

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» - обособленное подразделение Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук

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

На правах рукописи



Лоншакова-Мукина Виктория Ивановна

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

1.5.2. Биофизика

Научный руководитель:
Кандидат биологических наук
Есимбекова Елена Николаевна

Красноярск – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	10
ГЛАВА 1. СТАБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ В СТРУКТУРЕ ПРИРОДНЫХ БИОПОЛИМЕРОВ.....	11
1.1. Описание объектов исследования.....	11
1.2. Методы стабилизации ферментов.....	16
1.2.1. Иммобилизация ферментов.....	17
1.2.2. Введение стабилизаторов ферментов.....	25
ГЛАВА 2. ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА В ЭКОЛОГИЧЕСКОМ КОНТРОЛЕ.....	29
2.1. Тесты, основанные на использовании выделенных ферментов светящихся бактерий.....	30
2.2. Тесты, основанные на использовании холинэстераз.....	33
ГЛАВА 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	40
3.1. Используемые вещества и растворы.....	40
3.2. Используемая аппаратура.....	41
3.3. Метод получения иммобилизованных реагентов.....	41
3.4. Исследование активности многокомпонентной иммобилизованной биферментной системы R + L.....	42
3.5. Исследование активности растворимой биферментной системы светящихся бактерий R + L.....	43
3.6. Исследование чувствительности многокомпонентной биферментной системы R+L к действию ингибирующих веществ.....	43
3.7. Исследование активности бутирилхолинэстеразы.....	45
3.8. Температурная инактивация бутирилхолинэстеразы.....	46
3.9. Исследование чувствительности бутирилхолинэстеразы к действию ингибирующих веществ.....	46
3.10. Полунативный электрофорез.....	48
3.11. Гель-фильтрация.....	48

3.12. Статистическая обработка результатов	48
ГЛАВА 4. КИНЕТИКА ТЕМПЕРАТУРНОЙ ИНАКТИВАЦИИ ФЕРМЕНТОВ В ГЕЛЕОБРАЗНОЙ СРЕДЕ	49
4.1. Температурная инактивация бутирилхолинэстеразы в среде крахмала и желатина	49
4.2. Температурная инактивация ферментов светящихся бактерий NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы+люциферазы	63
ГЛАВА 5. РАСЧЕТ КИНЕТИЧЕСКИХ КОНСТАНТ МИХАЭЛИСА- МЕНТЕН ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В ГЕЛЕПОДОБНЫХ СРЕДАХ	67
ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА СТАБИЛЬНЫХ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ	71
6.1. Разработка многокомпонентного препарата на основе бутирилхолинэстеразы	71
6.2. Оптимизация состава многокомпонентного препарата на основе биферментной системы светящихся бактерий NAD(P)H:FMN- оксидоредуктаза+люцифераза	77
ВЫВОДЫ	92
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	94
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	96

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. 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 [Zhang et al., 2021; Čadež et al., 2021; Luque de Castro et al., 2003]. 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 [Esimbekova et al., 2013]. Это стало причиной роста числа работ, направленных на получение удобных препаратов данных ферментов, которые будут пригодны для создания тест-систем на их основе [Pohanka et al., 2022; Vilela et al., 2018; Bachan Upadhyay et al. 2013]. 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 денатурации не утихает до настоящего времени. В живой клетке стабильность ферментов достигается преимущественно за счет их включения в субклеточные структуры, которые представляют собой более устойчивые комплексы [Kurganov et al., 1985]. 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 [Bischof et al., 2006]. Следовательно, изменение каталитической активности белковых катализаторов в результате действия температуры, может служить источником информации для

изучения структурных изменений белковой молекулы в процессе её инактивации и денатурации.

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 билюминесцентной 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 двустадийный процесс: диссоциация тетрамерного фермента на мономеры и

инактивация образовавшихся мономеров. Проведено сравнение между биофизическими параметрами E_a , ΔH^\ddagger и ΔS^\ddagger 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 биолюминесцентной 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 биолюминесценции и хемилюминесценции 2014 (ISBC 2014), 23 - 28 июня, 2014 г., г. Уппсала, Швеция.
- Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Перспектив-2016», Красноярск, 15-25 апреля 2016 г.
- II-ая Международная конференция «Биотехнология материалов – окружающая среда – качество жизни», Красноярск, 24–29 сентября 2017 г.
- III-ая Международная конференция «Биотехнология материалов – окружающая среда – качество жизни», Красноярск, с 30 сентября по 04 октября 2018 г.
- Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Перспектив-2019», 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», 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», Красноярск, 2020 г.
- Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2021», г. Москва
- 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 постановки цели и задач, выбора и постановки методов исследований до проведения экспериментов с последующей интерпретацией и обобщением результатов, а также в подготовке докладов 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 «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 обозначений, списка литературы (158 источников, в том числе 114 зарубежных). Диссертация иллюстрирована 29 рисунками и 12 таблицами.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

$\Delta H^\#$ - 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.

ГЛАВА 1. СТАБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ В СТРУКТУРЕ ПРИРОДНЫХ БИОПОЛИМЕРОВ

В настоящее время ферментативные методы анализа занимают особое место в экологическом мониторинге состояния окружающей среды. Связано это в первую очередь с тем, что биологические катализаторы обладают высокой специфичностью и чувствительностью к определяемым соединениям. Из огромного количества ферментов, известных на сегодняшний день, можно выделить оптимально подходящие для проведения биологического тестирования: люциферазы и холинэстеразы. Основное преимущество люцифераз – это простота регистрации аналитического сигнала. В свою очередь холинэстеразы обладают высокой чувствительностью к действию нервно-паралитических ядов и пестицидов, используемых в сельском хозяйстве.

1.1. Описание объектов исследования

Люциферазы катализируют уникальный природный процесс – реакцию биолюминесценции. Данная реакция сопровождается потреблением молекулярного кислорода и выделением света [Hastings et al., 1977]. На сегодняшний день описано множество живых организмов, способных к биолюминесценции, среди которых представители различных царств живой природы (бактерии, грибы, животные). Наиболее изученной группой биолюминесцентных организмов, на сегодняшний день, являются бактерии, основой биолюминесцентной системы которых, является фермент бактериальная люцифераза (L). Данный фермент катализирует реакцию окисления восстановленного флафинмононуклеотида (FMNH_2) и алифатического альдегида (R-COH) кислородом воздуха (O_2), в результате образуется жирная кислота (R-COOH) и вода (реакция 1.1).



Эффективная работа люциферазы возможна только в сопряжении с другими ферментативными системами. Образование альдегида происходит в результате работы ферментативного комплекса восстановления жирных кислот. Данный комплекс включает трансферазы, синтетазы и редуктазы [Lee et al., 1986]. FMNH₂ образуется в результате ферментативного восстановления FMN, в качестве катализатора выступает NAD(P)H-зависимая оксидоредуктаза (R) [Shiao-Chun et al., 2008] (рисунок 1.1).



Рисунок 1.1 – Схема химической реакции, катализируемой бактериальной люциферазой [Деева, 2018].

Субстратами билюминесцентной реакции – люциферинами, являются FMNH₂ и альдегид. Стоит отметить, что люцифераза проявляет высокую специфичность к FMNH₂, в работах [George et al., 1969; Meighen et al., 1973] показано, что при удалении фосфатной группы или при использовании аналогов флавина наблюдается значительное снижение активности реакции. В то же время, специфичность люциферазы к альдегиду существенно меньше. Фермент способен катализировать окисление альдегидов с разной длиной углеродной цепи (от 8 до 16 атомов углерода) [Woodland et al., 1963; Brodl et al., 2017], но интенсивность и квантовый выход реакции *in vitro* могут отличаться при использовании люцифераз из различных видов бактерий [Woodland et al., 1963].

Конфигурация белковой молекулы люцифераз, выделенных из различных источников, существенных различий не имеет. Так, например, люцифераза, выделенная из бактерий рода *Vibrio fischeri* представляет собой α/β -гетеродимер

с общей молекулярной массой около 76 кДа. α -субъединица всегда больше β -субъединицы. Активный центр – место связывания фермента с FMNH₂, располагается на α -субъединице и представляет собой полость, в которой находятся главным образом гидрофобные аминокислотные остатки [Fisher et al., 1995]. Функция β -субъединицы заключается в обеспечении стабильности α -субъединицы и формировании её активной конформации [Campbell et al., 2009]. Показано, что при диссоциации субъединиц, спровоцированной мутацией α His45, происходит значительная потеря активности фермента [Xing et al., 1991].

Бутирилхолинэстераза (BChE) — это глобулярный водорастворимый белок. BChE синтезируется в гепатоцитах печени, затем секретируется в плазму крови (по этой причине её иногда называют сывороточной холинэстеразой) [Lockridge, 2015]. Помимо кровотока, данный фермент встречается в глиальных клетках, шванновских клетках нервно-мышечных соединений и других тканях позвоночных животных [Girard et al., 2007]. BChE гидролизует субстрат бутирилтиохолин до тиохолина и масляной кислоты (реакция 1.2).



Специфичность в отношении субстрата не высока. Так, например, BChE обеспечивает гидролиз ацетилтиохолина, сукцинилдитиохолина, адипоилхолин, бензоилхолина и нитрофенилбутирата [Pohanka, 2011; Masson et al., 1997; Giacobini et al., 2000; Mesulam et al., 2002; Li et al., 2000]. Катализ гидролиза ацетилтиохолина BChE происходит менее эффективно по сравнению с ацетилхолинэстеразой [Silver et al., 1974], которая является родственным ферментом. Также было показано, что BChE катализирует гидролиз других сложных эфиров, таких как кокаин, ацетилсалициловая кислота и героин [Lockridge et al., 1980; Gatley et al., 1991; Masson et al., 1998]. В отличие от ацетилхолинэстеразы (AChE), чье участие в холинергической передаче возбуждения хорошо известно [Silver et al., 1974], физиологическая функция BChE пока полностью не ясна. Известно, что люди, утратившие ген BChE,

здоровы [Manoharan et al., 2007]. Однако существуют теории о фармакологической и токсикологической важности VChE. Так, например, известно, что она участвует в метаболизме эфирсодержащих препаратов [Whittaker et al., 1986], гидролизует аспирин до салициловой кислоты [Zhou et al., 2013] и подобно ацетилхолинэстеразе необратимо ингибируется фосфорорганическими соединениями [Karczmar et al., 1970; Silver et al., 1974]. У людей, имеющих низкую VChE-ую активность, выражены симптомы передозировки при лечении некоторыми анестетиками и миорелаксантами (сукцинилхолин, мивакуриум), что проявляется в длительном параличе мышц [Zhu et al., 2020].

Наиболее изученной на сегодняшний день является VChE, выделенная из плазмы человека, каждая каталитическая субъединица которой имеет 574 аминокислотных остатка. VChE, выделенная из сыворотки лошади, представляет собой гликопротеин, состоящий из четырех равнозначных субъединиц (110 кДа), общая молекулярная масса около 440 кДа [Lee et al., 1973]. Стоит отметить, то, что каждая субъединица несет один активный центр, тем самым достаточно сложная структурная организация VChE позволяет локально увеличить количество активных центров и не влияет на каталитические свойства фермента [Lockridge et al., 1987].

VChE имеет аминокислотный остаток серина, необходимый для её каталитической активности [Silver et al., 1974; Cohen et al., 1963]. VChE принадлежит к α/β -складчатому семейству белков, поскольку содержит центральный β -слой, окруженный α -спиралями [Lord et al., 2013]. В работах [Radic et al., 1993; Neville et al., 1992; Saxena et al., 1997; Masson et al., 1996; Vellom et al., 1993] идентифицированы специфические аминокислотные остатки, которые участвуют в каталитической активности VChE и в связывании ингибиторов фермента. VChE содержит каталитическую триаду, состоящую из Ser 226, His 466 и Glu 353 (номера аминокислотных остатков для VChE *Homo sapiens*) [Lockridge et al., 1987]. Нуклеофильная аминокислота (серин), элемент кислотно-основного катализа (остаток гистидина) и кислота (глутаминовая

кислота) [Pohanka, 2011]. На основании ожидаемого сходства с кристаллической структурой AChE каталитическая триада BChE, вероятно, находится на дне полости глубиной 20 Å (рис. 1.2), где располагаются шесть ароматических аминокислотных остатков, в отличие от 14 остатков ароматических аминокислот, обнаруженных в AChE [Millard et al., 1992; Sussman et al., 1991; Harel et al., 1992; Soreq et al., 2001].

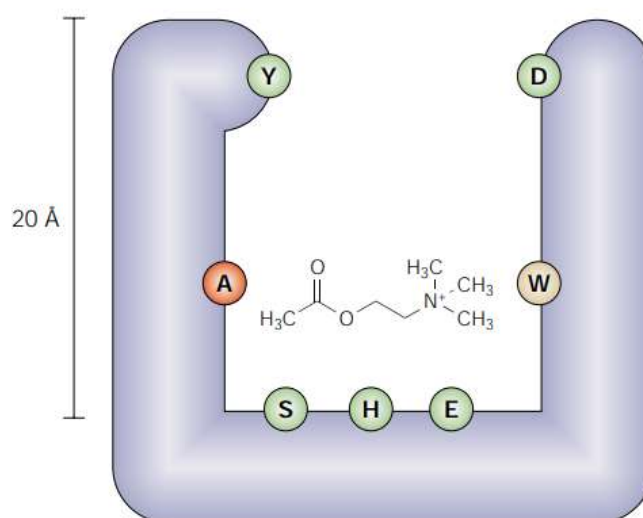


Рисунок 1.2 - Активный центр BChE. Каталитическая триада состоит из аминокислот Ser (S), His (H) и Glu (E). Ацильная группа субстрата (здесь показан ацетилхолин) помещается в ацильный карман (A), тогда как четвертичный азот взаимодействует с анионным участком, образованным аминокислотой Trp (W). Субстраты направляются вниз в полость активного центра за счет взаимодействия с остатками Asp (D) и Tyr (Y), обнаруженными на краю полости активного центра [Darvesh et al., 2003].

Помимо каталитической триады, полость активного центра содержит так называемый «анионный центр», который может связываться с катионным четвертичным азотом холина. Анионный участок [Vellom et al., 1993] включает ароматическую аминокислоту Trp 82. Кроме того, положительно заряженные субстраты, такие как бутирилхолин, направляются вниз в полость активного центра за счет взаимодействия с Asp 70 и Tyr 332, которые расположены на краю

полости активного центра [Masson et al., 1999]. Также внутри полости активного центра находится ацильный карман, где ацильная группа сложных эфиров холина удерживается на месте во время катализа. В BChE Lys 286 и Val 288 выстилают этот карман [Vellom et al., 1993].

Боковые цепи аминокислотных остатков невелики по сравнению с боковыми цепями фенилаланина, которые выстилают ацильный карман AChE. За счет этого ацильный карман BChE имеет больший объем, а поэтому может вмещать более крупные ацильные группы и, следовательно, более крупные субстраты, такие как четырехуглеродная группа бутирилхолина или ароматическое кольцо бензоилхолина.

1.2. Методы стабилизации ферментов

Биокатализаторы все чаще используются в аналитических исследованиях, полуколичественном анализе ингибиторов (или субстратов) и других химических процессах. Связано это с их высокой селективностью к определяемым соединениям, а также с потенциальной возможностью использования ферментов в качестве более экологичной альтернативы химическим катализаторам. Основные недостатки биокатализаторов связаны с природной эволюцией их активности: ферменты приспособлены для работы в клеточной среде, из-за чего, обычно не устойчивы в присутствии органических растворителей, при экстремальных значениях pH или высоких температурах. Несмотря на то, что при разработке новых, и модернизации существующих, методов, отдают предпочтение работе в водной среде, при нормальной температуре и pH-оптимуме, в некоторых случаях требуются более экстремальные условия. Например, для повышения растворимости субстрата может потребоваться высокая температура или использование органического растворителя. Решить подобные проблемы можно, используя различные способы стабилизации молекул ферментов, среди которых особое место занимают иммобилизация ферментов и/или использование стабилизирующих добавок. Разработка препаратов ферментов, с более высокой стабильностью,

будет способствовать внедрению биокаталитического синтеза и в промышленное производство.

1.2.1. Иммуобилизация ферментов

Наиболее распространенным способом увеличения стабильности ферментов является их иммуобилизация на разного рода носителях. Иммуобилизацию фермента можно определить как включение молекулы фермента в какую-либо изолированную фазу, которая отделена от фазы свободного раствора, но способна обмениваться с находящимися в ней молекулами субстрата, эффектора или ингибитора [Бресткин и др., 1991].

Включение фермента в полимерную матрицу может осуществляться двумя основными способами:

- 1) химическими (образование ковалентной связи);
- 2) физическими (адсорбция, включение в гель, микрокапсулирование).

Возможно комбинирование этих приемов.

Иммуобилизация часто приводит к резким изменениям измеряемых параметров ферментативной реакции, таких как константа Михаэлиса, максимальная скорость реакции, оптимумы температуры и рН, влияние ингибиторов и т.д. [Polizzi et al., 2007]. Степень этих изменений зависит от использованного метода иммуобилизации и типа ферментативной реакции. Так, иммуобилизация VChE из сыворотки крови лошади путем микрокапсулирования в тринитрате целлюлозы смещает максимум ферментативной активности в щелочную область, до рН 9 – 10, при этом чувствительность к фосфорорганическим пестицидам увеличивается [Медянцева и др., 1990]. Иммуобилизация того же фермента на бумаге не меняет рН-оптимума (он составляет 7,5 – 8), но в целом уменьшает зависимость активности препарата от рН раствора по сравнению с нативным ферментом [Никольская и др., 1992].

В настоящее время предложено более десяти различных способов иммуобилизации ферментов светящихся бактерий [Kratasyuk et al., 2003] и более 30 способов иммуобилизации холинэстераз [Pundir et al, 2012].

Включение биокатализаторов в гели полимерной природы – один из наиболее простых способов иммобилизации ферментов. Существенным преимуществом данного метода является то, что в большинстве исходов иммобилизация фермента в геле приводит к его значительной стабилизации. Связано это с тем, что большинство полимерных гелей отличаются высокой химической, механической и тепловой стойкостью [Егорова и др., 2003]. Этот фактор является особенно важным при использовании иммобилизованных ферментов для анализа смесей, характеризующихся различными значениями pH, температуры, наличием высоких концентраций поверхностно–активных веществ (например, для целей экологического мониторинга) [Есимбекова и др., 2009]. Кроме того, метод включения в полимерные гели универсален, поскольку применим для иммобилизации практически любых ферментов, полиферментных систем, клеточных фрагментов и даже клеток [Kratasyuk et al., 2003; Saik et al., 2011; Tang et al., 2010]. Основным недостатком метода иммобилизации в полимерные гели является то, что полимерная матрица может создавать препятствия для диффузии субстрата к ферменту, что может приводить к снижению каталитической эффективности иммобилизованного препарата [Luan et al., 2010].

Среди гелей различной природы наиболее перспективным носителем для получения иммобилизованных препаратов ферментов являются крахмальный и желатиновый полимерные гели [Есимбекова и др., 2004]. Данные гели легко доступны и имеют низкую стоимость. Так, бактериальная биферментная система NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза, иммобилизованная в крахмальный гель, демонстрирует повышение устойчивости ферментов к химическим и физическим факторам среды по сравнению с растворимыми ферментами: pH-оптимум расширяется, сохраняется высокая активность при увеличении концентрации солей, повышается термостабильность [Есимбекова и др., 2005]. Так, например, в присутствии 1% желатина и 2% крахмала происходит расширение допустимого диапазона pH от 6,8 до 8,1 [Bezrukikh et al., 2014]. На основе этих данных был разработан коммерческий препарат «Энзимолум»,

предназначенный для определения интегральной токсичности образцов сред [ТУ 2639-001-93879568-2009].

Из литературных источников известно, что включение холинэстераз в крахмальный гель не приводит к уменьшению каталитической активности фермента [Vauman et al., 1967]. Наряду с этим известно, что иммобилизация ВChE в желатиновый гель – один из самых эффективных способов стабилизации данного фермента. Следствием этого является широкое применение препаратов на основе холинэстераз, иммобилизованных в желатиновый гель, в качестве биомодуля в различных биосенсорах, предназначенных для определения ультрамалых остаточных количеств ингибиторов данных ферментов, а также для их интегрального анализа.

Желатиновые гели

Желатин – продукт денатурации фибриллярного белка коллагена. Основным фактором, который определяет возможность формирования геля, является температура. Полипептидные цепи желатина при температуре ниже 40 °С проявляют тенденцию к частичному восстановлению коллагеноподобных спиралей, исполняющих роль узлов пространственной сетки геля. Существуют различные варианты образования комплексов из полипептидных нитей в результате чего формируются двойные, тройные и олигомерные спирали (рис. 1.3). Желатиновые гели образуются из растворов при определенной концентрации и при уменьшении температуры, что связано с уменьшением растворимости желатина. В результате межмолекулярных взаимодействий макромолекул возникают связнодисперсные структуры (гель-фракция) [Измайлова и др., 2004].

Пространственная сетка геля формируется при температуре ниже 40 °С при концентрациях желатина выше, так называемой, критической концентрации гелеобразования $c_{кр}$. Значения $c_{кр}$ лежат в пределах 0,4-1,0% и существенно зависят от молекулярной массы желатина, температуры и pH среды [Вейс et al., 1971; Ross-Murphy et al., 1997]. Из литературных данных известно, что

пространственная сетка геля формируется даже при концентрации желатина 0,1% при температуре 10 °С [Okawa et al., 1997].

