесса инактивации образующихся мономеров уменьшается. Проведено сравнение процессов температурной инактивации BChE и биферментной системы светящихся бактерий R + L в гелеобразной среде крахмала и желатина. Биофизические параметры стабильности ферментов ($\Delta H^\#$, $\Delta S^\#$) демонстрируют наличие стабилизирующего эффекта природных полимеров на исследуемые ферменты.

Детальное изучение процессов температурной инактивации в гелеобразной среде, позволит понять, как это может происходить внутри живой клетки и, тем самым, заполнить пробел, возникший в понимании различий, существующих между функционированием белковых катализаторов *in vitro* и *in vivo*. Действительно, регистрировать кинетику ферментативных реакций (в том числе термической инактивации) *in vivo* является чрезвычайно непростой задачей, требующей использования непростых методик, например, флуоресцентной микроскопии или микрофотометрии. При этом, в литературе есть данные, что интенсивное облучение возбуждающим излучением оказывает стрессовое влияние на клетку, что, в свою очередь, безусловно будет приводить к изменению кинетических профилей, протекающих внутри неё реакций. Вязкие среды, создаваемые крахмальными и желатиновыми гелями, являются перспективными для моделирования внутриклеточной среды. Так, крахмальные взвеси имитируют среды с неоднородной полярностью и

вязкостью, что недостижимо при использовании растворимых белков (например, альбуминов). В свою очередь желатиновые гели моделируют цитоскелет и общее порозластичное поведение цитоплазмы.

Для определения влияния гелеобразной среды на механизмы ингибирования бутирилхолинэстеразы веществами антихолинэстеразного действия было проведено исследование зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в присутствии обратимого ингибитора – неостигмина в буферном растворе, желатиновом и крахмальном гелях. Концентрация неостигмина составляла 2 μM .

Выбранные в настоящей работе концентрационные диапазоны субстрата, позволяют считать, что кинетика реакции, катализируемой BChE, описывается простой кинетикой Михаэлиса-Ментен [Masson et al., 1997]:

$$v_0 = \frac{V_{\max}[S_0]}{K_M + [S_0]} \quad (5)$$

где, v_0 – скорость реакции при концентрации субстрата $[S_0]$, $V_{\max}$ – максимальная скорость реакции, K_M – константа Михаэлиса.

K_m , $V_{\max}$ рассчитывали путем регрессионного анализа экспериментальных данных с использованием программы Sigma Plot 11.0.

Получены зависимости, построенные в координатах Лайнуивера-Берка для бутирилхолинэстеразы в отсутствие и присутствии ингибиторов – неостигмина и хлорофоса в различных средах (рис. 5).

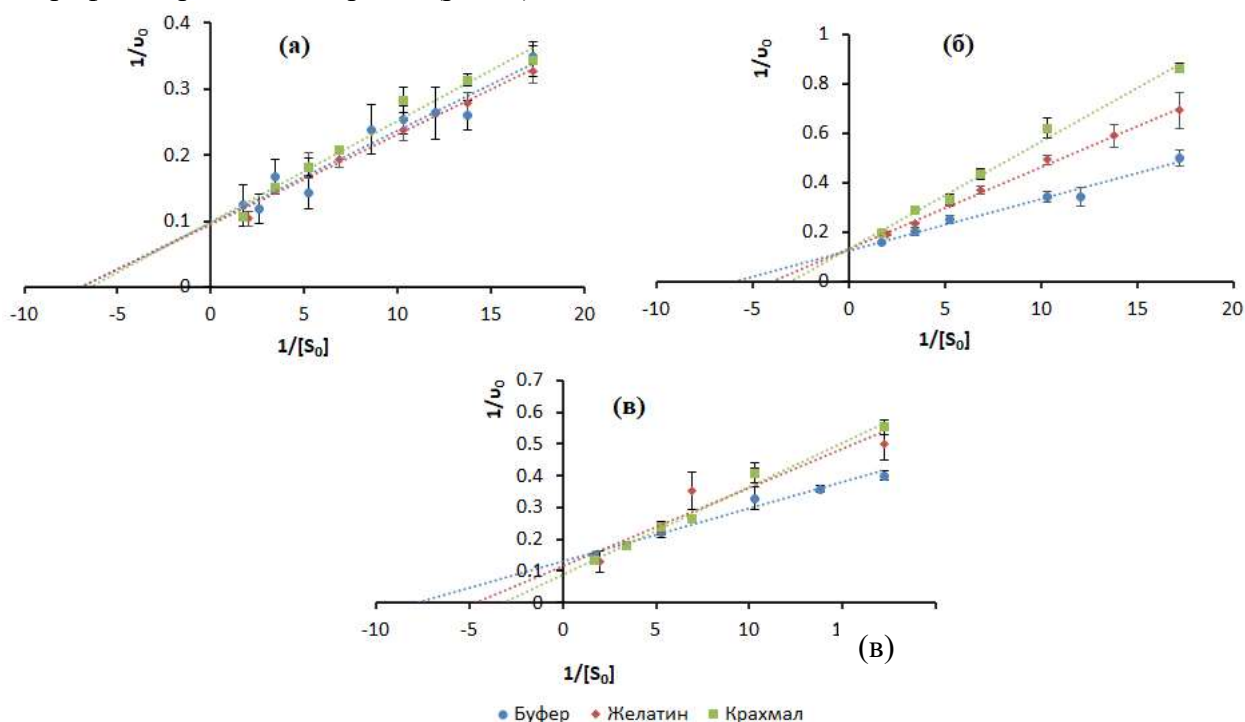


Рисунок 5 – Зависимости скорости реакции от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Берка в водном буферном растворе, крахмальном и желатиновом гелях; (а) – в отсутствие ингибитора, (б) – в присутствии неостигмина, (в) – в присутствии хлорофоса.