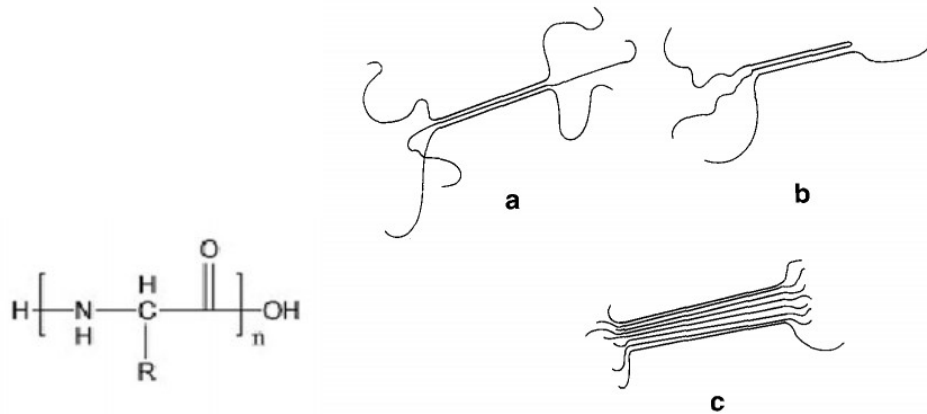


Рисунок 1.3 – Структура мономера желатина и межмолекулярная тройная спираль (a); бимолекулярная тройная спираль с изгибом шпильки (b) [Busnel et al., 1988; Busnel et al., 1989]. Спирали представлены в виде параллельных линий, хотя реальная структура состоит из трех переплетенных нитей. Агрегация спиралей бок о бок, как первоначально предлагалось для описания зон соединения желатина (c) [Ross-Murphy et al., 1992].

Свойства гелей желатина зависят от pH среды, ионной силы раствора, температуры, прочности желатина и введения в систему модифицирующих агентов, изменяющих пространственное строение и свойства макромолекул [Измайлова, 2004]. Полипептидные цепи желатина в разбавленных водных растворах при температурах выше 40 °С можно рассматривать как наночастицы термодинамически устойчивых коллоидных систем с малым межфазным натяжением на границе макромолекула желатина-растворитель. В этом случае желатин образует компактные, частично проницаемые для растворителя клубки. Подобные системы классифицируют как золи или свободнодисперсные наносистемы, в которых при определенных условиях возникают связнодисперсные наносистемы – гели [Измайлова и др., 2004].

Крахмальные гели

Термин крахмал часто применяется к смеси двух молекулярных компонентов: линейной фракции амилозы и ее разветвленного аналога амилопектина. В обеих молекулах глюкоза является основным строительным блоком. Структурная формула мономера показана на рис. 1.4.

Эти два полимера представляют собой гомоглюканы только с двумя типами внутривещечных связей: α - (1-4)-гликозидная связь в основной цепи (амилоза (рис. 1.5)) и α - (1-6)-гликозидная связь в точках разветвления амилопектина (рис. 1.6).

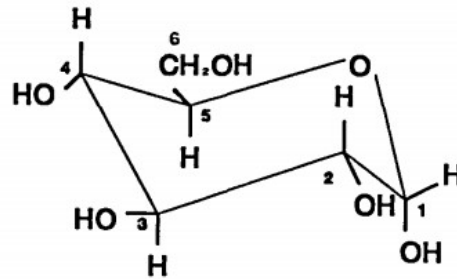


Рисунок 1.4 – Структурная формула α -D-глюкозы.

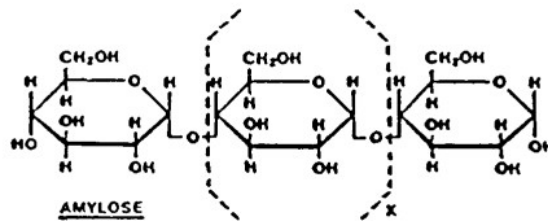


Рисунок 1.5 - Схематическая изображение амилозы α - (1-4) [Zobel et al., 1988].

Известно, что физико-химические свойства крахмала зависят от его ботанического происхождения [Singh et al., 2003]. При использовании крахмала в биотехнологических процессах, его подвергают растворению в воде и последующей термической обработке. На данном этапе источник получения крахмала определяет характер происходящих изменений в крахмальной грануле [Ягофаров и др., 2012]. При нагревании крахмала в виде раствора, вода

проникает в гранулы крахмала, приводя к их полной гидратации. При повышении температуры водных крахмальных суспензий более 30 °С происходит частичный разрыв водородных связей молекул амилозы и амилопектина в грануле крахмала, ведущий к изменению его микроструктуры. Кристаллическая структура гранул крахмала разрушается и молекулы воды «атакуют» уязвимые гидроксильные группы амилозы и амилопектина и соединяются с ними водородными связями. Интенсивно возрастает гидратация амилозы и амилопектина и, соответственно, увеличиваются размеры гранул крахмала, происходит так называемое «набухание» крахмала и повышается его растворимость.

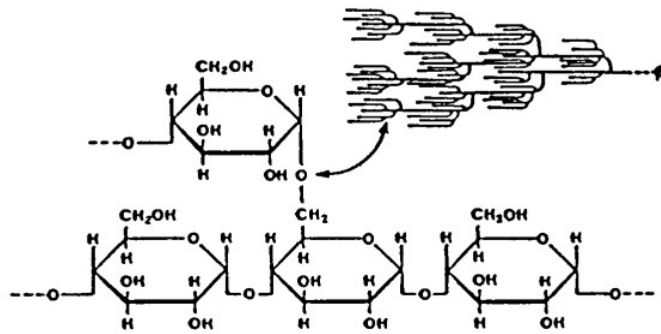


Рисунок 1.6 - Принципиальная схема амилопектина с точкой ветвления в положении α -(1-6) [Zobel et al., 1988].

Известно, что крахмалы, выделенные из клубней и корнеплодов, «набухают» быстрее, чем зерновые крахмалы, и в более узком температурном интервале. При полной гидратации водородные связи между амилозой и амилопектином поддерживают целостность гранулы, и при постоянном нагревании гранула начинает разбухать изнутри. В результате набухания и гидратации размер частиц крахмала увеличивается в несколько раз. Двойное лучепреломление исчезает, раствор становится прозрачнее, его вязкость возрастает, достигая пикового значения. Конечный момент гелеобразования (клейстеризации) наступает, когда 96 - 98% гранул утратили свойство двойного лучепреломления. Температура, при которой происходит полное

гелеобразование, также зависит от ботанического происхождения крахмала, но, как правило, она выше у крахмалов с более высоким содержанием амилозы. Связано это с тем, что молекулы амилозы имеют линейное строение и плотно прилегают друг другу, располагаясь параллельными цепочками. Температура гелеобразования картофельного крахмала составляет 61-63 °С [Shiotsubo et al., 1983]. При охлаждении растворов крахмала молекулы амилозы и линейные части молекул амилопектина претерпевают ретроградацию, в результате чего вновь формируется кристаллическая структура.

Одним из важных показателей растворов полимеров является его вязкость. По данному показателю можно судить о степени полимеризации и конформации макромолекул. Вязкость таких растворов как крахмала и желатина можно рассматривать с двух сторон. С одной стороны, как классическую макровязкость (μ), которая определяется как мера диссипации кинетической энергии слоёв раствора (включающих макромолекулярные цепи полимера) при их скольжении друг относительно друга. С другой стороны, скорость диффузии малых молекул (зонда) в гелеподобных средах часто зависит от свойств растворителя, входящего в гелевую матрицу, и сегментарного движения макромолекул. Такая вязкость, определяемая по скорости диффузии молекулы зонда в среде с биополимером, часто называется микровязкостью (μ_m). Сравнение данных значений вязкости биополимеров может дать важную информацию о влиянии процессов гелеобразования на подвижность компонентов, входящих в состав начального коллоидного раствора. Так, например, взаимосвязь между этими типами вязкости установлена для крахмала и желатина в работе [Gulnov et al., 2016]. Показано, что при увеличении макровязкости растворов желатина различных концентраций (3%, 5%) (путем их охлаждения) происходит нелинейное увеличение микровязкости, для данных растворов μ_m растет медленнее чем μ (рис 1.7). В то же время для растворов желатина 0,5 % и 1% зависимость $\mu_m(\mu)$ имеет линейный характер. Для растворов крахмала наблюдается противоположный эффект: при увеличении макровязкости

растворов, микровязкость увеличивается в большей степени для всех исследуемых концентраций (0,5%, 2%, 5%).

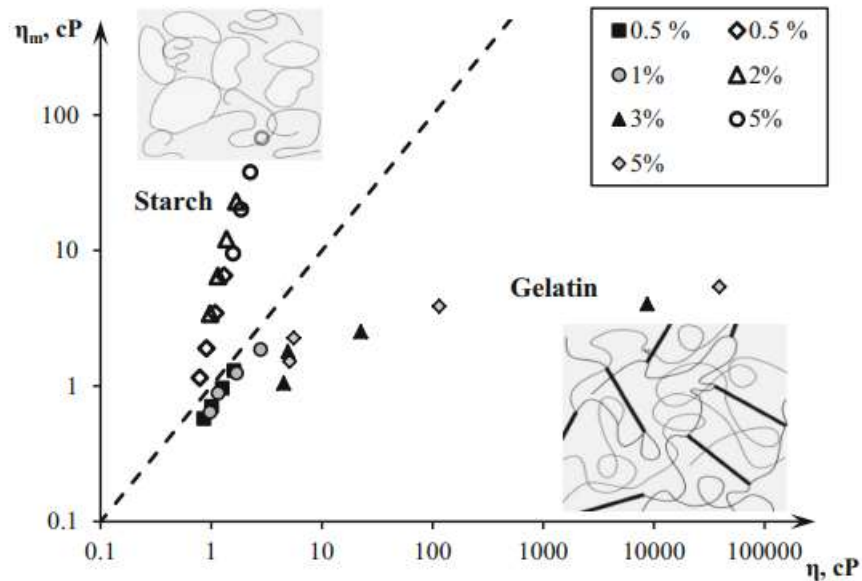


Рисунок 1.7 - Зависимость между микро- (μ_m) и макровязкостью (μ) сред с крахмалом (пустые маркеры) и желатином (заполненные маркеры) при 20, 30, 40, 50°C (справа налево). Штриховая линия представляет «идеальную» жидкость ($\mu_m = \mu$). Схематическая структура желатиновых и крахмальных гелей [Gulnov et al., 2016].

Однако, разнообразие свойств суспензий крахмала и желатина может быть преимуществом, например, когда речь идет о их практическом применении. Гели на основе желатина прочны, по своему физическому состоянию напоминают твердые тела, образуя некий каркас, через который могут легко диффундировать мелкие молекулы. В отличие от этого, суспензия крахмала (в частности, картофельного крахмала, характеризующегося высоким содержанием амилопектина) не способна образовывать прочные гели [Ring et al., 1985], но, по результатам Gulnov et al., 2016, может обеспечить высокую степень иммобилизации, вероятно за счет гидрофобных взаимодействий. Все особенности изучаемых типов биополимеров имеют множество приложений, поскольку они широко используются как по отдельности, так и в сочетании друг

с другом [Zema et al., 2012]. Кроме того, было показано, что среда, содержащая желатин и крахмал, является подходящей для имитации внутриклеточной среды для ферментативных реакций [Kratasyuk et al., 2003; Ling et al., 2001]. Среда с полипептидами и полисахаридами моделирует различные участки внутриклеточного пространства с различной структурной организацией. Можно предположить, что желатиновые гели моделируют цитоскелет и общее порозластичное поведение цитоплазмы. Крахмальные взвеси имитируют среды с неоднородной полярностью и вязкостью, что характерно для клетки. Однако, на сегодняшний день, количество публикаций, посвященных исследованию поведения белковых макромолекул в вязкой (гелеподобной) среде природных полимеров, остается весьма ограниченным.

1.2.2. Введение стабилизаторов ферментов

Другим способом стабилизации ферментов является внесение в ферментативные препараты дополнительных специализированных компонентов.

Добавки, действующие как стабилизаторы, различаются по механизму действия на ферменты, каталитическую активность которых они направлены сохранить. В основном используются:

- стабилизаторы SH-групп ферментов, например, дитиотрейтол (ДТТ) и меркаптоэтанол;
- стабилизаторы, увеличивающие вязкость раствора за счет увеличения общей концентрации белка, например, альбумины.

На рисунке 1.8 показаны структурные формулы ДТТ и меркаптоэтанола. Данные вещества применяются для «защиты» SH-группы белков от неконтролируемого окисления. ДТТ (рис. 1.8, а) предотвращает образование неправильных внутримолекулярных и межмолекулярных -S-S- связей, приводящих к формированию димеров и полимеров, биологическая активность

которых значительно ниже, чем у мономерных молекул. Кроме того, ДТТ широко используется для восстановления дисульфидных групп белков.

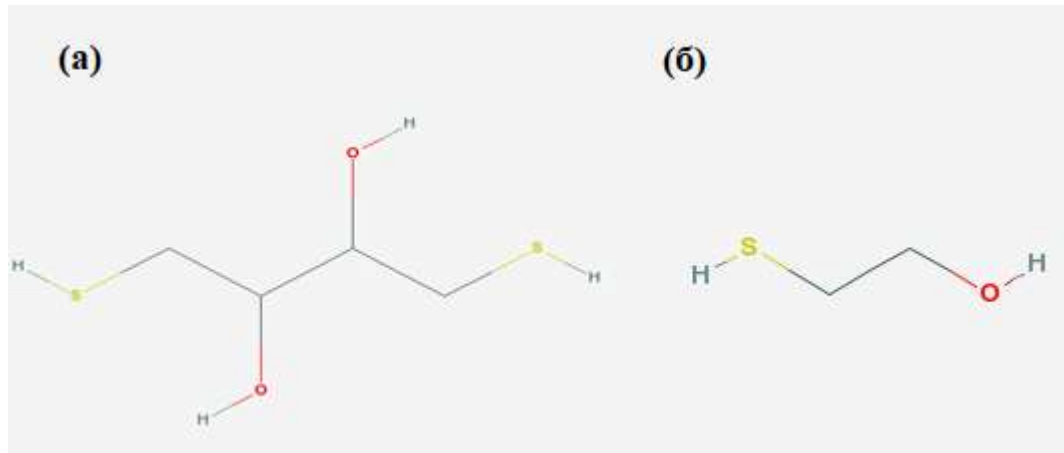


Рисунок 1.8 – Структурные формулы ДТТ (а) и меркаптоэтанола (б) [Мороз и др., 2008].

Меркаптоэтанол является аналогом ДТТ и используется при работе с белковыми молекулами (в том числе с ферментами) с целью защиты их сульфгидрильных групп от окисления, а также в других случаях для предохранения легкоокисляемых соединений от действия кислорода. Данные соединения показали хорошую эффективность при стабилизации некоторых биолюминесцентных ферментов. Например, добавка ДТТ позволяет стабилизировать люциферазу светляков *Luciola Mingrelica*, снижая константу скорости термической инактивации в три раза [Ломакина и др., 2008].

Среди альбуминов наиболее часто используются бычий сывороточный альбумин (БСА), представляющий собой нейтральный белок с молекулярной массой 64000 Да [Holowachuk et al., 1991] (рис. 1.9). 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. Данная гипотеза основана на исследованиях, в которых показано, что при использовании веществ небелковой природы с целью увеличения вязкостных

свойств реакционных растворов наблюдаемый выход активности ферментов ниже по сравнению с растворами, содержащими альбумины [Dickinson, 1994].

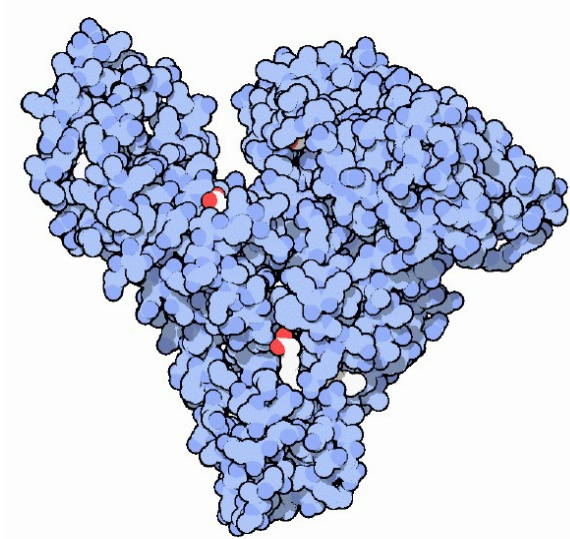


Рисунок 1.9 – Пространственная структура бычьего сывороточного альбумина [Holowachuk et al., 1991].

Например, в работе [Makemson et al., 1991] доказано, что БСА способен связывать длинноцепочечный альдегид, который является одним из субстратов биолюминесцентной 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.

Также известно, что действие веществ, влияющих на активность фермента, при их совместном присутствии складывается неаддитивно. Например, 0,33% трегалоза, внесенная в раствор, содержащий VChE и поливинилпирролидон с последующим высушиванием, позволяет сохранить активность фермента в течение 20 дней, похожий результат получен при внесении в такой же раствор 0,33% БСА. При совместном использовании данных стабилизирующих добавок с раствором VChE с последующим высушиванием наблюдается сохранение активности в течение 70 дней [Bromberg et al., 2008]. В работе [Tomoyasu et al.,

2013] показано, что одновременное добавление ДТТ и БСА приводит к уменьшению стабилизирующего эффекта на активность люциферзы светляков *Renilla*, который наблюдается при использовании только БСА. Авторами данной работы этот эффект объясняется тем, что 17 дисульфидных связей в нативной молекуле БСА, стабилизирующие третичную структуру белка, при воздействии повышенных температур (42 °С и 45 °С) распадаются и, в присутствии ДТТ, происходит агрегация образовавшихся денатуратов молекул БСА.

ГЛАВА 2. ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА В ЭКОЛОГИЧЕСКОМ КОНТРОЛЕ

В настоящее время происходит увеличение антропогенного воздействия на окружающую среду, результатом данного процесса является рост числа контролируемых веществ и снижение порога их предельно допустимых концентраций. Ферментативные методы анализа, основанные на использовании зависимости скорости катализируемой ферментом химической реакции от концентрации реагирующих веществ и самого фермента, позволяют быстро оценить наличие потенциально опасных веществ в анализируемых образцах. Более того, использование биологических катализаторов, отличающихся высокой активностью и избирательностью действия, позволяет значительно повысить чувствительность и селективность методов аналитического и интегрального (полуколичественного) анализа. Эти качества в сочетании с простотой используемой аппаратуры и методики эксперимента, а также экспрессностью, обеспечивают широкое внедрение ферментативных методов в практику агрохимических лабораторий, научно-исследовательских институтов, природоохранных служб [Шеховцова, 2000].

Под биологическими тест-методами (биотестированием) обычно понимают процедуры установления токсичности среды с помощью тест-объектов (живых организмов), сигнализирующих об опасности независимо от того, какие вещества и в каком сочетании вызывают изменения жизненно важных функций у тест-объектов. Под токсичностью традиционно понимают свойство химических веществ проявлять повреждающее (ингибирование, генетические изменения и т.д.) или летальное действие на тест-объект. По Н.С. Строганову, количественно токсичность вещества (Т) для отдельного организма определяются как величина, обратная медианной летальной концентрации (LC_{50}) [Строганов, 1983]:

$$T = \frac{1}{LC_{50}} \quad (2.1)$$

Часто используется термин «интегральная токсичность». По определению Л.П. Брагинского под интегральной токсичностью подразумевается токсичность сложных смесей, сточных вод, многокомпонентных факторов [Брагинский, 1989]. Благодаря простоте, оперативности и доступности биотестирование получило широкое признание во всем мире.

Ферментативные методы анализа оптимально подходят для решения задач экспресс-диагностики загрязнения окружающей среды. В отличие от традиционных методов биохимического и биологического анализа они допускают количественное измерение и более объективную интерпретацию результатов. Так как все изменения, происходящие в организме, под действием токсических веществ, начинаются на молекулярном уровне, использование в качестве тест-объектов ферментов, отвечающих за какой-либо один из параметров жизнедеятельности организмов, кажется закономерным. Таким образом, ферменты могут рассматриваться как высоко чувствительные органические реагенты, позволяющие в большинстве случаев достичь предела обнаружения экотоксикантов на уровне 10^{-9} – 10^{-10} моль/л [Будников, 2001]. Все это определяет благоприятные перспективы применения ферментативных методов анализа в эколого-аналитическом контроле. При использовании ферментов в качестве тест-объектов под токсичностью понимают способность химических веществ оказывать ингибирующее действие на каталитическую активность ферментов (либо ферментных систем).

2.1. Тесты, основанные на использовании выделенных ферментов светящихся бактерий

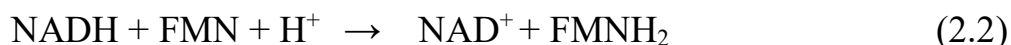
Долгое время в биолюминесцентном экологическом мониторинге применялись только интегральные тесты, основанные на светящихся бактериях

[Гиль и др., 1983; Гиль и др., 1985]. Концепция люциферазного биотестирования, основанная на использовании ферментов, была выдвинута в 1990 году [Кратасюк и др., 2003]. На сегодняшний день в литературе имеется достаточно большое количество данных, доказывающих высокую чувствительность люциферазных реакций к действию токсических веществ [Gu et al., 2001]. При этом сравнение влияния экотоксикантов на биолюминесценцию *in vivo* и *in vitro* показало существование зависимости между степенью токсичности в анализируемом образце и изменением параметров свечения обеих биолюминесцентных систем, но чувствительность систем *in vitro* была часто выше в 100–1000 раз.

В экологии интегральные биолюминесцентные методы *in vivo* и *in vitro* рекомендованы для непрерывного экспрессного контроля состояния окружающей среды промышленных районов и природоохозяйственных комплексов, для контроля залповых вредных выбросов предприятий, для оценки эффективности детоксикации сточных вод и работы очистных сооружений, а также для оценки экологической опасности предприятий и отдельных районов [Диунов и др., 1993].

Принцип люциферазных биотестов состоит в обнаружении токсических свойств тестируемых веществ и смесей по их влиянию на биолюминесцентные ферментативные реакции в присутствии анализируемых экотоксикантов. В основе биолюминесцентных биотестов лежит ингибирование люциферазы, а именно, изменение основных параметров биолюминесценции (максимальной интенсивности свечения ($I_{\text{макс}}$), времени выхода свечения на максимальный уровень ($T_{\text{макс}}$) и константы спада свечения ($k_{\text{сп}}$)), компонентами анализируемых смесей [Kratasyuk et al., 1989].

В качестве тест-объектов могут использоваться реакции, катализируемые люциферазой (реакция (2.3)) и биферментной системой NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза (реакции (2.2) и (2.3)).



Для увеличения чувствительности биотеста, была использована трехферментная система NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза+алкогольдегидрогеназа, включающая дополнительно реакцию 2.4 [Есимбекова, 2000]. В настоящее время данная ферментная система не получила широкого применения в качестве тест-объекта.



Показана высокая чувствительность указанных ферментных систем к воздействию фенолов, хинонов, солей тяжелых металлов и органофосфатов [Есимбекова, 2000; Vetrova et al., 2007]. Однако увеличение количества ферментативных реакций, включенных в цепочку сопряжения, приводит к усложнению процедуры анализа и увеличению времени его проведения.

В основу ферментативных биолюминесцентных биотестов положена классификация ингибиторов и активаторов биолюминесценции в соответствии с механизмом их влияния на элементарные физико-химические процессы. В работах Н.С. Кудряшевой [Kudryasheva, 2006; Kudryasheva et al., 2006] проведена классификация закономерностей воздействия экзогенных соединений на биолюминесцентные системы. Согласно этой классификации, возможными путями направленного воздействия экзогенных соединений на биолюминесцентную систему являются следующие процессы:

- 1) влияние молекул на процессы переноса энергии в биолюминесцентной системе;
- 2) влияние молекул на процессы переноса водорода в биолюминесцентной системе;
- 3) влияние молекул на процессы переноса электрона в биолюминесцентной системе;
- 4) взаимодействие молекул с ферментами биолюминесцентной системы.

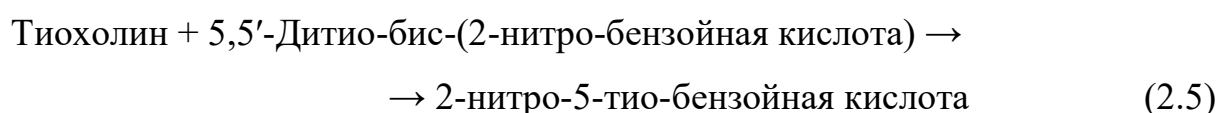
Ранее проведенные исследования показали, что биферментная система NAD(P)H:FMN–оксидоредуктаза+люцифераза является специфичным тестом на хиноны [Кудряшева и др., 2002]. Для биферментной системы в присутствии хинонов характерна межмолекулярная миграция водорода. Поэтому помимо уменьшения интенсивности свечения в присутствии хинонов наблюдается задержка свечения (индукционный период) и увеличение времени выхода свечения на максимум. Закономерности влияния солей металлов на растворимую биферментную систему светящихся бактерий объясняют их воздействием на процессы переноса электрона в биолюминесцентной системе при формировании возбужденных состояний [Кудряшева и др., 1996]. Также было установлено, что действие солей металлов на бактериальные биолюминесцентные системы связано с электронной структурой катиона – природой его внешних орбиталей, зарядом, радиусом.

2.2. Тесты, основанные на использовании холинэстераз

Все холинэстеразы (ChE) имеют уникально большой круг ингибиторов, в том числе пестициды, поверхностно-активные вещества, соли тяжелых металлов. Ингибиторами ChE являются многие природные и синтетические соединения (таблица 2.1): фосфорорганические соединения (ФОС); эфиры N-алкилкарбаминовых кислот (карбаматы); четвертичные аммониевые основания; гетероциклические соединения, содержащие третичный или четвертичный атом азота. ФОС и карбаматы иногда называют «полусубстратами» или «плохими субстратами» [Soreq et al., 1995], т.к. данные соединения связываются непосредственно с активным центром фермента, образуя комплексы, называемые «фосфорил-ферментами». Гидролиз «фосфорил-фермента» водой и образование свободного фермента идет очень медленно, так что активность фермента не восстанавливается. Ингибирование ChE ФОС является необратимым [Старостина и др., 2008; Старостина и др., 2010].

ФОС широко применяются как пестициды, пластификаторы, компоненты огнезащитных и смазочных материалов. В меньшей степени, в качестве лекарственных средств (для лечения шистосомоза, глаукомы, болезни Альцгеймера) [Малыгин и др., 2008]. Использование больших объемов разнообразных ФОС привело к тому, что эти соединения стали частью ряда экосистем. Токсичность большинства из них для теплокровных животных, а также их устойчивость в окружающей среде создают потенциальную опасность для человека. Поэтому в настоящее время активно разрабатываются биотесты на основе холинэстеразных ферментов [Roda et al., 1994; Будников и др., 2001; Andreescu et al., 2006; Pundir et al., 2012; Amine et al., 2016], характеризующихся высокой чувствительностью к ФОС.

Для определения активности ВChE чаще всего используют неферментный колориметрический метод Элмана [Ellman et al., 1961]. ВChE гидролизует субстрат бутирилтиохолин до тиохолина и масляной кислоты (реакция 1.2). Тиохолин взаимодействует с 5,5'-Дитио-бис-(2-нитро-бензойной кислотой) (DTNB) с образованием окрашенной в желтый цвет 2-нитро-5-тио-бензойной кислоты (реакция 2.5), скорость образования которой пропорциональна активности ВChE:

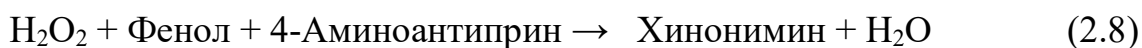
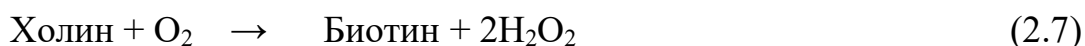
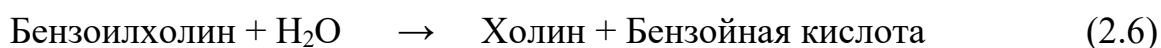


Регистрацию оптической плотности реакционного раствора проводят при длине волны 412 нм. Так, например, с использованием данного метода определения активности ВChE, выделенной из лошадиной сыворотки, в работе Esimbekova et al., 2022 показана возможность применения фермента для оценки токсичности формулянтов, входящих в состав коммерческих препаратов пестицидов.

Однако, известны и другие методы определения активности ВChE. Например, очень близким к методу Элмана является способ определения

активности ВChE, в котором в качестве индикатора на тиоловую группу используется 4,4'-бис-(2-гидрокси-6,8-дисульфо-1-нафтилазо)-фенилдисульфидтетракалиевая соль [Гайнуллина и др., 1998]. В ходе реакции образуется анион синего цвета, имеющий полосу поглощения в области спектра 570-580 нм. Такая особенность продукта очень удобна при определении активности холинэстераз непосредственно в сыворотке крови, т.к. компоненты крови в данной области спектра поглощают слабо.

Ферментный колориметрический метод [Okabe et al., 1977] предусматривает использование субстрата – бензоилхолина и ферментной системы холинэстераза-холиноксидаза-пероксидаза с хромогенным комплексом фенол-4-аминоантипирин. Данный метод включает в себя три стадии:



ВChE катализирует гидролиз бензоилхолина до холина и бензойной кислоты (реакция 2.6). Холин окисляется кислородом воздуха в присутствии холиноксидазы с образованием перекиси водорода (реакция 2.7), при разрушении которой под влиянием пероксидазы происходит конденсация фенола и 4-аминоантипирина (реакция 2.8) в окрашенное состояние, которое определяется фотометрически при длине волны 500 нм.

Также известны спектрофотометрические (УФ) методы, которые подразделяются на прямые и непрямые. Прямой УФ-метод Kalow, а также его модификации [Kalow et al., 1957; Katsumasa et al., 1985], заключается в непосредственном измерении убыли субстрата (бензоилхолина и его производных), которое основано на различиях в спектрах поглощения субстрата и продуктов его гидролиза. Активность ChE определяют, регистрируя

уменьшение оптической плотности реакционной смеси при длине волны, соответствующей максимуму поглощения субстрата в УФ-области.

В непрямых УФ-методах [Yasushi et al., 1982; Kamei et al., 1983] карбоновая кислота, образующаяся в результате гидролиза субстрата под действием ChE, выступает в ряд сопряженных ферментных реакций, последней из которых является окисление коферментов NADH или NADPH в NAD^+ или NADP^+ , соответственно, что сопровождается уменьшением поглощения в УФ-области при длине волны 340 нм. Скорость снижения оптической плотности при данной длине волны пропорциональна активности ChE.

При создании биосенсоров, на основе VChE, часто используются электрохимический способ определения её активности. Данный способ основывается на регистрации изменения pH раствора в результате образующейся в ходе реакции (2.5) кислоты [Andreescu et al., 2006].

Известно, что активность ChE снижается в присутствии полярных органических растворителей, смешивающихся с водой (ацетон, этанол и др.) [Mionetto et al., 1994]. Так, 20%-ный раствор этанола используют для остановки ферментативной реакции в методе Элмана [Ellman et al., 1961]. Кроме того, органические растворители влияют на механизм действия ряда обратимых ингибиторов ChE. Этанол меняет механизм ингибирования холинэстеразного гидролиза индофенилацетата солями фосфатного буфера от конкурентного к бесконкурентному [Кузнецова и др. 1988], N-метил-4-пиперидинилбензилатом – от неконкурентного к бесконкурентно-неконкурентному [Бресткин и др., 1991].

Таблица 2.1 – Ингибиторы ChE и их взаимодействие с ферментом [Старостина и др., 2008]

Класс соединений	Общая формула	Природа взаимодействия с ChE	Ингибирование фермента	Препараты	Область применения
1	2	3	4	5	6
Фосфорорганические соединения	$\begin{array}{c} R_1 \\ \diagdown \\ PO-Z \\ \diagup \\ R_2 \end{array}$ <p>где R₁ и R₂ – алкоксильные, алкильные группы и их комбинации с диалкиламмониевыми группами; Z-группы CN-, F' и др.</p>	<p>образование прочной ковалентной связи «фосфорил-серин» в активном центре фермента</p>	необратимое	карбофос, тиофос, хлорофос	инсектициды, акарициды
				зарин, зоман, табун	боевые отравляющие вещества
				армин	лекарственный препарат
Эфиры замещенных карбаминовых кислот (карбаматы)	$R_2 - NH - \overset{O}{\parallel} C - O - R_1$ <p>где R₁ – ароматические и гетероциклические соединения, содержащие третичный или четвертичный атом азота; R₂-H, CH₃- и др.</p>	<p>образование ковалентной связи «карбамоил-серин» в активном центре фермента</p>	обратимое	физостигмин и его производные, пиридостигмин, неостигмин (прозерин) и др.	лекарственные средства
				аминокарб	инсектицид

1	2	3	4	5	6
Четвертичные аммониевые основания	$ \begin{array}{c} R_1 \\ \\ R_2 - N^+ - R_4 \\ \\ R_3 \end{array} $ <p>где R₁, R₂, R₃, R₄ – органические остатки</p>	Образование комплекса с анионным центром фермента	конкурентное	трис	буферные растворы
				эдофоний хлорид	лекарственное средство
Гетероциклические соединения, содержащие третичный и четвертичный атомы азота	-	Образование комплекса с анионным центром фермента	конкурентное	галантамин, такрин, донепезил	лекарственные средства
				дибукаин	анализ генетических вариантов ChE
				алкалоиды	лекарственные средства

Цель данной работы состоит в определении биофизических параметров функционирования ферментов в гелеобразных средах для конструирования стабильных многокомпонентных препаратов для ингибиторного анализа.

С целью количественной оценки стабилизирующего эффекта, оказываемого на ферменты гелеобразными средами крахмала и желатина, рассчитаны основные биофизические характеристики процесса термической инактивации бутирилхолинэстеразы в буферном растворе, гелеобразных средах крахмала и желатина (энтропия и энтальпия активации процесса термической активации (ΔS^\ddagger и ΔH^\ddagger), энергия Гиббса (ΔG^\ddagger)), проведено сравнение с аналогичными параметрами для биферментной системы светящихся бактерий NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза. Для определения влияния гелеобразной среды крахмала и желатина на кинетику ферментативного катализа и механизмы ингибирования бутирилхолинэстеразы веществами антихолинэстеразного действия рассчитаны кинетические параметры ферментативной реакции (K_m , V_{max}) в их присутствии и отсутствие.

На основе полученных данных был разработан иммобилизованный реагент, в состав которого для повышения экспрессности метода и упрощения процедуры определения ФОС включен индикатор на тиоловую группу (DTNB). Доказано сохранение активности VChE при совместной иммобилизации фермента и DTNB. Для стабилизации биферментной системы светящихся бактерий проведена комбинация двух способов стабилизации ферментов – иммобилизации ферментов в крахмальный гель и введение в состав реагента стабилизаторов разного механизма действия.

В дальнейшем, полученные многокомпонентные иммобилизованные реагенты могут использоваться в качестве тест-объектов для проведения экспрессного биотестирования сточных вод промышленных предприятий или экологического мониторинга природных вод с целью контроля содержания ингибиторов VChE и ферментов биолюминесцентной системы светящихся бактерий.

ГЛАВА 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Используемые вещества и растворы

В работе использовали лиофилизированный препарат высокоочищенных ферментов (комплект реактивов аналитической биолюминесценции (КРАБ)), содержащий люциферазу (L) из рекомбинантного штамма *Escherichia coli* и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазу (R) из *Vibrio fischeri*, произведенный в лаборатории нанобиотехнологии и биолюминесценции 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 VChE из лошадиной сыворотки («Sigma», Германия), активность VChE 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 системы R+L и VChE соответственно.

Во флакон КРАБа вносили 0,5 мл калий-фосфатного буфера pH 6,9, полученный раствор выдерживали на льду в течение 1 – 2 часов, затем замораживали. Перед началом работы раствор с ферментами вновь выдерживали на льду в течение указанного времени.

Раствор 0,0025 % миристинового альдегида готовили смешиванием 50 мкл 0,25%-ного спиртового раствора альдегида и 4,95 мл 0,05 М буфера.

Лиофилизированную VChE растворяли в калий-фосфатном буфере pH 8,1. Полученный раствор фермента выдерживали на льду в течение 1 часа,

затем замораживали. Перед началом работы раствор с ферментами вновь выдерживали на льду в течение указанного времени.

3.2. Используемая аппаратура

Измерения кинетики биолюминесцентных реакций проводили на биолюминометре 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).

3.3. Метод получения иммобилизованных реагентов

Иммобилизацию ферментов и компонентов ферментных систем в крахмальный гель проводили следующим образом: 20 мл 3,15 % суспензии крахмала медленно нагревали и кипятили в течение 5 минут. При проведении иммобилизации в желатиновый гель 20 мл 1,8 % суспензии желатина медленно нагревали до 80°C, охлаждали до температуры 25°C, последовательно вносили различные компоненты ферментных систем:

при проведении иммобилизации BChE

- раствор BChE;
- раствор 5-5'-дитиобис (2-нитробензойной кислоты);

при проведении иммобилизации биферментной системы светящихся бактерий

- раствор NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы + люциферазы (КРАБ);
- раствор NADH;
- раствор тетрадеканала;

- раствор ДТТ, БСА или меркаптоэтанола.

Концентрация ДТТ или меркаптоэтанола в реагенте составляла от 50 мкМ до 50 мМ, БСА от 10 нМ до 50 мМ.

Полученные смеси тщательно перемешивали с помощью вакуумного смесителя «Аверон» (Россия). Далее, при помощи автоматической станции пробоподготовки, либо при помощи автоматического дозатора наносили по 25 мкл геля, содержащего компоненты системы, на фторопластовую пленку и высушивали при температуре 4-8⁰С в течение 24 часов. Реагент, на основе системы R+L, представляет собой высушенный диск диаметром 6-7 мм, сухой вес 1,5 ± 0,2 мг. Реагент, на основе BChE, представляет собой высушенный диск диаметром 6-7 мм, сухой вес 1,24 ± 0,03 мг.

3.4. Исследование активности многокомпонентной иммобилизованной биферментной системы R + L

О влиянии стабилизаторов вышеуказанных концентраций на характеристики многокомпонентной иммобилизованной биферментной системы (МИБС) судили по изменению параметров свечения реагента, содержащего стабилизаторы, по сравнению с параметрами свечения контрольного реагента, не содержащего стабилизаторов. Активность МИБС определяли по величине максимальной интенсивности свечения $I_{\text{макс}}$ (выраженной в условных единицах), константе спада свечения $k_{\text{сп}}$ и времени выхода свечения на максимум $T_{\text{макс}}$, в реакционной смеси следующего состава:

- 1 диск МИБС,
- 300 мкл 0,05 М калий-фосфатного буфера (либо дистиллированной воды),
- 10 мкл 0,5 мМ раствора FMN.

Константу спада свечения рассчитывали по формуле:

$$k_{\text{сп}} = \frac{\ln I_1 / I_2}{\Delta t} \quad (8)$$

где I_1 – максимум интенсивности свечения системы, I_2 – интенсивность свечения системы через заданное время после достижения максимума, Δt – время (в минутах), за которое I_1 достигает I_2 .

3.5. Исследование активности растворимой биферментной системы светящихся бактерий R + L

Активность растворимой биферментной сопряженной системы NADH:FMN–оксидоредуктаза+люцифераза измеряли в реакционной смеси следующего состава:

- 300 мкл 0,05 М калий фосфатного буфера pH 6,9;
- 5 мкл раствора КРАБа;
- 50 мкл 0,0025 % раствора тетрадеканала;
- 10 мкл 0,5 мМ раствора FMN;
- 100 мкл 0,4 мМ раствора NADH;
- 10 мкл раствора стабилизатора заданной концентрации.

В кювету биолюминометра последовательно вносили все компоненты реакционной смеси, быстро перемешивали, помещали кювету в биолюминометр и регистрировали параметры биолюминесценции.

О влиянии стабилизаторов вышеуказанных концентраций на активность растворимой биферментной системы судили по изменению интенсивности свечения в их присутствии по сравнению с контрольным свечением (в отсутствие стабилизаторов).

3.6. Исследование чувствительности многокомпонентной биферментной системы R+L к действию ингибирующих веществ


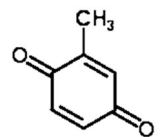
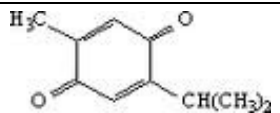
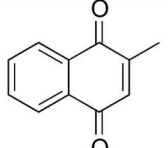
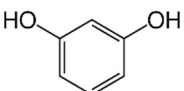
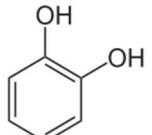

Образцы исследуемых соединений (фенолы и хиноны: гидрохинон, резорцин, пирокатехин, бензохинон, толухинон, тимохинон, нафтохинон; соли металлов: CuSO_4 , CoCl_3 , HgCl_2) растворяли в дистиллированной воде. Вещества, слабо растворимые в воде, предварительно растворяли в спирте,

количество которого в реакционной смеси для измерения свечения не превышало 3 %. В таблице 3.1 приведены характеристики исследуемых хинонов и фенолов, а также их структурные формулы.

Параметры биолюминесценции измеряли в реакционной смеси следующего состава:

- 1 диск МИБС;
- 300 мкл раствора ингибирующего вещества;
- 10 мкл 0,5 мМ раствора FMN.

Таблица 3.1 – Характеристики исследуемых хинонов и фенолов [Esimbekova et al., 2013].

Соединение	Структурная формула	Молекулярный вес, а.е.м.	Растворимость	
			в воде	в орг. р-лях
1, 4 – бензохинон		108	р.	р.
Толухинон		122	р.	л.р.
Тимохинон		164	т.р.	р.
1, 4 – нафтохинон		158	р.	р.
Резорцин		110	р.	р.
Пирокатехин		106	р.	р.
Гидрохинон		118	р.	р.

р. – растворим; л.р. – легко растворим; т.р. – трудно растворим.

О влиянии ингибирующих веществ на активность МИБС судили по отношению максимальной интенсивности свечения в их присутствии к максимальной интенсивности контрольного свечения (в отсутствие ингибиторов).

3.7. Исследование активности бутирилхолинэстеразы

Активность растворимой и иммобилизованной BChE определяли по методу Элмана [Ellman et al., 1961]. Для этого в кювету спектрофотометра последовательно вносили указанные ниже компоненты реакционных смесей.

Определение активности растворимой BChE:

- 11 мкл раствора бутирилхолинэстеразы;
- 100 мкл 120 мМ раствора S-BCh-I;
- 100 мкл 2 мМ раствора 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислоты);
- 2 мл 0,05 М калий фосфатного буфера pH 7,9 или раствора крахмала/желатина.

Определение активности иммобилизованной BChE:

- 1 диск реагента бутирилхолинэстеразы;
- 100 мкл 120 мМ раствора S-BCh-I;
- 100 мкл 2 мМ раствора 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислоты);
- 2 мл 0,05 М калий фосфатного буфера pH 7,9.

Определение активности BChE, иммобилизованной совместно с реактивом Элмана:

- 1 диск реагента на основе бутирилхолинэстеразы, содержащей 0,2 мМ 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислоты);
- 100 мкл 120 мМ раствора S-BCh-I;
- 2 мл 0,05 М калий фосфатного буфера pH 7,9.