На основании полученных графиков, были вычислены основные кинетические параметры ферментативной реакции, значения которых приведены в таблице 4. В исследуемых условиях наблюдается смешанный тип ингибирования – конкурентно-неконкурентное вне зависимости от среды реакционной смеси. В этом случае происходит увеличение константы Михаэлиса и одновременное уменьшение скорости ферментативной реакции в присутствии ингибитора. Стоит отметить, что кинетические параметры реакции в отсутствие неостигмина при изменении среды реакционной смеси изменяются незначительно. В тоже время при добавлении ингибитора изменение данных параметров в

зависимости от среды выражено в большей степени. Так, например, в буферном растворе присутствие неостигмина приводит к увеличению константы Михаэлиса на 15%, а в растворах желатина и крахмала на 71% и 119% соответственно. Похожие результаты получены для хлорофоса, концентрация которого составляла 0,1 мМ.

Таблица 4 - Кинетические параметры уравнения Михаэлиса-Ментен.

Кинетический параметр	Буфер		Желатин		Крахмал	
K_m , $\mu\text{Моль}$	150 $\pm$ 30		140 $\pm$ 20		160 $\pm$ 30	
$V_{\max}$, $\text{мМоль}\cdot\text{мин}^{-1}$	10,3 $\pm$ 1,4		10,5 $\pm$ 0,9		10,1 $\pm$ 1,3	
Коэффициент корреляции R^2	0,94		0,98		0,97	
	Буфер		Желатин		Крахмал	
	I1	I2	I1	I2	I1	I2
K_m , $\mu\text{Моль}$	170 $\pm$ 30	130 $\pm$ 20	250 $\pm$ 20	210 $\pm$ 90	340 $\pm$ 60	320 $\pm$ 70
$V_{\max}$, $\text{мМоль}\cdot\text{мин}^{-1}$	8,1 $\pm$ 0,9	7,8 $\pm$ 0,7	7,5 $\pm$ 0,5	8,7 $\pm$ 2,8	7,8 $\pm$ 1,1	11,3 $\pm$ 1,8
Коэффициент корреляции R^2	0,98	0,98	0,99	0,90	0,99	0,99

I1 – неостигмин; I2 – хлорофос.

Тем не менее, сохранение типа ингибирования в гелеобразной среде является крайне важным, и свидетельствует о том, что исследуемые соединения (крахмал и желатин) не влияют на конформацию фермента. Данный результат является фундаментальной основой для дальнейшего использования данных полимеров с целью разработки ферментных биосенсорных систем (в том числе и микрофлюидных).

Разработка стабильных многокомпонентных препаратов

Разработка многокомпонентного препарата на основе бутирилхолинэстеразы

Получение нового, более удобного в работе препарата, возможно путем проведения совместной иммобилизации BChE и индикатора на тиоловые группы – DTNB с последующим высушиванием (получение ферментов в твердой фазе). Добавление DTNB позволит упростить процедуру эксперимента за счет уменьшения количества разводимых растворов, входящих в состав реакционной смеси. Последующее высушивание обеспечит увеличение сроков и упрощение условий хранения. Действительно, известно, что в процессе ретроградации крахмальных растворов происходит рекристаллизация амилозы в виде двойных спиралей, включающих от 40 до 70 остатков глюкозы [Ягофаров и др., 2012]. В результате переплетения этих спиралей, формируются гидрофобные поры, в которые могут включаться молекулы ферментов и, тем самым, попадать в безводное окружение, что, в свою очередь, обеспечивает дополнительную стабилизацию белковых молекул.

При включении BChE в крахмальный гель активность фермента сохраняется (рис. 6). Внесение в состав реагента DTNB не приводит к существенной потере активности препаратов, полученных на основе крахмального геля. Похожие результаты получены при использовании в качестве носителя для иммобилизации желатинового геля. Таким образом, как крахмальный, так и желатиновый гели могут использоваться в качестве носителя для получения иммобилизованных препаратов на основе BChE.

Для анализа стабильности полученных препаратов, представляющих собой BChE, иммобилизованную совместно с DTNB в крахмальный и желатиновый гели, при хранении наблюдали за изменением их активности с течением времени. Показано, что препараты отличаются длительным сроком хранения без потери активности. Активность препаратов, содержащих совместно иммобилизованные 0,11 U BChE и 0,2 мМ DTNB, не изменяется при хранении в течение десяти месяцев. Кроме того, показано, что иммобилизованные ферментные препараты сохраняют работоспособность не только в буфере, но и в дистиллированной воде (рис. 7).