Регистрацию оптической плотности растворов проводили при длине волны 412 нм. По изменению оптической плотности вычисляли скорость гидролиза

субстрата растворимой и иммобилизованной BChE, по полученным результатам делали вывод об активности растворимой BChE и иммобилизованных реагентов.

3.8. Температурная инактивация бутирилхолинэстеразы

Термическую инактивацию проводили в буферном растворе, 1,4% желатине и 3% крахмале при различных температурах в диапазоне от 55°C до 64°C в течение различных временных интервалов. Измеряли остаточную активность фермента после инкубации при исследуемой температуре. Для каждого эксперимента при заданной температуре в набор пробирок типа Эппендорф вносили по 1 мл образца фермента (0,11 U BChE в растворе буфера/крахмала/желатина). Затем пробирки погружали в термостат, поддерживающий требуемую температуру с точностью $\pm 0,02^\circ\text{C}$. По окончании периода инкубации пробирки извлекали из термостата и охлаждали. Остаточную активность BChE измеряли при 25°C: отбирали аликвоты по 0,9 мл из термостатируемой пробирки и быстро смешивали с 60 мкл 2 mM DTNB и 60 мкл 2 mM S-BCh-I.

3.9. Исследование чувствительности бутирилхолинэстеразы к действию ингибирующих веществ

Образцы исследуемых соединений растворяли в дистиллированной воде. Вещества, слаборастворимые в воде, предварительно растворяли в этиловом спирте, количество которого в реакционной смеси для измерения активности BChE не превышало 3 %, для исключения влияния этанола на фермент [Novales et al., 2022; Mionetto et al., 1994]. Структурные формулы и информация о растворимости исследуемых соединений представлена в таблице 3.2.

Скорость ферментативного гидролиза субстрата бутирилхолинэстеразой измеряли в реакционной смеси следующего состава:

- 1 диск реагента, содержащего VChE и 0,2 мМ 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислоты);
- 100 мкл 120 мМ раствора S-VCh-I;
- 100 мкл раствора ингибирующего вещества;
- 1,9 мл 0,05 М калий фосфатного буфера pH 7,9 или дистиллированной воды.

О влиянии ингибирующих веществ на активность VChE судили по отношению активности фермента в их присутствии к активности фермента в контрольном растворе.

Таблица 3.2 – Характеристики исследуемых пестицидов

Соединение	Структурная формула	Молекулярный вес, а.е.м.	Растворимость	
			в воде	в орг. р-лях
Малатион		330,36	н.р.	р.
Пиримифосметил		305,33	н.р.	л.р.
Неостигмин	Br^- 	303,2	р.	р.
Хлорофос		257,44	н.р.	р.

р. – растворим,
н.р. – легко растворим.

3.10. Полунативный электрофорез

Электрофорез проводили в 12,5 % ПААГ по методу Лэммли [Laemmli, 1970]. Камеру для электрофореза нагревали до температуры 65 °С с помощью жидкостного термостата КРИО-ВТ-01 (Россия) в течение всего времени разделения белковых фракций.

3.11. Гель-фильтрация

Анализируемые растворы ВChE пропускали через колонку Superdex 200 («GE Healthcare», США), уравновешенную 0,05 М калий-фосфатным буфером pH 8 на хроматографе АКТА Pure (Швеция).

3.12. Статистическая обработка результатов

Для статистической обработки результатов использовали пакеты прикладных программ EXCEL и SigmaPlot («Microsoft», США). Вычисляли среднее значение параметров ферментативных реакций и стандартное отклонение. С использованием регрессионного анализа определяли кинетические параметры ферментативных реакций.

ГЛАВА 4. КИНЕТИКА ТЕМПЕРАТУРНОЙ ИНАКТИВАЦИИ ФЕРМЕНТОВ В ГЕЛЕОБРАЗНОЙ СРЕДЕ

4.1. Температурная инактивация бутирилхолинэстеразы в среде крахмала и желатина

В данной работе влияние крахмала и желатина на активность ВChE определяли, изучая скорость ферментативного гидролиза субстрата S-VCh-I в зависимости от концентрации стабилизаторов в растворе при температуре 25°C (рис. 4.1).

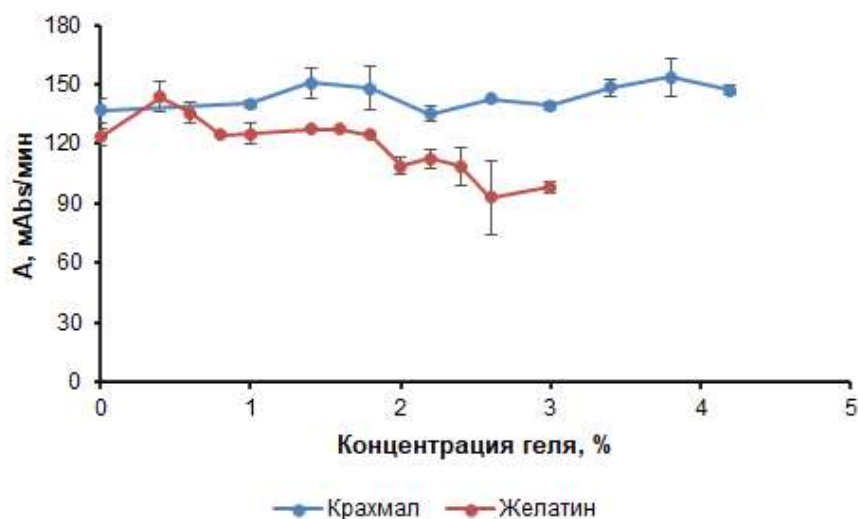


Рисунок 4.1 – Зависимость активности ВChЕ от концентрации крахмала или желатина [Lonshakova-Mukina et al., 2021].

Активность ВChЕ (А) считали равной скорости ферментативного гидролиза субстрата S-VCh-I. Концентрацию крахмала варьировали от 1 до 4,2%, концентрацию 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

низкоконцентрированных 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 иммобилизованных препаратов, предназначенных для проведения одного анализа.

Наибольшая активность ВChE 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 ВChE не менялась, а внесение фермента в растворы с более высокой концентрацией желатина приводило к снижению его активности. В растворах полимеров с их концентрацией более 1% активность фермента в присутствии крахмала была выше, чем в желатиновой среде. 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-VCh-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.

Для исследования механизмов термической инактивации ВChE и определения биофизических параметров данного процесса выбраны 1,4 % желатиновый и 3 % крахмальный гели. При данных концентрациях полимеров

активность ВChE сравнима с активностью в водном буферном растворе, помимо этого данные концентрации подходят для приготовления одноразовых иммобилизованных реагентов для анализа веществ антихолинэстеразного действия [Esimbekova et al., 2015].

Одним из важнейших параметров 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.

К настоящему моменту подобные исследования были проведены с использованием оксида дейтерия как стабилизатора процесса термической инактивации ВChE, выделенной из плазмы крови человека [Masson et al., 1988]. Было показано, что оксид дейтерия не изменяет общий многостадийный процесс инактивации, при этом наблюдается небольшой изотопный эффект растворителя – стабилизирующий эффект.

В представленной работе для оценки возможного стабилизирующего действия гелеобразных сред крахмала и желатина на ВChE, были построены зависимости остаточной активности фермента от времени воздействия различных температур (от 50 до 64 °С). Остаточную активность фермента рассчитывали, как отношение активности ВChE после температурного воздействия (A) к активности ВChE при комнатной температуре (A₀) (25 °С). Показано, что в присутствии желатина и крахмала активность фермента сохраняется при более длительном воздействии высоких температур (рис. 4.2).

Так, например, при температуре воздействия 58 °С спустя 30 мин в буферном растворе сохраняется около 20% от начального значения активности фермента, а при тех же условиях в гелеобразной среде крахмала сохраняется около 65% первоначальной активности.

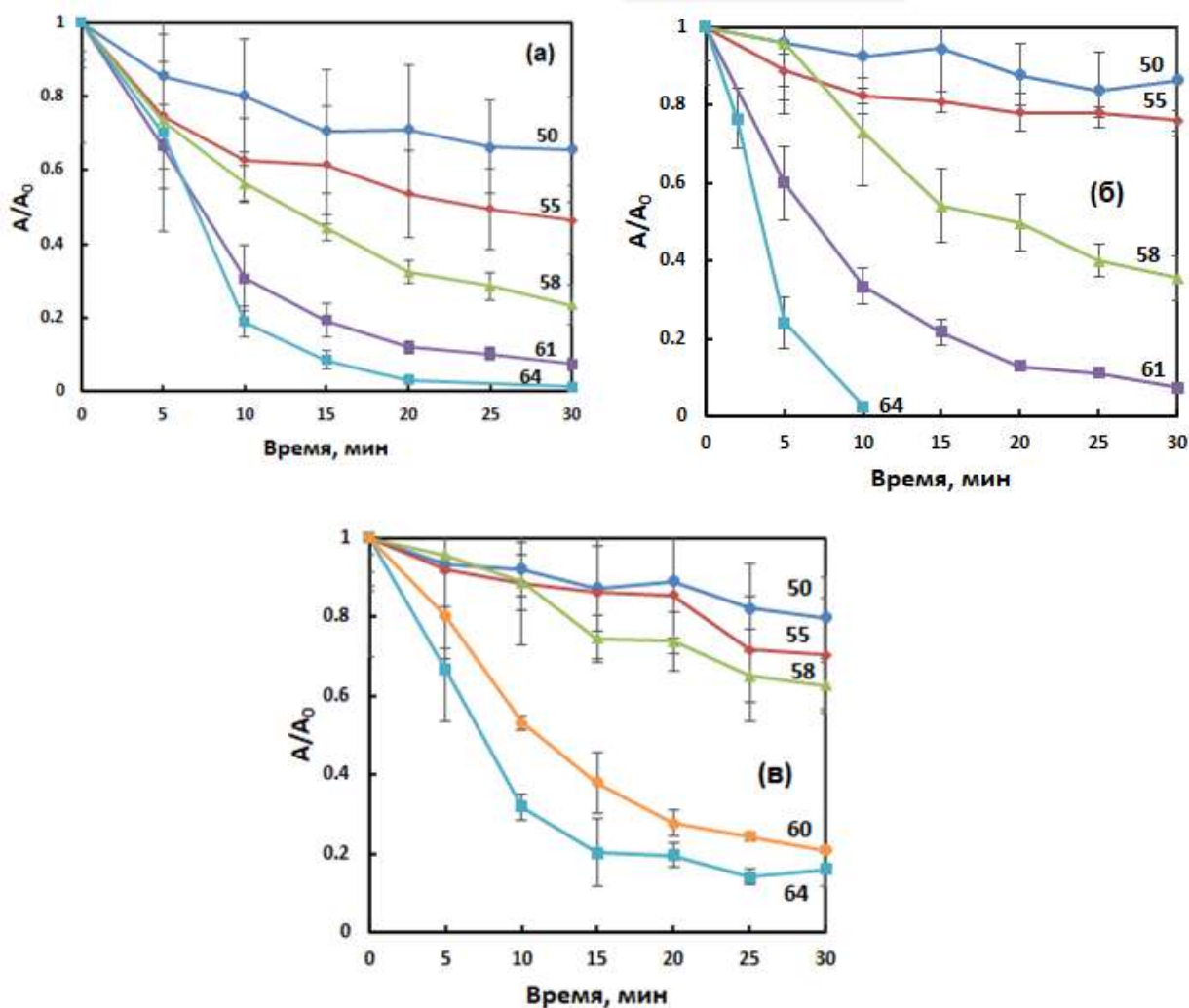


Рисунок 4.2. – Зависимость остаточной активности ВChЕ от времени воздействия различных температур; (а) – в водном буферном растворе, (б) – в 1,4 % растворе желатина; (в) – в 3 % растворе крахмала. Температурный диапазон 50-64 °С. Номер кривой соответствует температуре воздействия (°С).

Для оценки возможного стабилизирующего действия гелеподобных сред крахмала и желатина на ВChЕ, 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 ВChЕ при различных температурах, представленные на рисунке 4.3, демонстрируют сохранение механизма инактивации при использовании желатинового и крахмального гелей в качестве среды, в которой протекает ферментативная реакция.

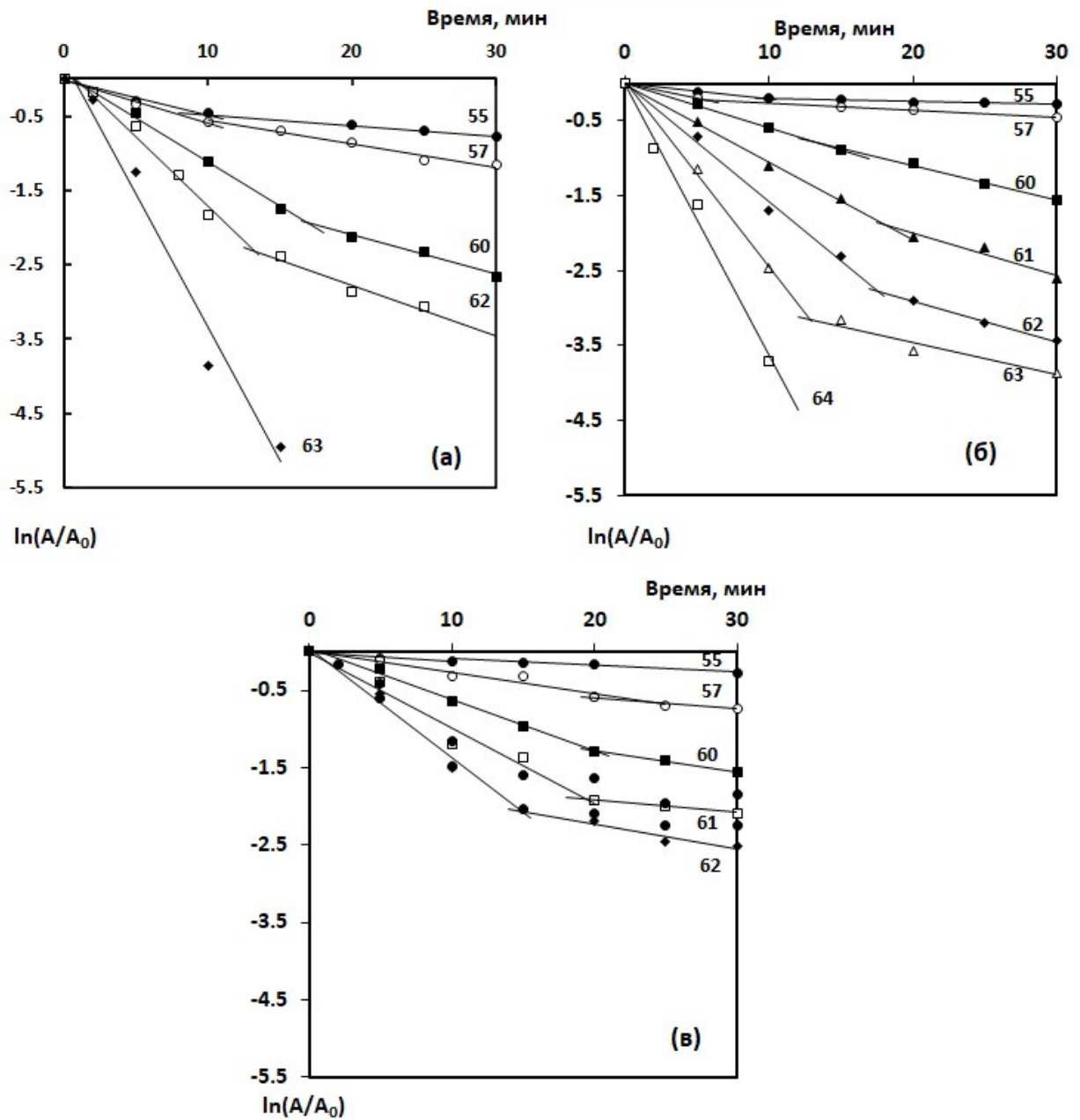


Рисунок 4.3 – Кинетические зависимости температурной инактивации BChE при различных температурах в координатах уравнения первого порядка. Номер кривой – значение температуры в °C; (а) в водном буферном растворе, (б) в желатиновом геле, (в) в крахмальном геле [Lonshakova-Mukina et al., 2021].

Во всех исследуемых средах (водный буферный раствор, крахмал, желатин) кинетические зависимости в координатах первого порядка имеют

излом, говорящий о протекании с разными скоростями как минимум двух последовательных процессов: первый – с большей скоростью (быстрая реакция) и второй – с меньшей скоростью (медленная реакция). Значения рассчитанных констант скоростей представлены в таблице 4.1.

Таблица 4.1. Эффективные константы скоростей быстрой (k_1 , мин⁻¹) и медленной (k_2 , мин⁻¹) реакций термической инактивации VChE в присутствии 1,4 % желатина, 3 % крахмала или водного 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 [Полторак 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 VChE, выделенной из сыворотки лошади, соединяются между собой посредством устойчивых S-S-связей, разрыв которых затруднен так как энергия диссоциации достигает 60

ккал/моль [Cremlyn et al., 1996]. Второй возможной причиной может являться наличие промежуточных активных форм фермента. Однако следует отметить, что и мономерная VChE 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°C. Таким образом, сложный процесс инактивации тетрамерной VChE лошади может не зависеть от четвертичной структуры и не обязательно включать последовательный механизм термоинактивации.

Исключение составляют зависимости, полученные для бутирилхолинэстеразы в водном буферном растворе и желатиновом геле при температурах 63 °C и 64 °C соответственно. Данные кривые демонстрируют необратимую инактивацию псевдо-первого порядка.

Для проверки предполагаемого диссоциативного характера инактивации VChE проводили полунативный электрофорез в полиакриламидном геле при температуре 65 °C (рис. 4.4).

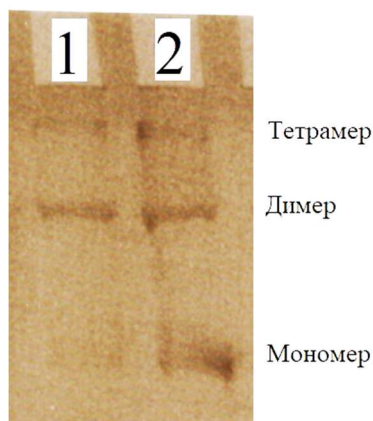


Рисунок 4.4 – VChE, распределенная с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, с применением кумасси для окрашивания фракций. Дорожка 1 – нативная VChE, дорожка 2 – VChE, предварительно выдержанная при температуре 65 °C в течение 30 мин.

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 VChE, 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]. С целью определения молекулярных масс, полученных белковых фракций, проводили аналитическую гель-фильтрацию на колонке Superdex 200 («GE Healthcare») при скорости потока 0,4 мл/мин в 0,05 М калий-фосфатном буфере, рН 8,0. Детекцию белка осуществляли по светопоглощению при 280 нм.

Полученный профиль гель-фильтрации образца VChE (рис. 4.5) позволяет оценить молекулярные массы полученных белковых фракций: ≈ 440 кДа, 220 кДа и 110 кДа, что согласуется с литературными данными для тетрамерной, димерной и мономерной форм фермента [Lee et al., 1973].

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 VChE, выделенной из лошадиной сыворотки, не может быть описана простой кинетикой первого порядка.

Исходя из вышеизложенного следует, что термическая инактивация VChE 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].

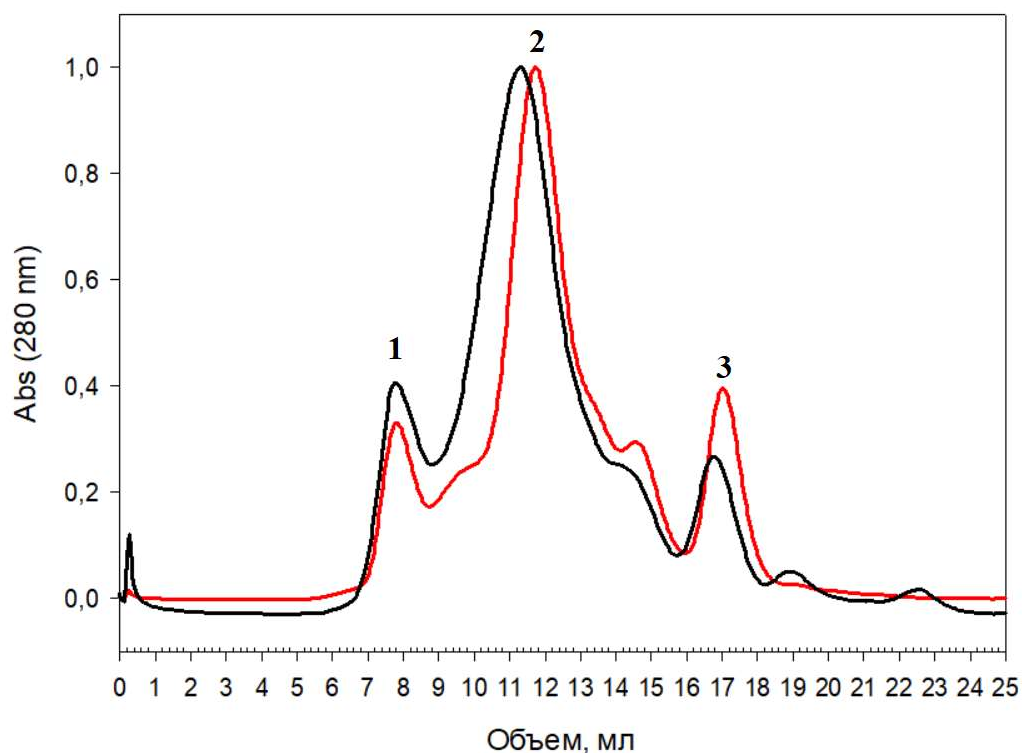


Рисунок 4.5 – Профиль гель-фильтрации образца BChE на Superdex-200 (черная кривая), с разделением стандартных белков (красная кривая). 1 – ферритин (~ 480 кДа), 2 – каталаза (~ 240 кДа), 3 – альдолаза (~ 140 кДа).