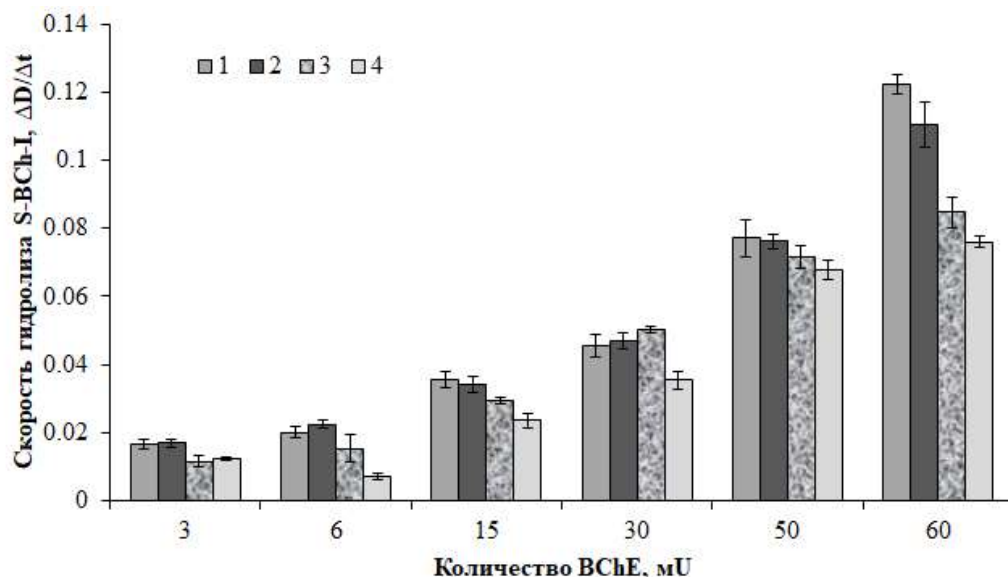
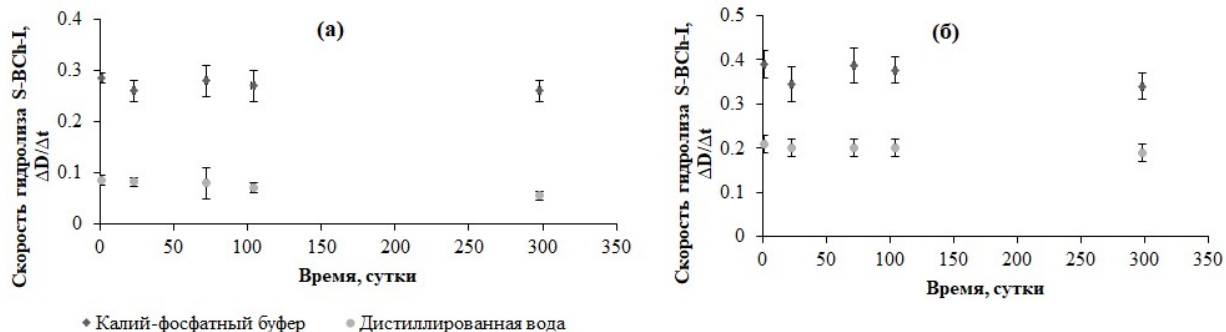


Рисунок 6 – Зависимость скорости гидролиза S-BCh-I от количества BChE. 1 – растворимая BChE, 2 – BChE, иммобилизованная в крахмальном геле, 3 – BChE, иммобилизованная совместно с DTNB в крахмальном геле, 4 – BChE, иммобилизованная совместно с DTNB в желатиновый гель [Lonshakova-Mukina et al., 2022].

Хотя активность препаратов в дистиллированной воде снижается в 2 и 3 раза (в зависимости от природы используемого геля), для дальнейшего использования этих препаратов в ингибиторном анализе факт достаточно высокой их активности в дистиллированной воде является весьма важным, означающим, что данные препараты можно использовать для проведения анализа проб классическим способом тестирования, т.е. проверяя уровень безопасного разведения пробы.



Концентрация индикатора - 0,2 мМ, BChE - 0,11 U
Рисунок 7 – Зависимость скорости гидролиза S-BCh-I бутирилхолинэстеразой, иммобилизованной совместно с DTNB в крахмальном (а) и в желатиновом (б) гели от времени хранения [Lonshakova-Mukina et al., 2022].

Перспективность использования BChE в ингибиторном анализе определена тем, что данный фермент высокоспецифичен к конкретным группам химических веществ (ФОС, карбаматы, хлорорганические соединения), причем все вышеперечисленные являются ингибиторами ферментативной активности. При исследовании влияния других классов загрязняющих веществ (фенолы, хиноны, соли тяжелых металлов) на активность фермента, ингибирующего эффекта не наблюдали [Nunes, 2011]. Для оценки возможности применения разработанного ферментного препарата для определения остаточных количеств пестицидов в объектах окружающей среды, оценили влияние модельных ингибирующих веществ на BChE, иммобилизованную совместно с DTNB. В качестве модельных веществ были выбраны пиримифосметил и малатион, так как данные соединения часто используются в качестве действующих веществ в коммерческих

препаратах инсектицидов. Процесс необратимого ингибирования VChE данными соединениями обусловлен образованием прочной ковалентной связи «фосфорил-серин» в активном центре фермента.

Для описания чувствительности препаратов к действию ингибирующих веществ, использовали параметр IC_{50} (концентрация ингибитора, вызывающая снижение активности VChE на 50 %). Для повышения чувствительности иммобилизованного препарата к ФОС была введена процедура предварительной инкубации препарата в исследуемом растворе пестицида в течение 5 минут. Показано, что препараты на основе желатинового геля не чувствительны к действию ФОС. VChE, иммобилизованная в желатиновом носителе, теряет чувствительность к действию малатиона концентрации 0,5 мкМ, что примерно в 10 раз выше ПДК (рис 8). Это может быть связано с высокой степенью стабилизации фермента данным носителем. В то же время препараты на основе крахмального геля снижают свою активность на 74 % в присутствии 0,05 мкМ малатиона, что соответствует уровню ПДК. Следовательно, с точки зрения практического использования разрабатываемых препаратов в интегральном анализе ФОС в образцах сред, крахмал является более подходящим носителем. Предел обнаружения малатиона в дистиллированной воде составил 5 нМ.

Для дальнейшего изучения были отобраны препараты на основе крахмального геля (содержание VChE 0,11 U, DTNB 0,2 мМ). Показано, что анализируемые вещества в разной степени оказывают влияние на активность препаратов на всем исследуемом диапазоне концентраций. Добавление пиримифосметила снижает активность иммобилизованной VChE. Параметр IC_{50} для данного соединения равен 50 мкМ, что выше уровня ПДК (0,04 мкМ). Предел обнаружения пиримифосметила в дистиллированной воде составил 80 нМ.