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]:

$$A_i/A_0 = B e^{-k_1 t} + (1 - B) e^{-k_2 t} \quad (1)$$

где A_i – остаточная активность ВChE 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 (ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger) реакции температурной инактивации, используя основное уравнение теории активированного комплекса (уравнение Эйринга):

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

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

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.

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

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 ВChE в отсутствие и присутствии стабилизирующих добавок для каждой температурной зависимости. На

рисунке 3.6 (а, б) представлена зависимость константы скоростей быстрой и медленной реакций от температуры в координатах Аррениуса.

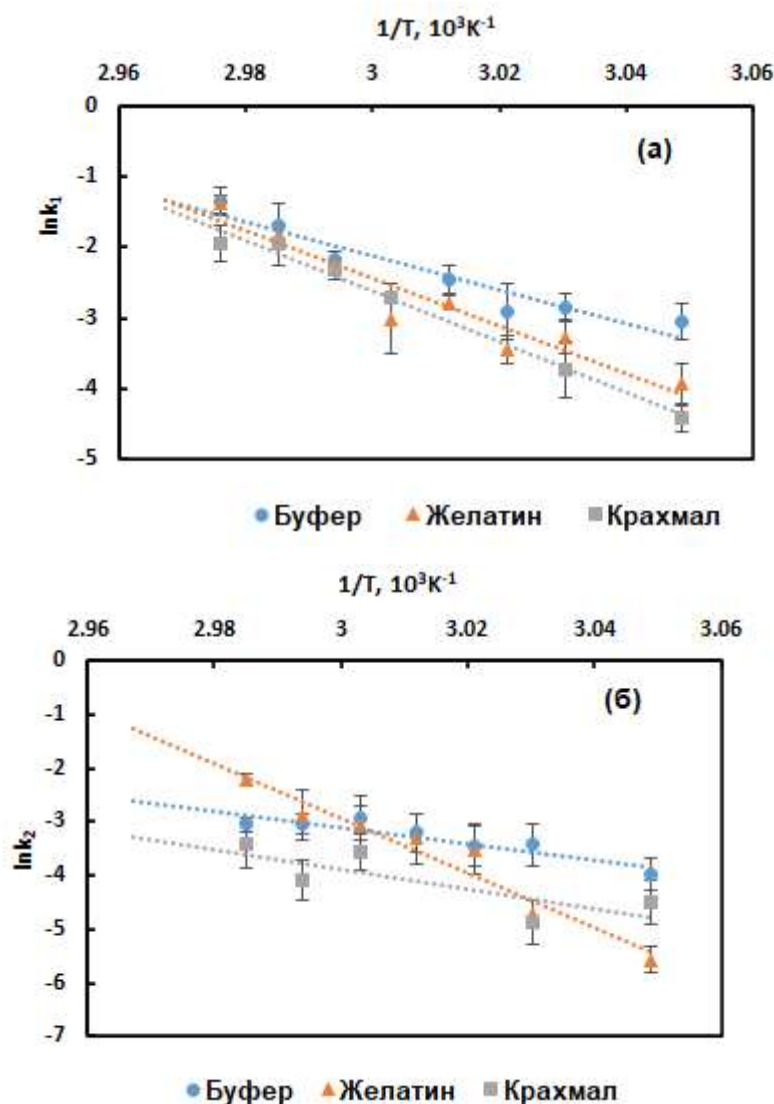


Рисунок 4.6 – Зависимость константы скоростей реакций от температуры в координатах Аррениуса для реакции температурной инактивации BChE [Lonshakova-Mukina et al., 2021].

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 энергия активации Аррениуса равна 72 ± 3 ккал/моль и 37 ± 3 ккал/моль, в присутствии желатинового геля – 67 ± 2 ккал/моль и 100 ± 30 ккал/моль для быстрой и медленной стадии 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 были определены активационные параметры ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger , ΔG^\ddagger , характеризующие температурную инактивацию BChE (таблица 4.2). 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.

Таблица 4.2 – Активационные параметры реакции температурной инактивации бутирилхолинэстеразы [Lonshakova-Mukina et al., 2021].

	ΔH_1^\ddagger , ккал/моль	ΔH_2^\ddagger , ккал/моль	ΔS_1^\ddagger , кал/(К·моль)	ΔS_2^\ddagger , 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

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.

Процесс потери нативной структуры белка сопровождается существенным увеличением энтропии и энтальпии, что приводит к изменению энтропии активации ΔS^\ddagger и энтальпии активации ΔH^\ddagger . 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 микровязкость растворов крахмала увеличивается быстрее чем его микровязкость [Gulnov et al., 2016], тем самым в гелеобразной среде крахмала достигается уменьшение степеней свободы переходного состояния реакции термической денатурации отдельных мономеров VChE. 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 стабильность VChE, в том числе её термостабильность. Стабилизация ферментов в основном обусловлена уменьшением молекулярных и субмолекулярных движений или молекулярных колебаний [Bromberg et al., 2008]. Известно, что низкомолекулярные стабилизаторы повышают стабильность VChE, 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; Papon 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 «плаваются», 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 ВChE. 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 ВChЕ, исследуемых в данной работе. Таким образом, увеличение энергии активации процесса термоинактивации, свидетельствовало об увеличении термостабильности фермента в присутствии растворов крахмала и желатина.

4.2. Температурная инактивация ферментов светящихся бактерий NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы+люциферазы

В работе [Bezrukikh et al., 2014] авторы показали, что вязкие среды желатина и крахмала оказывают стабилизирующее действие на ферменты светящихся бактерий в определенных условиях. Например, включение биферментной системы NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы+люциферазы в желатиновую и крахмальную среды не меняет скорости их термической инактивации в интервале температур 25–43 °С (рис. 4.7).

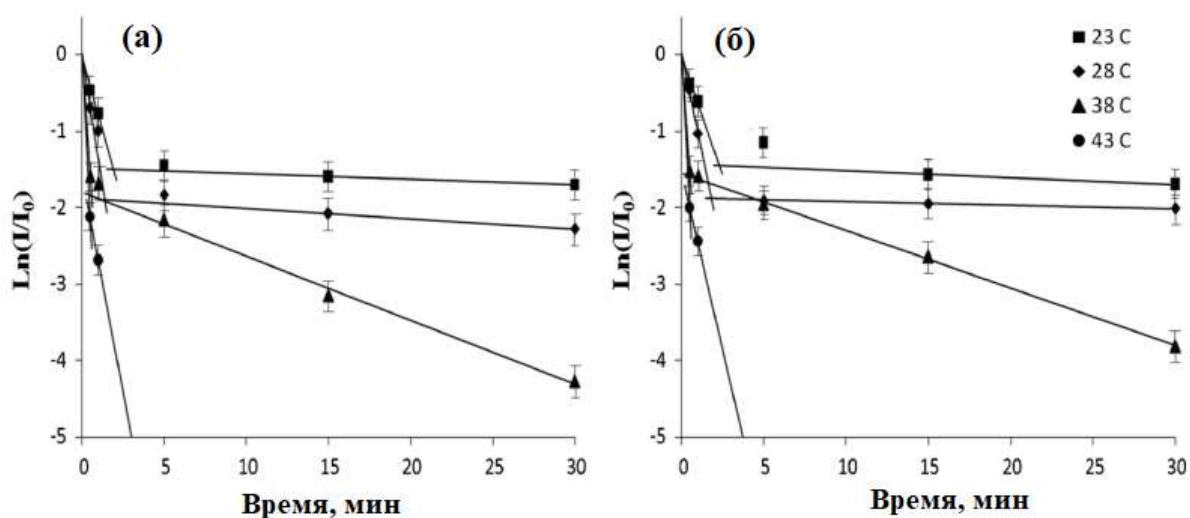


Рисунок 4.7 – Кинетические кривые термической инактивации биферментной системы NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы+люциферазы при различных температурах в присутствии 1 % желатина (б) и в буферном растворе (а) [Bezrukikh et al., 2014].

Рассчитанные значения активационных параметров (таблица 3) позволяют сделать вывод о том, что, так же, как и на ВChE, 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.

В гелеобразной среде крахмала энтропия активации уменьшается как для «быстрой», так и для «медленной» реакции (таб. 4.3).

Таблица 4.3 – 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 ± 11	28 ± 5
Желатин 1%	28 ± 7	44 ± 10	42 ± 8	89 ± 10
Желатин 5%	22 ± 7	62 ± 12	26 ± 5	150 ± 10
Крахмал 5%	21 ± 8	17 ± 5	21 ± 6	$-3,4 \pm 0,5$

Это может быть связано с тем, что процессы термоинактивации системы R + L протекают при более низких температурах (23-48 C°), в то время как термическая инактивация ВChE происходит при температурах выше 55 C°. 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 VChE также наблюдается $\Delta S^\ddagger < 0$ для процесса денатурации мономеров. Данное сходство можно объяснить одинаковым влиянием гелевой структуры крахмала, которая не разрушается при температурах термической инактивации как VChE, 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 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 в присутствии полимеров не изменяется (рис. 4.8).

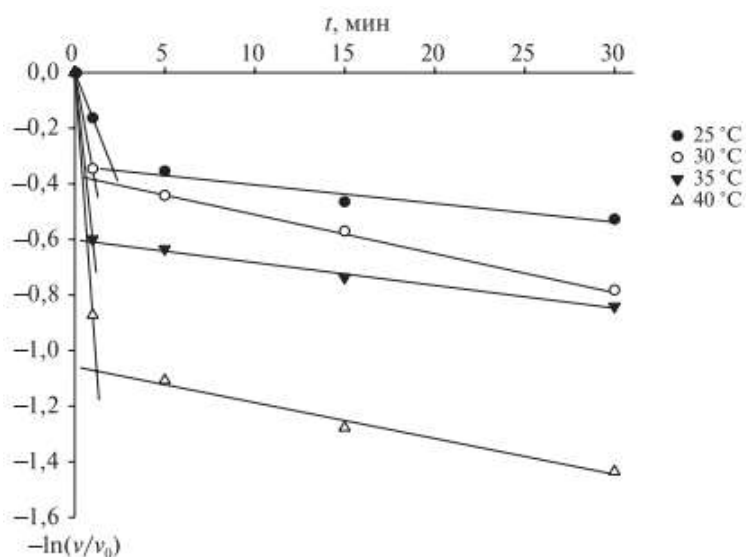


Рисунок 4.8 – Кинетические зависимости термоинактивации NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы в 0,05 М калий-фосфатном буфере pH 6,8 при 25, 30, 35, 40 °C [Говорун и др., 2019].

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

ГЛАВА 5. РАСЧЕТ КИНЕТИЧЕСКИХ КОНСТАНТ МИХАЭЛИСА-МЕНТЕН ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В ГЕЛЕПОДОБНЫХ СРЕДАХ

Для определения влияния гелеобразной среды на тип 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.

Известно, что кинетика реакции, катализируемой бутирилхолинэстеразой, не 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.

Кинетика гидролиза субстрата S-BCh-I, катализируемого бутирилхолинэстеразой, может быть описана с помощью схемы, представленной на рисунке 5.1, и уравнения (6).

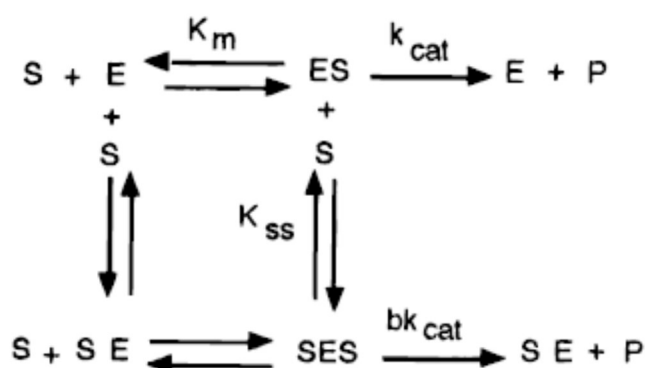


Рисунок 5.1 – Кинетическая схема реакции, катализируемой бутирилхолинэстеразой, при высокой концентрации субстрата [Мессон, 2012].

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m}{[S]}} \left(\frac{1 + \frac{b[S]}{K_{SS}}}{1 + \frac{[S]}{K_{SS}}} \right) \quad (6)$$

где K_{SS} – константа диссоциации комплексов SES и ES, константа диссоциации для SE равна K_{SS} , а для SES – αK_{SS} , где α равно 1. Если предположить, что S связывается как с E, так и с ES, параметр b отражает эффективность, с которой тройной комплекс SES образует продукт. Если $0 < b < 1$, имеет место субстратное ингибирование; если $b > 1$, происходит активация субстрата, а если $b = 1$ кинетика описывается зависимостью Михаэлиса-Ментен. Эта модель аналогична тем, которые использовались ранее для описания субстратной активации BChE [Ericksson et al., 1979; Cauet et al., 1987]. В настоящей работе, концентрационные диапазоны субстрата позволили считать $b = 1$. K_m , K_{SS} , 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. 5.2). На основании полученных графиков, были вычислены основные кинетические параметры ферментативной реакции, значения которых приведены в таблице 5.1.

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 присутствии неостигмина приводит к

увеличению константы Михаэлиса на 15%, а в растворах желатина и крахмала на 71% и 119% соответственно. Похожие результаты получены для хлорофоса.

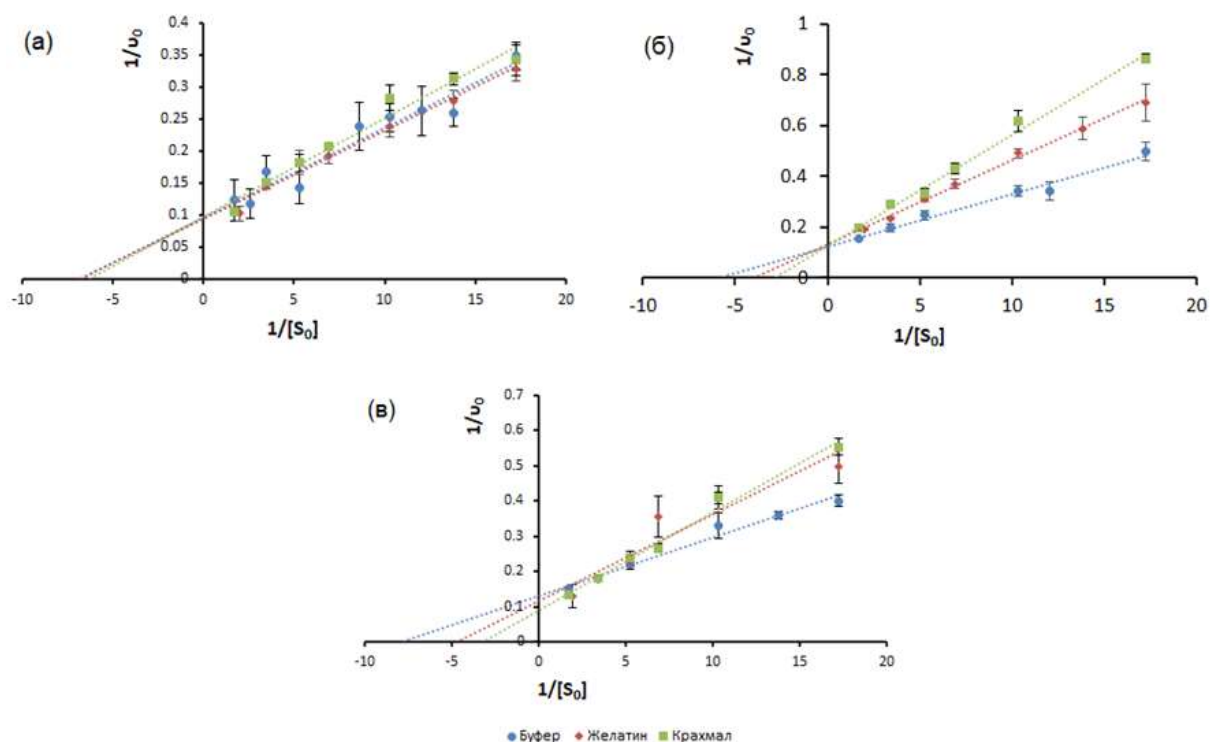


Рисунок 5.2 – Зависимости скорости реакции от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Берка в водном буферном растворе, крахмальном и желатиновом гелях; (а) в отсутствие ингибитора, (б) в присутствии неостигмина, (в) в присутствии хлорофоса.

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 конформационные особенности фермента.

Таблица 5.1 - Кинетические параметры функционирования ВСhЕ в различных средах, рассчитанные из 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 – неостегмин; I2 – хлорофос.

ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА СТАБИЛЬНЫХ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

6.1. Разработка многокомпонентного препарата на основе бутирилхолинэстеразы

Из литературных данных известно, что включение холинэстераз в крахмальный гель не приводит к снижению каталитической активности фермента [Vauman et al., 1967]. Также известно, что иммобилизация холинэстераз в желатиновый гель – один из эффективных способов их стабилизации. Следствием этого является широкое применение препаратов на основе холинэстераз, иммобилизованных в желатиновый гель, в качестве биомодуля в различных биосенсорах, предназначенных как для полуколичественного, так и интегрального определения ингибиторов данных ферментов [Amine et al., 2006]. Однако для проведения анализа необходимо разведение большого количества реактивов, что существенно усложняет процедуру эксперимента и уменьшает экспрессность метода.

Эффективность применения препаратов растворимой BChE, используемых для определения степени токсичности формулянтов коммерческих препаратов пестицидов, а также возможности разработки ферментных тестов для анализа загрязненности почв доказана в работах [Esimbekova et al., 2022; Kratasyuk et al., 2021; Колосова и др., 2019]. Следовательно, актуальной является разработка и получение нового, более удобного в работе препарата. Достичь этого возможно путем проведения совместной иммобилизации бутирилхолинэстеразы (BChE) и индикатора на тиоловые группы – 5'5-дителиобис-(2-нитробензойной кислоты) (DTNB) с последующим высушиванием (получение ферментов в твердой фазе).

При включении BChE в крахмальный гель активность фермента сохраняется (рис. 6.1). 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 (рис. 6.1). Таким образом, как крахмальный, так и желатиновый гели могут использоваться в качестве носителя для получения иммобилизованных препаратов на основе бутирилхолинэстеразы.

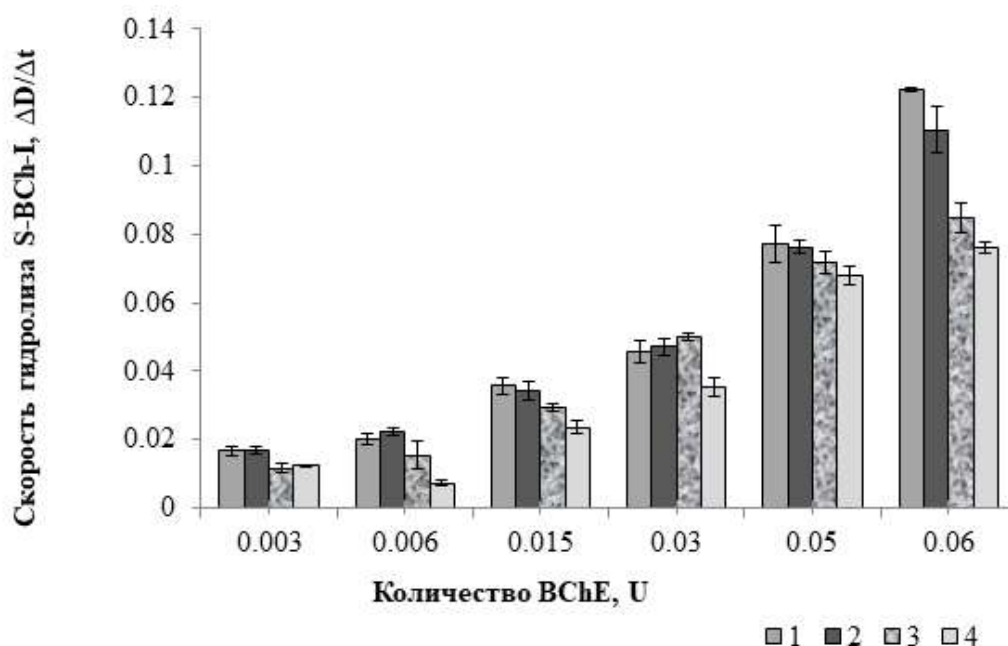


Рисунок 6.1 – Зависимость скорости гидролиза S-BCh-I от количества BChE. 1 – растворимая BChE, 2 – BChE, иммобилизованная в крахмальный гель, 3 – BChE, иммобилизованная совместно с DTNB в крахмальный гель, 4 – BChE, иммобилизованная совместно с DTNB в желатиновый гель.