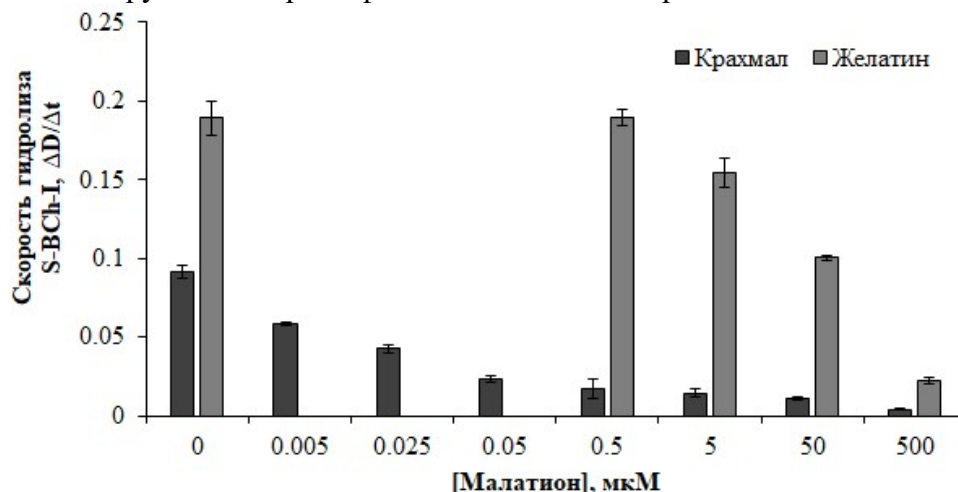


Рисунок 8 – Зависимость скорости ферментативного гидролиза S-BCh-I от типа носителя в присутствии малатиона. В одном реагенте содержится: VChE – 0.11 U, DTNB – 0,2 мМ [Lonshakova-Mukina et al., 2022].

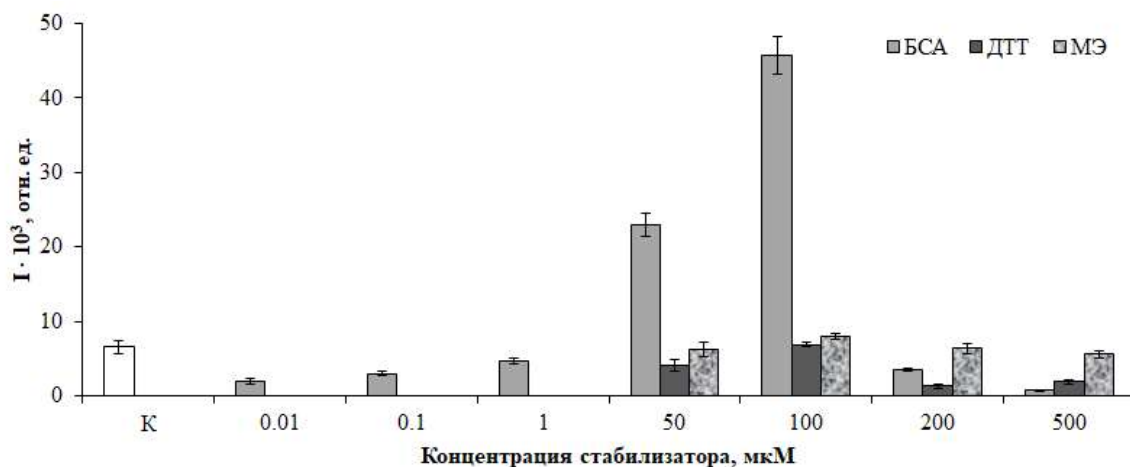
Таким образом, в работе был получен активный и стабильный при хранении препарат, представляющий собой VChE, иммобилизованную совместно с DTNB в крахмальный гель. Предложена методика интегральной оценки содержания веществ антихолинэстеразного действия с использованием многокомпонентного препарата (Патент РФ № 2704264, 2019). Показано, что препарат обладает чувствительностью к действию модельных ФОС (малатион и пиримифосметил). Концентрация малатиона, при которой наблюдается снижение скорости ферментативного гидролиза на 50 % составляет 8 мкг/л [Lonshakova-Mukina et al., 2022].

Оптимизация состава многокомпонентного препарата на основе биферментной системы светящихся бактерий NAD(P)H-FMN-оксидоредуктаза+люцифераза

В качестве добавок, стабилизирующих ферменты, использовали БСА, ДТТ и МЭ различных концентраций. Предполагается, что стабилизирующий эффект альбуминов

может быть связан не только с тем, что увеличивается общая вязкость раствора белков, но и со способностью альбуминов связывать субстраты и/или продукты ферментативных реакций. В работе [Makemson et al., 1991] доказано, что БСА способен связывать длинноцепочечный альдегид, который является одним из субстратов биoluminesцентной реакции светящихся бактерий. В больших концентрациях альдегид оказывает ингибирующее воздействие на биферментную систему, тем самым введение БСА позволяет увеличить скорость реакции и её квантовый выход, а также поддерживать его в течение длительного времени на постоянном уровне. ДТТ и МЭ применяются для «защиты» SH-группы белков от неконтролируемого окисления.

Показано, что иммобилизация биферментной системы светящихся бактерий с указанными компонентами приводит к увеличению активности препаратов в 1,5 раза и выше (рис. 9). Наиболее значительное увеличение интенсивности свечения наблюдается при введении в состав многокомпонентной иммобилизованной биферментной системы (МИБС) БСА, причем его содержание в диске должно составлять не менее 10 мкМ. В этом случае интенсивность свечения иммобилизованного препарата в 13 раз выше по сравнению с контрольным уровнем свечения препарата, приготовленного без добавления стабилизаторов. При добавлении в состав препарата меньших концентраций БСА активирующий эффект либо не проявляется, либо активация осуществляется с гораздо меньшей эффективностью. При увеличении содержания БСА в препарате эффективность стабилизирующего эффекта БСА снижается вплоть до ингибирования активности ферментов при включении в состав препарата 500 мкМ БСА. Это может быть связано с тем, что при высоких концентрациях БСА осуществляются взаимодействия типа белок-белок, что приводит к изменению функциональной активности люциферазы и/или оксидоредуктазы. ДТТ и МЭ в значительно меньшей степени увеличивают интенсивность свечения препарата по сравнению с БСА.