Для анализа стабильности полученных препаратов при хранении наблюдали за изменением их активности в течение двух месяцев. Активность фермента, включенного в крахмальный гель, при хранении в течение 2-х месяцев практически не изменяется. Это говорит об эффективной стабилизации фермента данным носителем. Установлено, что препарат на основе желатинового геля отличается большей активностью по сравнению с препаратом на основе крахмального геля, в этом случае скорость гидролиза S-BCh-I на 30 % выше (рис. 6.2). Далее исследовали стабильность при хранении

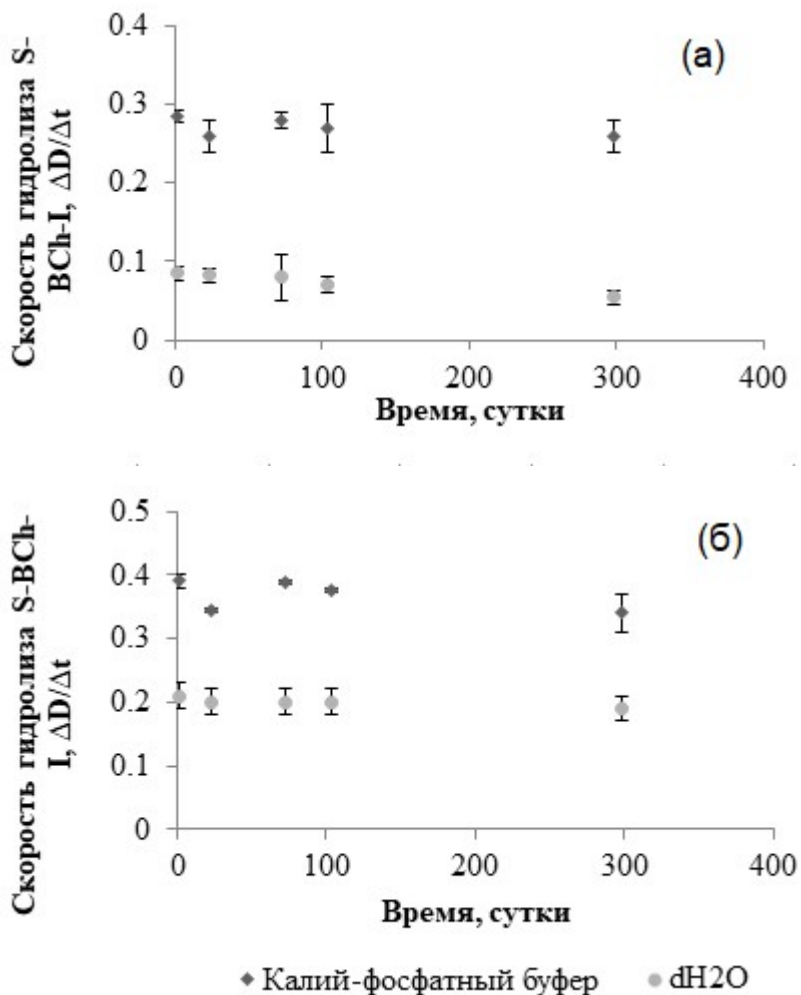
препаратов, представляющих собой VChE, иммобилизованную совместно с DTNB в крахмальный и желатиновый гели. Показано, что препараты отличаются длительным сроком хранения без потери активности. Так, активность препаратов, содержащих 0,11 U VChE и 0,2 мМ DTNB, не изменяется при хранении в течение десяти месяцев (рис. 6.2).

Кроме того, показано, что иммобилизованные ферментные препараты сохраняют работоспособность не только в буфере, но и в дистиллированной воде (рис. 6.2). Активность препаратов в дистиллированной воде снижается в 2 и 3 раза (в зависимости от природы используемого геля). Тем не менее, для дальнейшего использования этих препаратов в биотестировании факт сохранения 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.

Далее разработанный ферментный препарат будет использоваться для определения остаточных количеств пестицидов в объектах окружающей среды. Из литературных данных известно о высокой чувствительности VChE к действию веществ фосфорорганической природы [Будников и др., 1999]. Следовательно, следующим этапом работы было определение чувствительности VChE, иммобилизованной совместно с DTNB, к действию модельных фосфорорганических веществ. В работе проверяли влияние двух модельных ингибирующих веществ на VChE, иммобилизованную совместно с DTNB. В качестве модельных веществ были выбраны пиримифосметил и малатион. Данные соединения часто используются в качестве действующих веществ в коммерческих препаратах инсектицидов.

Для описания чувствительности препаратов к действию ингибирующих веществ, использовали параметр IC_{50} (концентрация действующего вещества, вызывающая снижение активности бутирилхолинэстеразы на 50 %). Этот параметр аналогичен обычно используемому в биотестировании параметру EC_{50} , обозначающему эффективную концентрацию какого-либо

действующего вещества, уменьшающую на 50 % один из параметров жизнедеятельности организмов, используемых в качестве тест-объектов [Nunes et al., 2011].



Концентрация DTNB - 0,2 мМ, количество BChE - 0,11 U

Рисунок 6.2 – Зависимость скорости гидролиза S-BChE-I бутирилхолинэстеразой, иммобилизованной совместно с DTNB в крахмальный (а) и в желатиновый (б) гели, от времени хранения.

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

фосфорорганических веществ. VChE, иммобилизованная в желатиновом носителе, теряет чувствительность к действию малатиона концентрации 0,5 мкМ, что примерно в 10 раз выше ПДК (рис 6.3). 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 аналитическом контроле за содержанием фосфорорганических соединений в образцах сред, крахмал является более подходящим носителем. Предел обнаружения малатиона в дистиллированной воде составил 5 нМ.

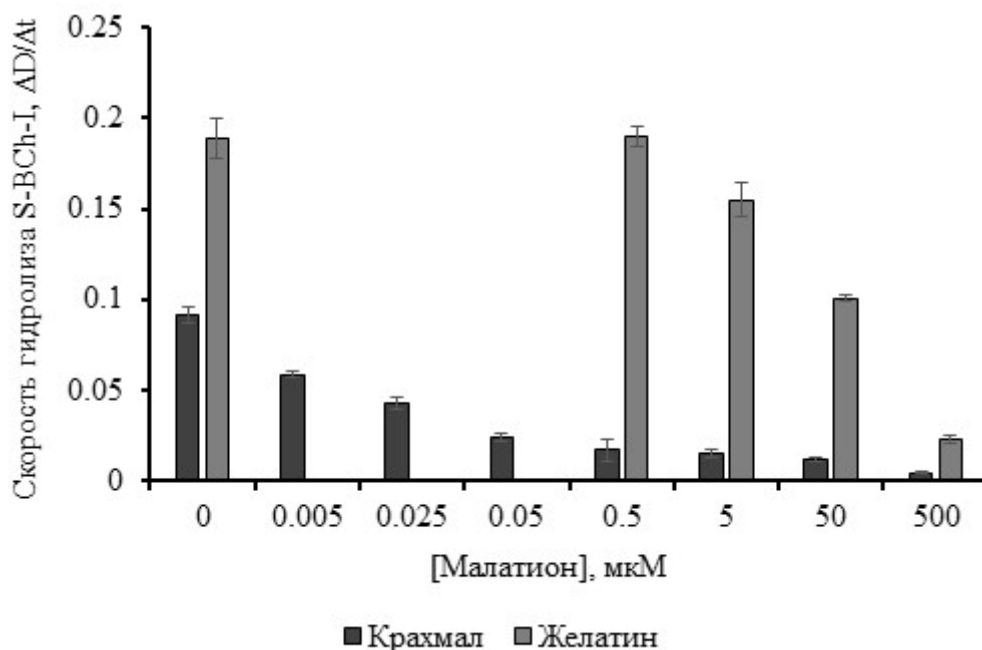


Рисунок 6.3 – Зависимость скорости ферментативного гидролиза S-VChE-I от типа носителя в присутствии малатиона. В одном реагенте содержится: VChE – 0.11 U, DTNB – 0,2 mM.

Для дальнейшего изучения были отобраны препараты на основе крахмального геля, причём содержание бутирилхолинэстеразы в них не должно превышать 0,11 U, содержание DTNB составляло 0,2 mM. Было 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 несколько выше уровня ПДК (таблица 6.1). Предел обнаружения пиримифосметила в дистиллированной воде составил 80 нМ.

Таблица 6.1 – Характеристика чувствительности препарата на основе VChE, иммобилизованной в крахмальный гель, к действию модельных токсических соединений (в одном диске: VChE – 0.11 U, DTNB – 0,2 мМ).

Действующее вещество	ПДК в воде, мг/л	IC_{50} , мг/л
Пиримифосметил	0,01	15,3
Малатион	0,05	0,008

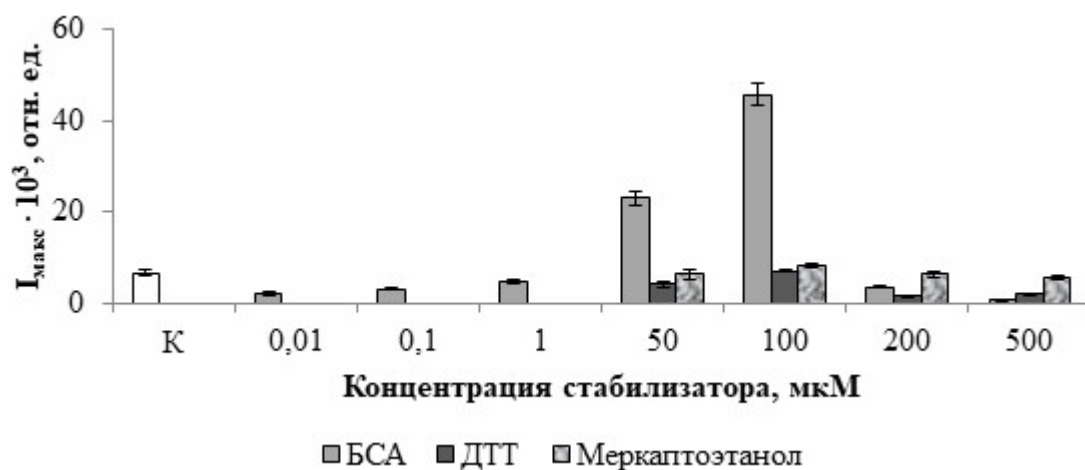
Основываясь на концентрационных диапазонах данных веществ в существующих нормах, есть перспективы в дальнейшей разработке методики применения полученных препаратов для определения чувствительности к действию фосфорорганических соединений в объектах окружающей среды. Так, доказаны перспективы использования VChE не только для полуколичественного анализа пестицидов, но и для анализа токсичности формулянтов коммерческих препаратов пестицидов [Esimbekova et al., 2022].

Таким образом, в работе был получен активный и стабильный при хранении препарат, представляющий собой DTNB и VChE, совместно иммобилизованные в крахмальный гель. Данный препарат обладает чувствительностью к действию модельных фосфорорганических соединений (малатион и пиримифосметил). Концентрация малатиона, при которой наблюдается снижение скорости ферментативного гидролиза на 50 % составляет 8 мкг/л.

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

Использование полимерных гелей, таких как крахмал и желатин, позволяет получать стабильные и удобные в работе препараты на основе различных ферментов и ферментных систем. Однако, зачастую применение одного метода стабилизации белковых катализаторов бывает недостаточно, чтобы добиться устойчивого аналитического сигнала при длительном хранении ферментативных препаратов, и, одновременно, обеспечить сохранение их чувствительности к действию ингибирующих веществ на протяжении всего срока хранения. Так, ранее было показано, что включение биферментной системы светящихся бактерий NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза в данные гели и дополнительное внесение в состав стабилизирующих ферменты добавок приводит к увеличению активности биферментной системы, повышению стабильности иммобилизованных ферментов при хранении, но снижает чувствительность реагента к токсическим веществам. Таким образом, необходимо подобрать такую концентрацию стабилизатора, чтобы препараты обладали стабильностью при долговременном хранении без потери чувствительности к ингибирующим веществам.

В качестве добавок, стабилизирующих ферменты, использовали ДТТ, БСА и меркаптоэтонол различных концентраций. Показано, что иммобилизация биферментной системы светящихся бактерий R + L с указанными компонентами приводит к увеличению активности препаратов в 1,5 раза и выше (рис. 6.4).



Контроль (К) – препарат, не содержащий стабилизаторов

Рисунок 6.4 – Зависимость интенсивности свечения иммобилизованных препаратов от концентрации стабилизатора. Измерения активности препаратов проводили в калий-фосфатном буфере [Lonshakova-Mukina et al., 2015].

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 внесении 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 меркаптоэтанол в значительно меньшей степени увеличивают интенсивность свечения препарата по сравнению с БСА.

Зависимости скорости падения интенсивности свечения препарата ($k_{сп}$) от концентрации стабилизатора в диске не наблюдали (таб. 6.2). Однако можно отметить, что внесение в препарат ДТТ приводит к снижению скорости падения интенсивности свечения МИБС, а при добавлении меркаптоэтанола 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.

Таблица 6.2 – Константы спада интенсивности свечения МИБС в водном буферном растворе.

Стабилизатор	$k_{сп}, \text{мин}^{-1}$				
	К	Концентрация стабилизатора в диске, мкМ			
		50	100	200	500
ДТТ	$0,5 \pm 0,1$	$0,280 \pm 0,006$	$0,38 \pm 0,05$	$0,320 \pm 0,008$	$0,250 \pm 0,003$
БСА		$0,53 \pm 0,02$	$0,66 \pm 0,05$	$0,72 \pm 0,02$	$0,48 \pm 0,02$
Меркаптоэтанол		$0,60 \pm 0,2$	$0,62 \pm 0,06$	$0,6 \pm 0,1$	$0,49 \pm 0,01$
Контроль (К) – реагент, не содержащий стабилизаторов					

Исследованы изменения характеристик биферментной системы светящихся бактерий, иммобилизованной совместно с субстратами и стабилизаторами во времени. Параметры биолюминесценции измерялись через 3 дня после иммобилизации и после 6 месяцев хранения реагента при температуре 4°C . Активность контрольного образца (многокомпонентного иммобилизованного реагента без стабилизаторов) уменьшается за 6 месяцев в 5,5 раза (рис 6.5). 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.

Добавление в качестве стабилизатора БСА не позволяет сохранить активность реагента, максимальная интенсивность свечения снижается в 6 и более раз. Исключение составляет реагент с концентрацией БСА 50 мкМ, активность которого в течение указанного срока не изменилась. Меркаптоэтанол 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. Время выхода свечения на максимальный уровень после хранения реагента в течение 6 месяцев не изменилось.



Контроль (К) – реагент, не содержащий стабилизаторов

Рисунок 6.5 – Зависимость максимальной интенсивности свечения МИБС во времени от концентрации ДТТ.

Рассчитывали скорости падения интенсивности свечения ($k_{сп}$) реагента после его хранения в течение 6 месяцев (таблица 6.3). При добавлении в состав иммобилизованного реагента БСА $k_{сп}$ не изменяется. Исключением является реагент, содержащий 1 мкМ БСА, где $k_{сп}$ увеличивается в 3 раза.

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 резкое падение активности в течение 6-месячного хранения до 2,5 раз, в то же время величина $k_{сп}$ меньше контрольной величины в 2 раза.

Таблица 6.3 – Константы спада свечения ($k_{сп}$) МИБС при хранении в течение 6 месяцев, в зависимости от концентрации стабилизатора в составе реагента.

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

Следующим этапом работы было определение чувствительности МИБС к действию антропогенных поллютантов. Для выявления оптимального состава реагента, пригодного для проведения билюминесцентного биотестирования, в работе проверяли влияние двух модельных токсических веществ на параметры билюминесценции биферментной системы, иммобилизованной совместно с субстратами и стабилизаторами. В качестве модельных веществ были выбраны сульфат меди и бензохинон, различающиеся по механизму воздействию на билюминесцентную биферментную систему. О действии токсических веществ на активность МИБС судили по изменению параметров билюминесценции МИБС в присутствии исследуемого вещества.

Первоначально по концентрационным кривым зависимости интенсивности свечения МИБС от CuSO_4 и бензохинона были выбраны концентрации этих веществ, вызывающие 80 %-ное ингибирование интенсивности свечения иммобилизованной биферментной системы, не содержащей стабилизаторов. Для растворов CuSO_4 и бензохинона это концентрации 4 мкМ и 0,5 мкМ соответственно. Далее, для исследования чувствительности МИБС, содержащих стабилизаторы, в реакционную смесь добавляли растворы CuSO_4 и бензохинона выбранных концентраций.

Реагенты, содержащие 0,01 мкМ, 0,1 мкМ и 1 мкМ БСА, не уступают по чувствительности к бензохинону реагенту, не содержащему стабилизаторов. Наиболее высокая чувствительность к CuSO_4 наблюдается у реагентов, содержащих 0,01 мкМ и 0,1 мкМ БСА. При дальнейшем увеличении концентрации БСА в диске наблюдается увеличение остаточной интенсивности свечения реагента до 90 %, что указывает на снижение чувствительности реагента к данному веществу. Таким образом, при добавлении в реагент БСА в количестве, оказывающем стабилизирующий эффект, наблюдается резкое снижение чувствительности реагента к действию токсических веществ. Для реагента, содержащего 100 мкМ ДТТ характерно сохранение чувствительности к действию токсических веществ (рис. 6.6).

Однако при увеличении содержания ДТТ в реагенте остаточная интенсивность свечения МИБС в присутствии CuSO_4 и бензохинона достигает 100 %, указывая на снижение чувствительности реагента к действию токсических веществ. При внесении в состав реагента меркаптоэтанола различных концентраций чувствительность МИБС к действию раствора CuSO_4 не изменялась. Однако этот реагент характеризуется низкой чувствительностью к бензохинону: при добавлении в реакционную смесь раствора бензохинона остаточная интенсивность свечения реагентов увеличилась от 50 до 80 %.

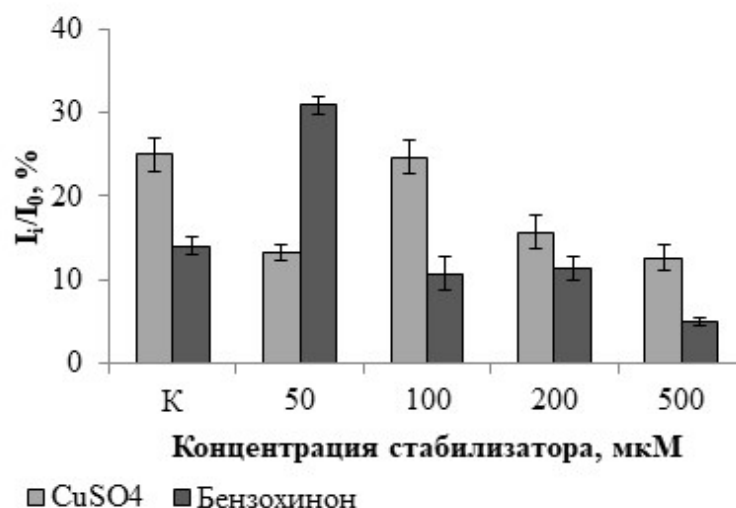


Рисунок 6.6 – Зависимость остаточной интенсивности свечения МИБС в присутствии растворов CuSO₄ и бензохинона при включении в состав реагента ДТТ, контроль (К) – реагент, не содержащий стабилизаторов.

Исходя из полученных результатов, для дальнейшего исследования был отобран реагент, содержащий 100 мкМ ДТТ. Данный реагент характеризуется высокой активностью и стабильностью при хранении, минимальной по сравнению с контрольной скоростью падения интенсивности свечения, а также высокой чувствительностью к действию токсических веществ.

Рассмотрим чувствительность выбранного реагента к действию других модельных токсических веществ, таких как хиноны (нафтохинон, бензохинон, тимохинон, толухинон), фенолы (гидрохинон, пирокатехин, резорцин) и соли тяжелых металлов (CuSO₄, CrCl₃, HgCl₂).

По эффекту, оказываемому на параметры биолюминесценции МИБС, все исследуемые вещества можно разделить на две группы. Вещества первой группы, к которым относятся фенолы и соли тяжелых металлов, воздействуют главным образом на интенсивность свечения МИБС. Вещества второй группы (окислители, например, хиноны), помимо воздействия на максимальный уровень свечения, увеличивают время выхода свечения на максимум вплоть до появления индукционного периода [Кудряшева и др., 1994].

На рисунке 6.7 на примере CrCl_3 , пирокатехина и тимохинона представлены кинетические кривые, характерные для соединений этих групп веществ.

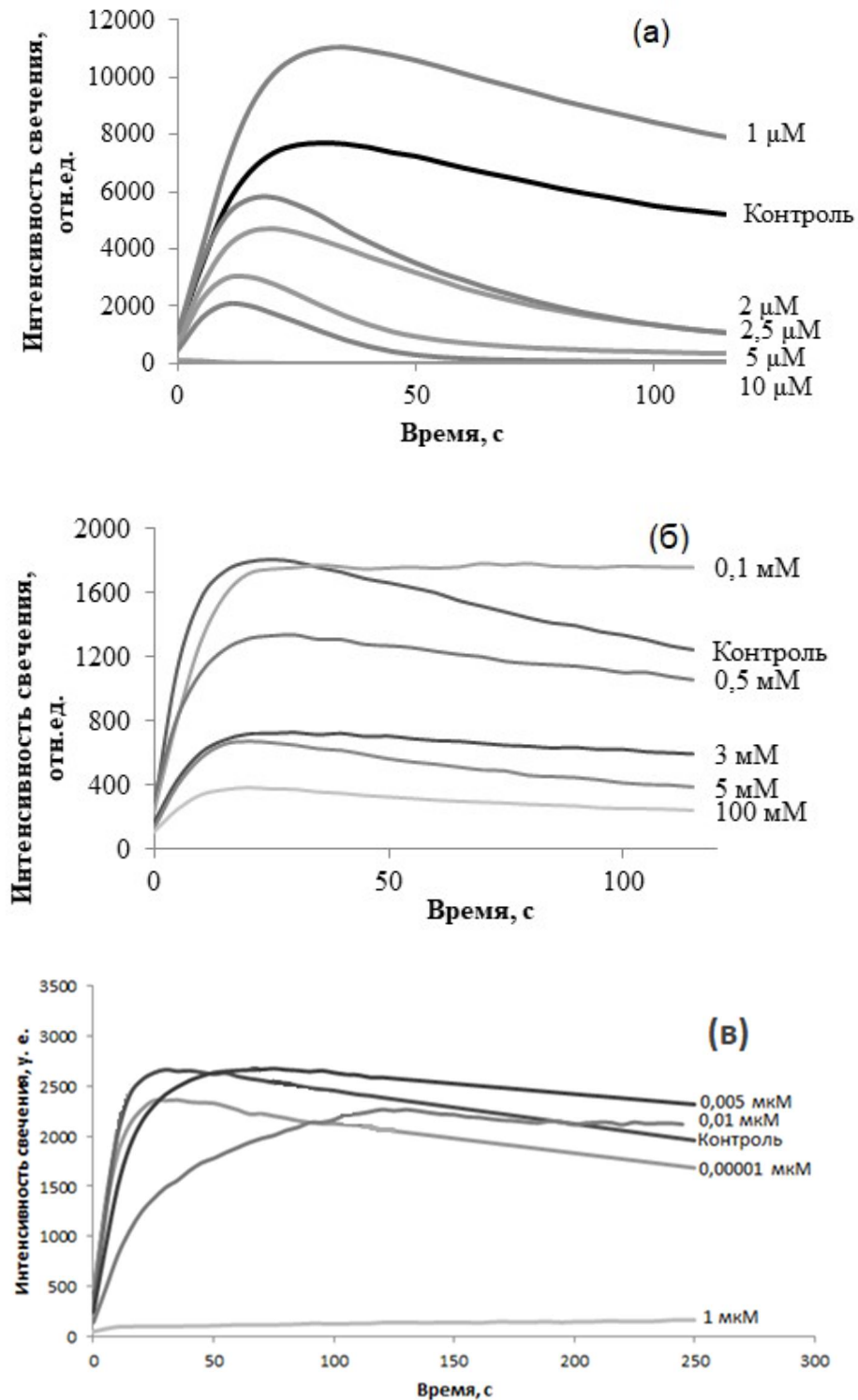


Рисунок 6.7 – Зависимость интенсивности билюминесценции МИБС, содержащего 0,1 мМ ДТТ, от времени при различных концентрациях CrCl_2 (а), пирокатехина (б) и тимохинона (в).