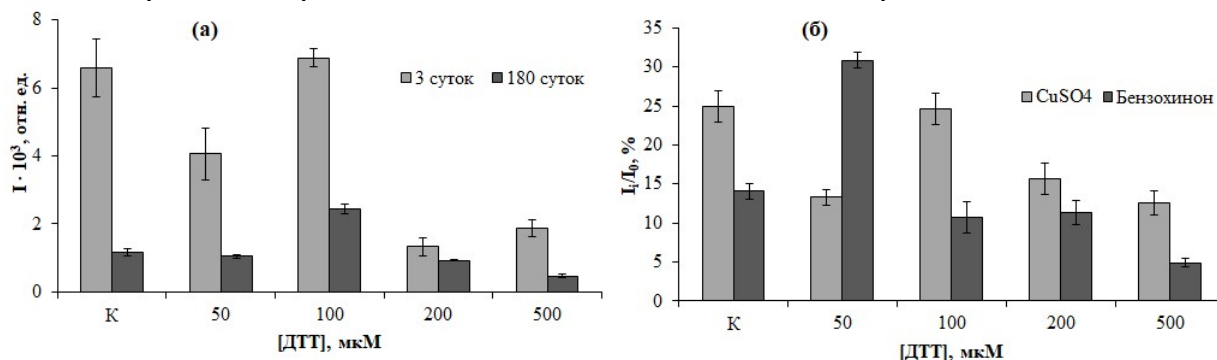


Контроль (К) – препарат, не содержащий стабилизаторов

Рисунок 9 – Зависимость максимальной интенсивности свечения препаратов от концентрации стабилизатора. Измерения активности препаратов проводили в калий-фосфатном буфере [Lonshakova-Mukina и др., 2015]

Зависимости скорости падения интенсивности свечения препарата ($k_{сп}$) от концентрации стабилизатора в диске не наблюдали. Однако можно отметить, что внесение в препарат ДТТ приводит к снижению $k_{сп}$ интенсивности свечения МИБС, а при добавлении МЭ и БСА наблюдается незначительное увеличение $k_{сп}$ по сравнению с $k_{сп}$ контрольного образца. Время выхода свечения МИБС на максимальный уровень также не зависело от концентрации стабилизатора в диске и составило 20-30 с.

Исследованы изменения характеристик МИБС, иммобилизованной совместно со стабилизаторами во времени. Параметры биолюминесценции измерялись через 3 дня после иммобилизации и после 6 месяцев хранения реагента при температуре 4⁰С. Активность контрольного образца (реагент без стабилизаторов) уменьшается за 6 месяцев в 5,5 раза (рис. 10, а). При использовании в качестве стабилизатора ДТТ активность реагента снижется менее интенсивно по сравнению с контролем. Наилучший стабилизирующий эффект проявляется, когда содержание ДТТ в реагенте составляет 100 мкМ, в этом случае активность реагента через 6 месяцев составляет около 40 % от первоначальной величины.



Контроль (К) – реагент, не содержащий стабилизаторов

Рисунок 10 – Зависимость максимальной интенсивности свечения МИБС во времени от концентрации ДТТ в составе реагента (а); Зависимость остаточной интенсивности свечения МИБС в присутствии растворов CuSO₄ и бензохинона при иммобилизации совместно с ДТТ (б).

Добавление в качестве стабилизатора БСА не позволяет сохранить активность реагента, и максимальная интенсивность свечения снижается после 6 месяцев хранения в 6 и более раз. Исключение составляет реагент с концентрацией БСА 50 мкМ, активность которого в течение указанного срока не изменилась. МЭ стабилизирующего действия на реагент не оказал. На всем диапазоне выбранных концентраций наблюдается снижение максимальной интенсивности свечения реагента от 4 до 9 раз в зависимости от концентрации стабилизатора в диске. Следовательно, общего количества SH-групп в используемых концентрациях МЭ недостаточно для сохранения активности ферментов. Время выхода свечения на максимальный уровень после хранения реагента в течение 6 месяцев не изменилось. Рассчитанные значения $k_{сп}$ интенсивности свечения реагента, содержащего ДТТ различных концентраций, в зависимости от времени хранения представлены в таблице 5. При добавлении в состав иммобилизованного реагента БСА $k_{сп}$ не изменяется даже после 6 месяцев хранения. Исключением является реагент, содержащий 1 мкМ БСА, где $k_{сп}$ увеличивается в 3 раза.

Таблица 5 – Значения константы спада свечения ($k_{сп}$) МИБС, иммобилизованной совместно с ДТТ, в зависимости от времени хранения ($t_{хр}$).

Концентрация ДТТ, мкМ	$k_{сп}, \text{мин}^{-1}$	
	$t_{хр} = 3 \text{ дня}$	$t_{хр} = 180 \text{ дней}$
0 (К)	$0,5 \pm 0,1$	$0,260 \pm 0,002$
50	$0,030 \pm 0,007$	$0,3 \pm 0,1$
100	$0,020 \pm 0,005$	$0,16 \pm 0,07$
200	$0,34 \pm 0,05$	$0,05 \pm 0,09$
500	$0,910 \pm 0,006$	$0,22 \pm 0,09$

Таким образом, наибольший стабилизирующий эффект оказывают 100 мкМ ДТТ и 50 мкМ БСА. Активность реагента, содержащего 50 мкМ БСА, при длительном хранении не изменяется, однако скорость падения интенсивности свечения данного реагента

увеличивается в 1,5 раза по сравнению с контрольной. Внесение в состав реагента 100 мкМ ДТТ предотвращает падение активности в течение 6-месячного хранения до 2,5 раз, кроме того, величина $k_{сп}$ меньше контрольной величины в 2 раза.

Следующим этапом работы было определение чувствительности МИБС, иммобилизованной совместно со стабилизаторами, к действию ингибиторов. Для выявления оптимального состава реагента, пригодного для проведения биолюминесцентного биотестирования, в работе проверяли влияние двух модельных ингибиторов на параметры биолюминесценции биферментной системы. В качестве модельных веществ были выбраны сульфат меди (II) и бензохинон, различающиеся по механизму воздействию на биолюминесцентную биферментную систему. О действии ингибиторов на активность МИБС судили по изменению её параметров биолюминесценции в присутствии исследуемого вещества. Определение оптимального состава проводили рациональным методом, то есть за счет прямого экспериментального исследования параметров оптимизации (концентрация стабилизатора, время хранения, чувствительность к ингибиторам) в ограниченном диапазоне их варьирования. Исходя из полученных результатов, для дальнейшего исследования был отобран реагент, содержащий 100 мкМ ДТТ. Данный реагент характеризуется необходимой активностью и стабильностью при хранении, минимальной по сравнению с контрольной скоростью падения интенсивности свечения, а также необходимой чувствительностью к действию модельных ингибиторов.

Проведена оценка чувствительности выбранного реагента к действию других модельных токсических веществ, таких как хиноны (нафтохинон, бензохинон, тимохинон, толухинон), фенолы (гидрохинон, пирокатехин, резорцин) и соли тяжелых металлов (CuSO_4 , CrCl_3 , HgCl_2). Для описания чувствительности МИБС к действию ингибирующих веществ использовали параметр IC_{50} . Показано, что анализируемые вещества в разной степени оказывают влияние на интенсивность свечения МИБС на всем исследуемом диапазоне концентраций. Для большинства исследуемых соединений, чувствительность реагента, не содержащего ДТТ и содержащего 100 мкМ ДТТ, практически не различается. Стоит отметить, что реагент обладает высокой чувствительностью к действию хинонов: значения IC_{50} составляют 0,08 мкг/л для толухинона, 0,7 мкг/л для тимохинона, 3,0 мкг/л для бензохинона и 1,6 мкг/л для нафтохинона, что значительно ниже уровня их ПДК.

Помимо этого, доказаны перспективы использования реагентов, на основе ферментов светящихся бактерий, для анализа токсичности наноматериалов: однослойных (SWCNT) и многослойных (MWCNT) углеродных нанотрубок и гидратированных растворов фуллеренов (C_{60}HyFn) [Esimbekova et al., 2017]. Показано, что ингибирующая активность углеродных наноматериалов на биферментную систему снижается в следующем порядке: $\text{MWCNT} > \text{SWCNT} > \text{C}_{60}\text{HyFn}$. Растворимые ферменты обладали высокой чувствительностью к MWCNT и SWCNT со значениями параметра ингибирования IC_{50} , равными 0,012 и 0,16 мг/л соответственно. Иммобилизованная ферментная система более чувствительна к C_{60}HyFn , чем растворимая форма, с IC_{50} , равной 1,4 мг/л.

Выводы:

1. В гелеобразных средах природных полимеров крахмала и желатина, также, как и в их отсутствие (контроль), наблюдается механизм термоинактивации бутирилхолинэстеразы, включающий два последовательных и протекающих с разными скоростями процесса – диссоциация фермента на мономеры и инактивация мономеров.
2. Значения энергии активации процесса температурной инактивации в присутствии крахмального геля составили 72 ± 3 и 37 ± 3 ккал/моль, в присутствии желатинового геля – 67 ± 2 и 100 ± 30 ккал/моль для быстрой и медленной стадий термоинактивации соответственно. Увеличение энергии активации температурной инактивации бутирилхолинэстеразы в присутствии крахмального и желатинового гелей в 1,4 – 3 раза по сравнению со значениями в водном буферном растворе свидетельствует о стабилизации фермента гелеобразными средами крахмала и желатина.

3. Рассчитанные значения $\Delta S^\#$ для бутирилхолинэстеразы и NAD(P)H-FMN-оксидоредуктазы+люциферазы в гелеобразной среде крахмала составляют $-2,03 \pm 0,05$ и $-3,4 \pm 0,5$ кал/(К·моль) соответственно. Таким образом, при воздействии повышенных температур в гелеобразной среде крахмала достигается уменьшение степеней свободы переходного состояния реакции термической денатурации отдельных мономеров как бутирилхолинэстеразы, так и NAD(P)H-FMN-оксидоредуктазы+люциферазы, что объясняется сохранением макровязкости крахмальных растворов в диапазоне исследуемых температур.

4. Значения кинетических параметров реакции, катализируемой бутирилхолинэстеразой, (констант Михаэлиса и максимальной скорости реакции) в водном буферном растворе (контроль) и в гелеобразных средах крахмала и желатина не различаются, сохраняется смешанный тип ингибирования активности фермента модельным ингибитором неостигмином, что указывает на отсутствие существенных конформационных изменений структуры бутирилхолинэстеразы в присутствии данных полимеров.

5. Получен многокомпонентный препарат на основе бутирилхолинэстеразы, иммобилизованной совместно с индикатором тиоловых групп в крахмальный гель, отличающийся длительным сроком хранения (более года) и простотой в использовании; разработана методика интегральной оценки содержания веществ антихолинэстеразного действия с использованием многокомпонентного препарата, пределы обнаружения малатиона и пиримифосметилла составляют 8 и 3 мкг/л соответственно.