Видно, что при увеличении концентрации тушителя в реакционной смеси наблюдается падение максимальной интенсивности свечения для всех исследованных веществ. Оно может быть вызвано изменением эффективности восстановления FMN с участием оксидоредуктазы, а также эффективности биолюминесцентной реакции окисления FMNH₂ и альдегида с участием люциферазы. Однако следует отметить, что исследуемые вещества отличаются по эффекту, оказываемому на такие параметры биолюминесценции МИБС как скорость падения интенсивности свечения $k_{\text{сп}}$ и время выхода свечения на максимальный уровень $T_{\text{макс}}$. Показано, что добавление в реакционную смесь CrCl₃ и пирокатехина не приводит к изменению $T_{\text{макс}}$ (рис. 6.7, а, б). В то же время, при увеличении концентрации тимохинона происходит возрастание $T_{\text{макс}}$. Так, например, в том случае, когда содержание тимохинона составляет 1 мкМ, $T_{\text{макс}}$ достигает 120 с, т.е. увеличивается в 4 раза (рис. 6.7, в).

Показано, что $k_{\text{сп}}$ МИБС в реакционной смеси, содержащей растворы CrCl₃, растет с увеличением концентрации ингибитора, при добавлении пирокатехина $k_{\text{сп}}$, напротив, уменьшается, а при добавлении тимохинона – не изменяется (таблица 6.4).

Таким образом, при использовании МИБС в биотестировании важным является анализ кинетической кривой свечения реагента. По виду кривой можно предположить наличие в исследуемом образце восстановителей (например, фенолов), окислителей (например, хинонов) или солей тяжелых металлов.

Зависимость интенсивности биолюминесценции (I_i) от концентрации ингибирующего вещества (C) при малых концентрациях можно описать экспоненциальной зависимостью:

$$I_i = I_0 \cdot e^{-KC} \quad , \quad (9)$$

где K – коэффициент ингибирования вещества.

Таблица 6.4 – Значения $k_{сп}$ МИБС в присутствии растворов ингибирующих веществ

Токсическое вещество	Концентрация вещества, мМ	$k_{сп}, \text{мин}^{-1}$	
		Контроль	ДТТ
Контроль		$0,260 \pm 0,002$	$0,16 \pm 0,07$
CuSO ₄	$1 \cdot 10^{-4}$	$0,18 \pm 0,01$	$0,24 \pm 0,05$
	$5 \cdot 10^{-3}$	$0,20 \pm 0,02$	$0,17 \pm 0,02$
	0,025	$0,23 \pm 0,02$	$0,26 \pm 0,05$
	0,1	$0,66 \pm 0,05$	$0,53 \pm 0,02$
	1	$1,8 \pm 0,1$	$1,38 \pm 0,09$
Пирокагехин	$1 \cdot 10^{-4}$	$0,15 \pm 0,05$	$0,092 \pm 0,001$
	$5 \cdot 10^{-4}$	$0,11 \pm 0,04$	$0,100 \pm 0,006$
	$1 \cdot 10^{-3}$	$0,17 \pm 0,03$	$0,102 \pm 0,008$
	$3 \cdot 10^{-3}$	$0,20 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$
	$5 \cdot 10^{-3}$	$0,11 \pm 0,04$	$0,050 \pm 0,002$
	0,01	$0,18 \pm 0,03$	$0,11 \pm 0,01$
-	Концентрация, мкМ	$k_{сп}, \text{мин}^{-1}$	
		Контроль	ДТТ
Тимохинон	$1 \cdot 10^{-5}$	$0,27 \pm 0,07$	$0,16 \pm 0,01$
	$1 \cdot 10^{-3}$	$0,38 \pm 0,02$	$0,98 \pm 0,09$
	$5 \cdot 10^{-3}$	$0,24 \pm 0,05$	$0,17 \pm 0,01$
	$1 \cdot 10^{-2}$	$0,32 \pm 0,03$	$0,18 \pm 0,01$
	1	$0,28 \pm 0,02$	$0,040 \pm 0,001$
Контроль – реагент, не содержащий стабилизаторов			

Путем логарифмирования равенства (9) получаем:

$$\ln(I_i / I_0) = -K \cdot C. \quad (10)$$

Из равенства (10) можно вычислить коэффициент ингибирования K , который характеризует воздействие ингибитора на максимум интенсивности биолюминесценции. На рисунке 6.8 приведены кривые, используемые для

расчета K . В таблице 6.5 приведены рассчитанные коэффициенты ингибирования свечения МИБС веществами различных классов соединений.

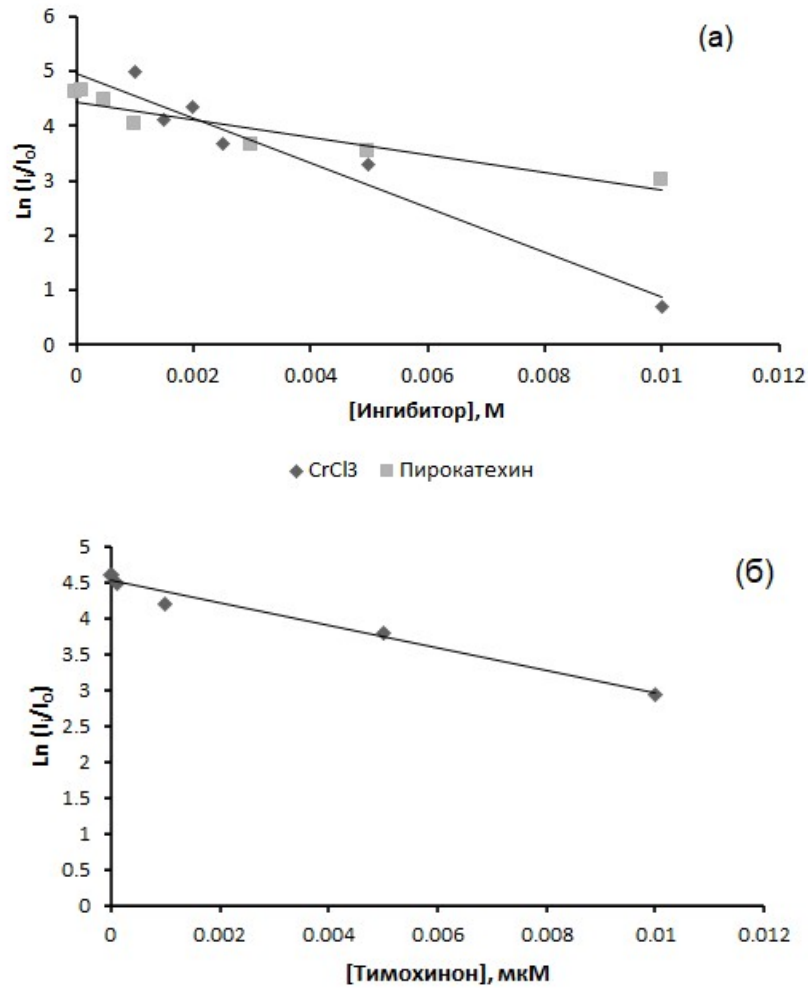


Рисунок 6.8 – Зависимость $\text{Ln}(I_i/I_0)$ от концентрации ингибитора: (а) CrCl_3 и пирокатехина, (б) тимохинона.

Для описания чувствительности МИБС к действию ингибирующих веществ, будем использовать параметр IC_{50} . Показано, что анализируемые вещества в разной степени оказывают влияние на интенсивность свечения МИБС на всем исследуемом диапазоне концентраций.

Из таблицы 6.5 видно, что 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: 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.

Таблица 6.5 – Характеристика чувствительности МИБС к действию ингибирующих соединений

Класс вещества	Действующее вещество	К, М ⁻¹		IC ₅₀ , мг/л	
		К	ДТТ	К	ДТТ
Соли	CuSO ₄ ·5H ₂ O (ПДК 1 мг/л)	1394	6,6	10	16
	CrCl ₃ ·6H ₂ O (ПДК 0,05 мг/л)	409	365	479	586
	HgCl ₂ (ПДК 500 нг/л)	520	432	0,62	0,73
Фенолы	Пирокатехин (ПДК 0,1 мг/л)	189,2	159,4	84,8	148,4
	Резорцин (ПДК 0,004 мг/л)	6,4	5,2	1760	1765
	Гидрохинон (ПДК 0,2 мг/л)	16,2	15	3,06	4,72
Хиноны	Бензохинон (ПДК 0,1 мг/л)	7·10 ⁸	7·10 ⁸	0,002	0,003
	Толухинон	8·10 ⁷	9·10 ⁷	0,00008	0,0001
	Тимохинон	3·10 ⁶	3·10 ⁶	0,00005	0,0007
	Нафтохинон (ПДК 0,25 мг/л)	5·10 ⁴	6·10 ⁴	0,001	0,0016
Контроль (К) – реагент, не содержащий стабилизаторов, ДТТ – реагент, содержащий 100 мкМ ДТТ					

Для фенолов и солей тяжелых металлов чувствительность реагента не достаточна для определения их на уровне ПДК. Такой результат объясняется различиями в механизмах ингибирования биферментной системы фенолами, хинонами и солями тяжелых металлов. Следовательно, такой параметр как максимальная интенсивность свечения (I_{макс}) не подходит для идентификации

фенолов и солей тяжелых металлов в концентрациях близких или равных уровню ПДК. Однако на примере пирокатехина (таблица 6.5) видно, что скорость падения интенсивности свечения ($k_{сп}$) в присутствии данного фенола снижается в 2 раза при концентрации 0,1 мкМ. Следовательно, используя параметр $k_{сп}$ можно выявить действие 0,01 мг/л пирокатехина, что ниже уровня ПДК в несколько раз.

Помимо этого, доказаны перспективы использования реагентов, на основе ферментов светящихся бактерий, для анализа возможной 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 NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза снижается в следующем порядке: MWCNT > SWCNT > $C_{60}HyFn$ (рис 6.9, 6.10).

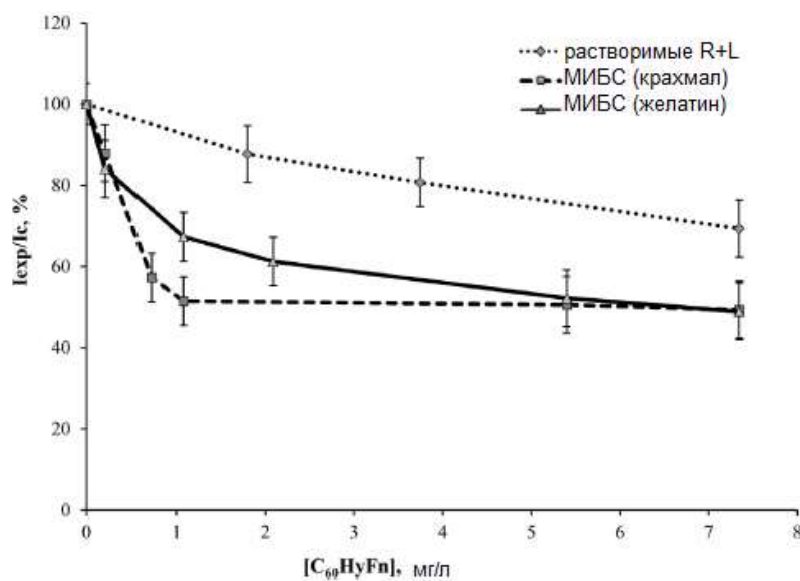


Рисунок 6.9 – Остаточная интенсивность свечения биферментной системы светящихся бактерий NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза в зависимости от концентрации $C_{60}HyFn$ [Esimbekova et al., 2017].

Растворимые ферменты обладали высокой чувствительностью к MWCNT и SWCNT со значениями параметра ингибирования IC_{50} , равными

0,012 и 0,16 мг/л соответственно. Имобилизованная ферментная система более чувствительна к $C_{60}H_{12}N_8O_2$, чем растворимая форма, с IC_{50} , равной 1,4 мг/л (рис 6.10).

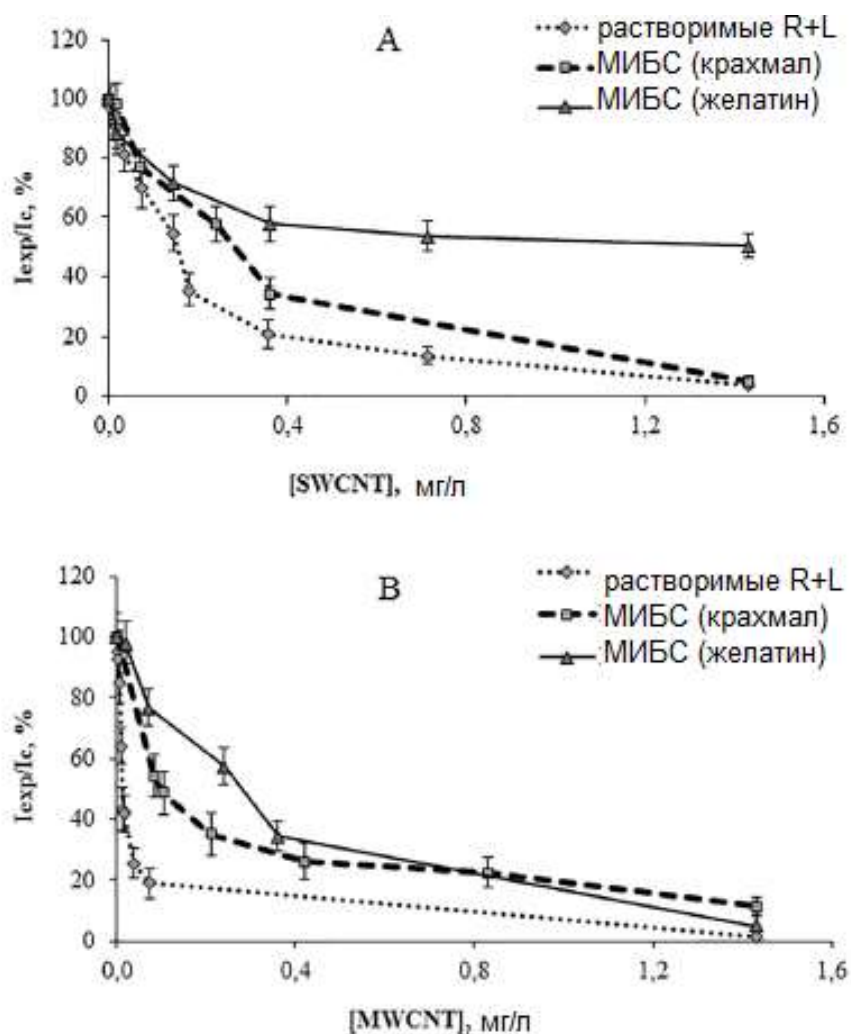


Рисунок 6.10 – Остаточная интенсивность свечения биферментной системы светящихся бактерий NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза+люцифераза в зависимости от концентрации SWCNT (A) и MWCNT (B) [Esimbekova et al., 2017].

Таким образом, в работе выбрана оптимальная концентрация стабилизатора в составе многокомпонентного иммобилизованного реагента, обеспечивающая наибольший стабилизирующий эффект, при сохранении

чувствительности к действию ингибирующих веществ различных классов (фенолы, хиноны, соли тяжелых металлов) и доказаны перспективы использования реагентов для определения токсичности наноматериалов.

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 Аррениуса 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 ΔS^\ddagger 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 (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 упрощенная 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).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые проведено сравнение процессов температурной инактивации BChE и R + L в гелеобразном окружении, создаваемом природными полимерами крахмалом и желатином. Установлено, что при воздействии повышенных температур в гелеобразной среде крахмала достигается уменьшение степеней свободы переходного состояния реакции термической денатурации отдельных мономеров как BChE, так и R + L, что объясняется сохранением макровязкости крахмальных растворов при значениях температур, превышающих индивидуальный температурный оптимум данных ферментов. 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.

Впервые исследована кинетика реакции, катализируемая VChE, в растворе крахмала и желатина. Показано, что во всех исследуемых условиях наблюдается смешанный тип ингибирования – конкурентно-неконкурентное. Сохранение типа ингибирования фермента в гелеобразной среде является крайне важным, и свидетельствует о том, что исследуемые соединения (крахмал и желатин) не существенно влияют на конформационные особенности VChE. Данный результат является фундаментальной основой для дальнейшего использования данных полимеров с целью разработки ферментных биосенсорных систем (в том числе и микрофлюидных).

В работе был получен активный и стабильный при хранении препарат, представляющий собой DTNB и VChE, совместно иммобилизованные в крахмальный гель. Данный препарат обладает оптимальной чувствительностью к действию модельных фосфорорганических соединений (малатион и пиримифосметил). Концентрация малатиона, при которой наблюдается снижение скорости ферментативного гидролиза на 50 %, составляет 8 мкг/л, что ниже уровня ПДК. Ранее было показано, что для ферментов светящихся бактерий, процесс иммобилизации не является достаточным условием получения стабильных при хранении препаратов. В настоящей работе определена оптимальная концентрация стабилизатора в составе многокомпонентного иммобилизованного реагента, обеспечивающая наибольший стабилизирующий эффект при сохранении оптимальной чувствительности R +L к действию ингибирующих веществ различных классов (фенолы, хиноны, соли тяжелых металлов). Доказаны перспективы использования реагентов для определения токсичности наноматериалов.

Таким образом, результаты, полученные в ходе выполнения настоящей работы, имеют не только фундаментальное значение, но и высокую практическую ценность.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Andreescu S. Twenty years research in cholinesterase biosensors: from basic research to practical applications / S. Andreescu, J.L. Marty // *Biomolecular engineering*. – 2006. – V. 23. – № 1. – P. 1-15.
2. Amine A. Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring / A. Amine, H. Mohammadi, I. Bourais, G. Palleschi // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2006. – V. 21. – № 8. – P. 1405-1423.
3. Appelqvist I. Starch-biopolymer interactions – a review / I. Appelqvist, M. Debet // *Food Reviews International*. – 1997. – V. 13. – № 2. – P. 163-224.
4. Bachan Upadhyay L.S. Enzyme inhibition based biosensors: A review / L.S. Bachan Upadhyay, N. Verma // *Analytical Letters*. – 2013. – V. 46. – № 2. – P. 225-241.
5. Bauman, E.K. Stabilization of serum cholinesterase in dried starch gel / E.K. Bauman, L.H. Goodson, J.R. Thomson // *Analytical biochemistry*. – 1967. – № 19. – P. 587-592.
6. Bedair H. Pesticide detection in vegetable crops using enzyme inhibition methods: a comprehensive review / H. Bedair, H.A. Rady, A.M. Hussien, M. Pandey, W. Apollon, S.S. Al Kafaas, S. Ghosh // *Food Analytical Methods*. – 2022. – P. 1-22.
7. Bezrukikh A. Gelatin and starch as stabilizers for the coupled enzyme system of luminous bacteria NADH:FMN-oxidoreductase-luciferase / A. Bezrukikh, E. Esimbekova, E. Nemtseva, V. Kratasyuk, O. Shimomura // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2014. – V. 406. – P. 5743-5747.
8. Bischof J.C. Thermal stability of proteins / J.C. Bischof, X. He // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2006. – V. 1066. – № 1. – P. 12-33.
9. Brodl E. Synthesis of α , β -unsaturated aldehydes as potential substrates for bacterial luciferases / E. Brodl, J. Ivkovic, C.R. Tabib, R. Breinbauer, P.