6. Оптимизация состава многокомпонентного иммобилизованного препарата на основе биферментной системы светящихся бактерий NAD(P)H-FMN-оксидоредуктаза+люцифераза путем включения 0,1 М дитиотрейтола позволила увеличить время хранения препаратов до 6 месяцев при сохранении чувствительности к действию ингибиторов (хинонов и тяжелых металлов).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах

- 1) Lonshakova-Mukina V. I. Multicomponent butyrylcholinesterase preparation for enzyme inhibition-based assay of organophosphorus pesticides / **V.I. Lonshakova-Mukina**, E.N. Esimbekova, V.A. Kratasyuk // *Catalysts*. – 2022. – V. 12(6). – N. 643. (**Q2**)
- 2) Lonshakova-Mukina V. I. Thermal inactivation of butyrylcholinesterase in starch and gelatin gels / **V.I. Lonshakova-Mukina**, E.N. Esimbekova, V.A. Kratasyuk // *Catalysts*. – 2021. – V. 11(4). – N. 492. (**Q2**)
- 3) Есимбекова, Е. Н. Желатин и крахмал: что лучше стабилизирует активность ферментов? / Е.Н. Есимбекова, А.Е. Говорун, **В.И. Лоншакова-Мукина**, В.А. Кратасюк // ДАН. Науки о жизни. – 2020. – Т. 491(1). – С. 151-154. (Esimbekova E. N. Gelatin and starch: what better stabilizes the enzyme activity? / E.N. Esimbekova, A.E. Govorun, V.I. Lonshakova-Mukina, V.A. Kratasyuk // *Doklady Biological Sciences*. – 2020. – V. 491(1). – P. 43-46.) (**Q3-Q4**)
- 4) Лоншакова-Мукина В.И. Стабилизация бутирилхолинэстеразы методом включения в гели на основе природных полимеров / **В.И. Лоншакова-Мукина**, Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк // ДАН. – 2018. – Т. 479(4). – С.460-463. (Lonshakova-Mukina V. I. Stabilization of butyrylcholinesterase by the entrapment into the natural polymer-based gels / V.I. Lonshakova-Mukina, E.N. Esimbekova, V.A. Kratasyuk // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2018. – V. 479(1). – P. 98-100.) (**Q3-Q4**)
- 5) Lonshakova-Mukina V. Impact of enzyme stabilizers on the characteristics of biomodules for bioluminescent biosensors / **V. Lonshakova-Mukina**, E. Esimbekova, V. Kratasyuk // *Sensors & Actuators: B. Chemical*. – 2015. – V.213. – P. 244-247. (**Q1**)
- 6) Есимбекова Е.Н. Принципы конструирования многокомпонентных реагентов для энзимологического анализа/ Е.Н. Есимбекова, **В.И. Лоншакова-Мукина**, А.Е. Безруких, В.А. Кратасюк // ДАН. – 2015. – V. 461(4). – С. 472-475. (Esimbekova E. N. Design of multicomponent reagents for enzymatic assays / E.N. Esimbekova, **V.I. Lonshakova-Mukina**,

A.E. Bezrukikh, V.A. Kratasyuk // *Doklady. Biochemistry and Biophysics*. – 2015. – V. 461 (1). – P. 102.) **(Q3-Q4)**

7) Esimbekova E. Bioluminescent enzyme inhibition-based assay to predict the potential toxicity of carbon nanomaterials / E. Esimbekova, E. Nemtseva, A. Bezrukikh, G. Jukova, A. Lisitsa, **V. Lonshakova-Mukina**, N. Rimatskaya, O. Sutormin, V. Kratasyuk // *Toxicology in Vitro*. – 2017. – V. 45. – P. 128-133. **(Q1)**

8) Колосова Е. Комплексный ферментативный биотест для оценки загрязнения почвы / Е. Колосова, О. Сутормин, Е. Есимбекова, **В. Лоншакова-Мукина**, В. Кратасюк // *ДАН*. – 2019. – Т. 489(1). – С. 103–107. (Kolosova E. M. Set of enzymatic bioassays for assessment of soil contamination / E.M. Kolosova, O.S. Sutormin, E.N. Esimbekova, V.I. Lonshakova-Mukina, V.A. Kratasyuk // *Doklady Biological Sciences*. – 2019. – V. 489 (1). – P. 165-168.) **(Q3-Q4)**

9) 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, A.A. Shpedt // *Sensors*. – 2021. – V. 21(3). – N. 1017. **(Q1)**

10) Esimbekova E.N., The Effects of commercial pesticide formulations on the function of in vitro and in vivo assay systems: a comparative analysis / V.P. Kalyabina, K.V. Kopylova, **V.I. Lonshakova-Mukina**, A.A. Antashkevich, I.G. Torgashina, K.A. Lukyanenko, V.A. Kratasyuk // *Chemosensors*, 2022. – V. 10. – N. 328. **(Q2)**

Патенты РФ

1) Есимбекова Е.Н., Кратасюк В.А., **Лоншакова-Мукина В.И.** Ферментный препарат на основе иммобилизованной бутирилхолинэстеразы и способ его приготовления. Патент РФ № 2546245 (2015 г.)

2) Есимбекова Е.Н., **Лоншакова-Мукина В.И.**, Кратасюк В.А. Экспресс способ определения ингибиторов бутирилхолинэстеразы в воде и водных экстрактах. Патент РФ № 2704264 (2020 г.)

Тезисы в сборниках материалов конференций

1) Лоншакова В.И. Исследование характеристик биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза – люцифераза иммобилизованной совместно с субстратами и стабилизаторами / **В.И. Лоншакова**, Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк // Сборник тезисов, материалы Семнадцатой Всероссийской научной конференции студентов-физиков и молодых ученых, 25 марта по 1 апреля, Екатеринбург, Россия. – 2011. – С. 394 – 395.

2) Лоншакова В. Исследование характеристик многокомпонентной биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза иммобилизованной совместно со стабилизаторами ферментов / **В.И. Лоншакова**, Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк // Материалы VI Съезда Российского фотобиологического общества, 12-22 сентября, пос. Шепси, Россия. – 2011. – С.120.

3) Lonshakova V. Characteristics of a coupled enzymatic system of luminous bacteria co-immobilized with substrates and stabilizers into starch gel / **V.I. Lonshakova**, E.N. Esimbekova, V.A. Kratasyuk // *Luminescence*. – 2012, P. 135 – 136.

4) Лоншакова В.И. Влияние стабилизирующих добавок на активность иммобилизованной биферментной системы светящихся бактерий НАДН:ФМН-оксидоредуктаза – люцифераза / **В.И. Лоншакова**, Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк // Сборник тезисов, материалы Восемнадцатой Всероссийской научной конференции студентов-физиков и молодых ученых, 29 марта по 5 апреля, Красноярск, Россия. – 2012. – С. 417 – 419.

5) Лоншакова В.И. Характеристики иммобилизованной совместно с субстратами и стабилизаторами биферментной системы надн:фмн-оксидоредуктаза-люцифераза / **В.И. Лоншакова**, Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк // Материалы 50-й юбилейной международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс»: Биология, 13-19 апреля, Новосибирск, Россия. – 2012. – С. 175.

6) Lonshakova V.I. Effect of stabilizers on activity of immobilized coupled enzymatic system of luminous bacteria / **V.I. Lonshakova-Mukina**, E.N. Esimbekova, V.A. Kratasyuk //

Book of Abstracts, 9th International Conference on Protein Stabilization, 2-4 may, Lisbon, Portugal. – 2012. – P. 26.

7) Lonshakova-Mukina V., Enzymatic module of bioluminescent for ecological monitoring / **V.I. Lonshakova-Mukina**, E.N. Esimbekova, A.E. Bezrukikh, V.A. Kratasyuk // 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition, 16(Sun) – 21 (Fri), Daegu, Republic of Korea. – 2012. – P.S4-0016.

8) Esimbekova E., Enzymatic module of bioluminescent biosensor for environmental toxicity assay / E.N. Esimbekova, V.A. Kratasyuk, A.E. Bezrukikh, **V.I. Lonshakova-Mukina** // Abstract of 20th International Conference on Environmental Indicators, 16-19 Sept, Trier, Germany. – 2013. – P. 80.

9) Lonshakova-Mukina V. Biological module of bioluminescent biosensor for environmental toxicity assay / **V.I. Lonshakova-Mukina**, E.N. Esimbekova, V.A. Kratasyuk // Luminescence, 2014. – V. 29. – P. 72.

10) Есимбекова Е.Н. Биолуминесцентные ферментативные методы и реагенты для анализа токсичности объектов окружающей среды / Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк, **В.И. Лоншакова-Мукина**, А.Е. Безруких // тезисы докладов XI съезда Гидробиологического общества при РАН, 22–26 сентября, Красноярск, Россия. – 2014. – С. 55-56.

11) Лоншакова-Мукина В.И. Ферментативный реагент на основе иммобилизованной бутирилхолинэстеразы / **В.И. Лоншакова-Мукина**, Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк // Сборник материалов Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Перспектив Свободный-2016», посвящённой Году образования в Содружестве Независимых Государств, 15-25 апреля, Красноярск, Россия. – 2016. – С. 17-20.

12) Лоншакова-Мукина В.И. Ферментативный реагент на основе иммобилизованной бутирилхолинэстеразы для определения фосфорорганических соединений / **В.И. Лоншакова-Мукина**, Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк // Материалы II-й Международной конференции «Биотехнология материалов – окружающая среда – качество жизни», 24–29 сентября, Красноярск, Россия. – 2017. – С.135-139.

13) Лоншакова-Мукина В.И. Термоинактивация бутирилхолинэстеразы в присутствии природных полимеров / **В.И. Лоншакова-Мукина**, Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк // Материалы II-й Международной конференции «Биотехнология материалов – окружающая среда – качество жизни», 30 сентября – 4 октября, Красноярск, Россия. – 2018. – С.156.

14) Лоншакова-Мукина В.И. Стабильные многокомпонентные иммобилизованные препараты на основе бутирилхолинэстеразы для ингибиторного анализа / **В.И. Лоншакова-Мукина**, Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк // Междисциплинарная конференция молодых учёных ФИЦ КНЦ СО РАН (КМУ-XXIV): тезисы докладов, 29 апреля, Красноярск, Россия. – 2021. – С. 59.

15) Лоншакова-Мукина В.И. Температурная инактивация бутирилхолинэстеразы в крахмальном и желатиновом гелях / **В.И. Лоншакова-Мукина**, Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк // Сборник научных трудов VI Съезда биофизиков России, 16-21 сентября, Сочи, Россия. – 2019. – С. 27-28.

16) Лоншакова-Мукина В.И. Термоинактивация бутирилхолинэстеразы в гелеобразных средах крахмала и желатина / **В.И. Лоншакова-Мукина**, Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк // Научные труды. III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов, VII Съезд биохимиков России, X Российский симпозиум «Белки и пептиды», VII Съезд физиологов СНГ, 3-8 октября, Дагомыс, Сочи, Россия. – 2021. – С. 187.

17) Лоншакова-Мукина В.И. Ферментативный реагент на основе иммобилизованной бутирилхолинэстеразы для определения фосфорорганических соединений/ **В.И. Лоншакова-Мукина**, Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк // Экологический мониторинг: методы и подходы: Материалы Международной сателлитной конференции "Экологический мониторинг: методы и подходы" и XX Международного симпозиума "Сложные системы в экстремальных условиях", 20-24 сентября, Красноярск, Россия. – 2021. – С. 131-134.