- Macheroux // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2017. – V. 25. – № 4. – P. 1487-1495.
10. Bromberg A. Kinetic study of thermal inactivation of cholinesterase enzymes immobilized in solid matrices / A. Bromberg, S. Marx, G. Fishman // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2008. – V. 1784. – P. 961-966.
 11. Busnel, J. P., Clegg, S. M. and Morris, E. R. in *Gums and Stabilizers for the Food Industry IV* (Eds G. O. Phillips, D. J. Wedlock and P. A. Williams), IRL Press, Oxford. – 1988. – 105 p.
 12. Busnel J. P. Interpretation of the renaturation kinetics of gelatin solutions / J.P. Busnel, E.R. Morris, S.B. Ross-Murphy // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 1989. – V. 11. – № 2. – P. 119-125.
 13. Čadež T. Assessment of four organophosphorus pesticides as inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase / T. Čadež, D. Kolić, G. Šinko, Z. Kovarik // *Scientific reports*. – 2021. – V. 11. – № 1. – P. 1-11.
 14. Campbell Z. 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. – № 26. – P. 6085-6094.
 15. Cauet G., Substrate activation and thermal denaturation kinetics of the tetrameric and the trypsin-generated monomeric forms of horse serum butyrylcholinesterase / G. Cauet, A. Friboulet, D. Thomas // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. – 1987. – V. 912. – № 3. – P. 338-342.
 16. Chatonnet A. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase/ A. Chatonnet, O. Lockrige // *Biochem. J*. – 1989. – V. 260. – P. 625–634.
 17. Cohen J.A., Oosterbaan R.A. in *Cholinesterases and Anticholinesterase Agents* (ed. Koelle, G. B.) Springer, Berlin. – 1963. – P. 299–373.
 18. Coleman M. H. The thermal inactivation of acetylcholinesterase / M.H. Coleman, D.D. Eley // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Specialized Section on Enzymological Subjects*. – 1963. – V. 67. – P. 646-657.

19. Cremllyn R. J. An Introduction to Organosulfur Chemistry. Chichester: John Wiley and Sons. – 1996.
20. De Carvalho W. Physical gelation under shear for gelatin gels / W. de Carvalho, M. Djabourov // *Rheol. Acta.* – 1997. – V. 36. – P. 591-509.
21. De Castro M.D.L. Enzyme inhibition-based biosensors and biosensing systems: questionable analytical devices / M.D.L. De Castro, M.C. Herrera // *Biosensors and Bioelectronics.* – 2003. – V. 18. – № 2-3. – P. 279-294.
22. Dickinson E. Protein-stabilized emulsions / E. Dickinson // *Water in foods.* Pergamon. – 1994. – P. 59-74.
23. Edwards J. A. Thermal inactivation of the molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase / J.A. Edwards, S. Brimijoin // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology.* – 1983. – V. 742. – № 3. – P. 509-516.
24. Ellman G.L. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity / G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, R. M. Featherstone // *Biochem. Pharmacol.* – 1961. – V. 7. – P. 88-95.
25. Eriksson H. A mechanistic model for butyrylcholinesterase / H. Eriksson, K.B. Augustinsson // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology.* – 1979. – V. 567. – № 2. – P. 161-173.
26. Esimbekova E. Bioluminescent enzymatic rapid assay of water integral toxicity / E. Esimbekova, A. Kondik, V. Kratasyuk // *Environmental Monitoring and Assessment.* – 2013. – V. 185. – № 7. – P. 5909-5916.
27. Esimbekova E. N. The Effects of commercial pesticide formulations on the function of in vitro and in vivo assay systems: a comparative analysis / E.N. Esimbekova, V.P. Kalyabina, K.V. Kopylova, V.I. Lonshakova-Mukina, A.A. Antashkevich, I.G. Torgashina, V.A. Kratasyuk // *Chemosensors.* – 2022. – V. 10. – № 8. – N 328.
28. 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.
29. Fisher A. Three-dimensional structure of bacterial luciferase from *Vibrio harveyi* at 2.4 Å resolution. / A.J. Fisher, F.M. Raushel, T.O. Baldwin, I. Rayment // *Biochemistry*. – 1995. – V. 34. – № 20. – P. 6581-6586.
30. Gatley S. J. Activities of the enantiomers of cocaine and some related compounds as substrates and inhibitors of plasma butyrylcholinesterase / S.J. Gatley // *Biochem. Pharmacol.* – 1991. – V. 41. – P. 1249–1254.
31. George M. The effect of flavin isomers and analogues upon the color of bacterial bioluminescence / M. George, J.W. Hastings // *Journal of Biological Chemistry*. – 1969. – V. 244. – № 10. – P. 2572-2576.
32. Giacobini E. in *Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors* (ed. Giacobini, E.) Martin Dunitz Ltd, London. – 2000. – P. 181–226.
33. Girard E. Butyrylcholinesterase and the control of synaptic responses in acetylcholinesterase knockout mice / E. Girard, V. Bernard, J. Minic, A. Chatonnet, E. Krejci, J. Molgó // *Life Sciences*. – 2007. – V.80. – № 24. – P. 2380-2385.
34. Gu M.B. A multi-channel continuous toxicity monitoring system using recombinant bioluminescent bacteria for classification of toxicity / M. B. Gu, G. C. Gil // *Biosensors & Bioelectronics*. – 2001. – V 16. – P. 661-666.
35. Gulnov D. Contrasting relationship between macroand microviscosity of the gelatin- and starch-based suspensions and gels / D. Gulnov, E. Nemtseva, V. Kratasyuk // *Polym. Bull.* – 2016. – V. 73. – P. 3421–3435.
36. Harel M. Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase: modeling and mutagenesis. A modelling study of the structure of BuChE / M. Harel // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. – 1992. – V. 89. – P. 10827–10831.
37. Hastings J.W. Bacterial bioluminescence / J.W. Hastings, K.H. Nealson // *Annual Reviews in Microbiology*. – 1977. – V. 31. – № 1. – P. 549-595.

38. Holowachuk E.W. Bovine serum albumin: cDNA sequence and expression / E.W. Holowachuk, J.K. Stoltenborg, R.G. Reed, T. Peters // *EMBL Data Library*. – 1991. – № 4. – P. 235-240.
39. Karczmar A. G., Usdin E. *Anticholinesterase agents*. – Pergamon Press. – 1970. – T. 1.
40. Kolosova E. M. Bioluminescent-Inhibition-Based Biosensor for Full-Profile Soil Contamination Assessment / E.M. Kolosova, O.S. Sutormin, A.A. Shpedt, L.V. Stepanova, V.A. Kratasyuk // *Biosensors*. – 2022. – V. 12 (5). – N 353.
41. 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.
42. Kratasyuk V.A. Principles of luciferase biotesting. / V.A. Kratasyuk // *In Proceedings of 9 the First Intern. School on Biological Luminescence*. – 1989.
43. Kratasyuk V.A., Esimbekova E.N. Polymer immobilized bioluminescent systems for biosensors and bioinvestigations. In: Arshady R (ed) *Introduction to polymeric biomaterials, the PBM series*. Citus Books, London. – 2003. – V. 1. – P. 301–343.
44. Kudryasheva N.S. Bioluminescence and exogenous compounds. Physico-chemical basis for bioluminescent assay / N.S. Kudryasheva // *J. Photochem. Photobiol. B*. – 2006. – V. 83. – P. 77-86.
45. Kudryasheva N.S. Nonspecific effects of exogenous compounds on bacterial bioluminescent enzymes: Fluorescence study / N.S. Kudryasheva // *Current Enzyme Inhibition*. – 2006. – V. 2. – P. 363-372.
46. Kurganov B.I. Supramolecular organization of glycolytic enzymes / B.I. Kurganov, N.P. Sugrobova, L.S. Mil'Man // *Journal of theoretical biology*. – 1985. – V. 116. – № 4. – P. 509-526.

47. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature*. – 1970. – V. 227. – P.680-685.
48. Lee W. Subunit structure of the fatty acid reductase complex from *Photobacterium phosphoreum* / W. Lee, E.A. Meighen // *Biochemistry*. – 1986. – V. 25. – № 15. – P. 4315-4321.
49. Lee J. C. Physical properties and subunit structure of butyrylcholinesterase from horse serum / J.C. Lee, J.A. Harpst // *Biochemistry*. – 1973. – V. 12. – № 8. – P. 1622-1630.
50. Li B. Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse / B. Li, J.A. Stribley, A. Ticu, W. Xie, L.M. Schopfer, P. Hammond, O. Lockridge // *J. Neurochem*. – 2000. – V. 75. – P. 1320-1331.
51. Ling G.N. The polarized multilayer theory of cell water. In: Ling GN (ed) *Life at the cell and below-cell level*, 1-st Edn. Pacific Press, New York. – 2001. – P. 74–108.
52. Lockridge O. Hydrolysis of diacetylmorphine (heroin) by human serum cholinesterase / O. Lockridge, N. Mottershaw-Jackson, H. Eckerson, B.N. La Du // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* –1980. – V. 215. – P. 1–8.
53. Lockridge O. Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase / O. Lockridge, C.F. Bartels, T.A. Vaughan, C.K. Wong, S.E. Norton, L.L. Johnson // *J. Biol. Chem.* – 1987. – V. 262. – P. 549–557.
54. Lockridge O. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses / Lockridge, O. // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2015. – V. 148. – P. 34-46.
55. 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.

56. 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.
57. 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.
58. Luan N.M. Immobilization of the soluble domain of human complement receptor 1 on agarose-encapsulated islets for the prevention of complement activation / N.M. Luan, Y. Teramura, H. Iwata // *Biomaterials*. – 2010. – V. 31. – № 34. – P. 8847-8853.
59. Makemson J.C. Bovine serum albumin interacts with bacterial luciferase / J.C. Makemson, J.W. Hastings // *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*. – 1991. – V. 6. – № 2. – P. 131-136.
60. Manoharan I. A medical health report on individuals with silent butyrylcholinesterase in the Vysya community of India / Manoharan I., Boopathy R., Darvesh S., Lockridge O. // *Clinica Chimica Acta*. – 2007. – V. 378. – № 1. – P. 128-135.
61. Masson P. Butyrylcholinesterase-catalyzed hydrolysis of aspirin, a negatively charged ester, and aspirin-related neutral esters / P. Masson, M.T. Froment, P.L. Fortier, J.E. Visicchio, C.F. Bartels, O. Lockridge // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1998. – V. 1387. – P. 41–52.
62. Masson P. Asp70 in the peripheral anionic site of human butyrylcholinesterase / P. Masson, M. T. Froment, C. F. Bartels, O. Lockridge // *Eur. J. Biochem*. – 1996. – V. 235. – P. 36–48.
63. Masson P. Interaction between the peripheral site residues of human butyrylcholinesterase, D70 and Y332, in binding and hydrolysis of substrates / P. Masson, W. Xie, M.T. Froment, V. Levitsky, P.L. Fortier, C. Albaret, O. Lockridge // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1999. – V. 1433. – P. 281–293.

64. Masson P. Role of aspartate 70 and tryptophan 82 in binding of succinylthiocholine to human butyrylcholinesterase / P. Masson, P. Legrand, C.F. Bartels, M.T. Froment, L.M. Schopfer, O. Lockridge // *Biochemistry*. – 1997. – V. 36. – № 8. – P. 2266-2277.
65. Massoulié J. Molecular forms of acetylcholinesterase / J. Massoulié, S. Bon, F. Rieger, M. Vigny // *Croatica Chemica Acta*. – 1975. – V. 47. – № 3. – P. 163-179.
66. Meighen E.A. Flavine specificity of enzyme-substrate intermediates in the bacterial bioluminescent reaction. Structural requirements of the flavine side chain / E.A. Meighen, R.E. MacKenzie // *Biochemistry*. – 1973. – V. 12. – № 8. – P. 1482-1491.
67. Mesulam M.M. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine / M. Mesulam, A. Guillozet, P. Shaw, A. Levey, E.G. Duysen, O. Lockridge // *Neuroscience*. – 2002. – V. 110. – № 4. – P. 627–639.
68. Mesulam M.M. Widely spread butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine in the normal and Alzheimer brain / M.M. Mesulam, A. Guillozet, P. Shaw, B. Quinn // *Neurobiol. Dis.* – 2002. – V. 9. – P. 88–93.
69. Millard C.B. A computer model of glycosylated human butyrylcholinesterase / C.B. Millard, C.A. Broomfield // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1992. – V. 189. – P. 1280–1286.
70. Millar D. B. High pressure stabilization of acetylcholinesterase sizeozymes against thermal denaturation / D.B. Millar, M.A. Grafius, J.R. Wild, D.A. Palmer // *Biophysical chemistry*. – 1974. – V. 2. – № 2. – P. 189-192.
71. Mionetto N. Acetylcholinesterase in organic solvents for the detection of pesticides / N. Mionetto, J.-L. Marty, I. Karube // *Biosensor application*. – 1994. – V. 9. – P. 463-470.
72. Neville L.F. Intramolecular relationships in cholinesterases revealed by oocyte expression of sitedirected and natural variants of human BCHE / L. F.

- Neville, A. Gnatt, Y. Loewenstein, S. Seidman, G. Ehrlich, H. Soreq // *EMBO J.* – 1992. – V. 11. – № 4. – P. 1641–1649.
73. Novales N.A. Comparing the effects of organic cosolvents on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity / N.A. Novales, J.P. Schwans // *Analytical Biochemistry.* – 2022. – V. 654. – P. 114796.
74. Nunes E.W. Acetylcholinesterase biosensor based on functionalized renewable carbon platform for detection of carbaryl in food / E.W. Nunes, M.K. Silva, J. Rascón, D. Leiva-Tafur, R.M. Lapa, I. Cesarino // *Biosensors.* – 2022. – V. 12. – № 7. – N 486.
75. Okabe H. New enzymatic assay of cholinesterase activity / H. Okabe, K. Sagesaka, N. Nakajima, N. Akio // *Clin. Chim. Acta.* – 1977. – V. 80. – P. 87–94.
76. Papon P., Leblond J., Meijer P.H.E. Gelation and Transitions in Biopolymers. In: *The Physics of Phase Transitions. Advanced Texts in Physics.* Springer, Berlin, Heidelberg. – 2002.
77. Pohanka, M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology / Pohanka M. // *Biomed. Pap. Med.* – 2011. – V. 155. – № 3. – P. 219-223.
78. Pohanka M. A Butyrylcholinesterase Camera Biosensor Tested for Carbofuran and Paraoxon Assay / M. Pohanka, J. Zakova // *International Journal of Analytical Chemistry.* – 2022. – V. 2022. – P. 2623155.
79. Polizzi K.M. Stability of biocatalysts / K.M. Polizzi, A.S. Bommarius, J.M. Broering, J.F. Chaparro-Riggers // *Current opinion in chemical biology.* – 2007. – V. 11. – № 2. – P. 220-225.
80. Pundir C. S. Chauhan N. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review // *Analytical Biochemistry.* – 2012. – V. 429. – № 1. – P. 19-31.
81. Radic Z. Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors / Z. Radic, N.A. Pickering, D.C. Vellom, S. Camp, P. Taylor // *Biochemistry.* – 1993. – V. 32. – P. 12074–12084.

82. Rajangam B. Progress in enzyme inhibition based detection of pesticides / B. Rajangam, D.K. Daniel, A.I. Krastanov // *Engineering in Life Sciences*. – 2018. – V. 18. – № 1. – P. 4-19.
83. Rakonczay Z. Immunochemical differences among molecular forms of acetylcholinesterase in brain and blood / Z. Rakonczay, S. Brimijoin // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. – 1985. – V. 832. – № 2. – P. 127-134.
84. Ring S.G. Some studies on starch gelation / S.G. Ring // *Starch-Stärke*. – 1985. – V. 37. – № 3. – P. 80-83.
85. Roda A. Chemiluminescent flow sensor for the determination of paraoxon and aldicarb pesticides / A. Roda, P. Rauch, E. Ferri, S. Girotti, S. Ahini, G. Carrea, R. Bovara // *Anal. Chim. Acta*. – 1994. – V. 294. – P. 35-42.
86. Rush R.S. Resolution and purification of two monomeric butyrylcholinesterases from rabbit liver / R.S. Rush // *North Carolina State University*. – 1981. – P. 935.
87. Saik J.E. Covalently immobilized platelet-derived growth factor-BB promotes angiogenesis in biomimetic poly(ethylene glycol) hydrogels / J.E. Saik, D.J. Gould, E.M. Watkins, M.E. Dickinson, J.L. West // *Acta Biomaterialia*. – 2011. – V. 7. – № 1. – P. 133-143.
88. Saxena A. Differences in active site gorge dimensions of cholinesterases revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase / A. Saxena, A.M. Redman, X. Jiang, O. Lockridge, B.P. Doctor // *Biochemistry*. – 1997. – V. 36. – P. 14642–14651.
89. Silver A. *The Biology of Cholinesterases*. Elsevier, Amsterdam. – 1974. – 576 p.
90. Singh N. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources / T. Singh, J. Singh, L. Kaur, N. Singh Sodhi, B. Singh Gill // *Food chemistry*. – 2003. – V. 81. – P. 219-231.

91. Shiao-Chun T. Activity coupling and complex formation between bacterial luciferase and flavin reductases / T. Shiao-Chun // *Photochemical & Photobiological Science*. – 2008. – V. 7. – № 2. – P. 183-188.
92. Shimomura O. Bioluminescence: chemical principles and methods / O. Shimomura // *World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.* – 2006. – P. 498.
93. Shiotsubo T. Starch gelatinization at different temperatures as measured by enzymic digestion method / T. Shiotsubo // *Agricultural and Biological Chemistry: journal*. – 1983. – V. 47. – № 11. – P. 2421-2425.
94. Sussman J.L. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein / J.L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman // *Science*. – 1991. – V. 253. – P. 872–879.
95. Soreq H. Acetylcholinesterase — new roles for an old actor / H. Soreq, S. Seidman // *Nature Rev. Neurosci.* – 2001. – V. 2. – P. 294–302.
96. Tang S. Immobilization of 3,5-dimethylphenylcarbamates of cellulose and amylose onto silica gel using (3-glycidoxypropyl)triethoxysilane as linker / S. Tang, T. Ikai, M. Tsuji, Y. Okamoto // *Journal of Separation Science*. – 2010. – V. 33. – № 9. – P. 1255-1263.
97. Tomoyasu T. Small heat shock protein AgsA: an effective stabilizer of enzyme activities / T. Tomoyasu, A. Tabata, Y. Ishikawa, R.A. Whiley, H. Nagamune // *Journal of bioscience and bioengineering*. – 2013. – V. 115. – № 1. – P. 15-19.
98. Vellom D.C. Amino acid residues controlling acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase specificity / D. C. Vellom, Z. Radic, Y. Li, N. A. Pickering, S. Camp, P. Taylor // *Biochemistry*. – 1993. – V. 32. – P. 12–17.
99. Vetrova E. A bioluminescent signal system: detection of chemical toxicants in water / E. Vetrova, E. Esimbekova, N. Rimmel, N. Beloskov, V. Kratasyuk, I. Gitelson // *Luminescence*. – 2007. – V. 22. – P. 206-214.
100. Vigny M. "Nonspecific" cholinesterase and acetylcholinesterase in rat tissues: molecular forms, structural and catalytic properties, and significance

- of the two enzyme systems / M. Vigny, V. Gisiger, J. Massoulie // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1978. – V. 75. – № 6. – P. 2588-2592.
101. Whittaker M. Cholinesterase // Monographs in human genetics. – 1986. – V. 11.
102. Woodland H. The influence of aldehyde chain length upon the relative quantum yield of the bioluminescent reaction of *Achromobacter fischeri* / H. Woodland, J. Spudich, G. Malnic // Journal of Biological Chemistry. – 1963. – V. 238. – № 9. – P. 3100-3105.
103. Xing, X. Functional consequences of site-directed mutation of conserved histidyl residues of the bacterial luciferase alpha subunit / X. Xing, X. Lei, T. Shiao-Chun // Biochemistry. – 1991. – V. 30. – № 47. – P. 11255-11262.
104. Yagüe-Guirao A. Thermal stability of molecular forms of acetylcholinesterase from muscle microsomes / A. Yagüe-Guirao, E. Munoz-Delgado, C.J. Vidal // Biochemistry international. – 1986. – V. 12. – № 5. – P. 685-692.
105. Zale S. E. Why does ribonuclease irreversibly inactivate at high temperatures? / S. E. Zale, A. M. Klibanov // Biochemistry. – 1986. – V. 25. – № 19. – P. 5432-5444.
106. Zema L. Injection molding and its application to drug delivery / L. Zema, G. Loreti, A. Melocchi, A. Maroni, A. Gazzaniga // J. Control Release. – 2012. – V. 159. – P. 324–331.
107. Zhang Q. Fluorescent determination of butyrylcholinesterase activity and its application in biological imaging and pesticide residue detection / Q. Zhang, C. Fu, X. Guo, J. Gao, P. Zhang, C. Ding // ACS sensors. – 2021. – V. 6. – № 3. – P. 1138-1146.
108. Zhou G. Aspirin Hydrolysis in Plasma Is a Variable Function of butyrylcholinesterase and platelet-activating factor acetylhydrolase 1b2 (PAFAH1b2) / Zhou G., Marathe G. K., Hartiala J., Hazen S. L., Allayee H.,

- Tang W. H. W., McIntyre, T. M. // *J. Biol. Chem.* – 2013. – V. 288. – № 17. – P. 11940-11948.
109. Zhu G.D. Genetic Testing for BCHE Variants Identifies Patients at Risk of Prolonged Neuromuscular Blockade in Response to Succinylcholine / Zhu G.D., Dawson E., Huskey A., Gordon R.J., Del Tredici A.L. // *Pharmgenomics Pers Med.* – 2020. – V. 30. – № 13. – P. 405-414.
110. Zobel H. F. Molecules to granules: a comprehensive starch review / H.F. Zobel // *Starch-Stärke.* – 1988. – V. 40. – № 2. – P. 44-50.
111. Patent 0155825 Europe, C 07 C 87/30 C 07 C 85/00 C 12 N 9/00. Novel choline derivatives / K. Katsumasa, K. Katsuhiko, T. Katsuyuki, N. Takeshi N 85301793.7 Date of filing 14.03.1985. Publication date 25.09.1985.
112. Patent 0060059 Europe. C 12 Q 1/46 Method for determining the activity of cholinesterase and diagnostic solution for use therein / K. Yasushi, A. Yoshihiro, S. Masami, H. Takahiro N 82300965.9 Date of filing 25.02.1982 Publication date 25.09.1985.
113. Patent 4596772 United States, C12Q 1/48 435/15. Reagent for assaying cholinesterase / S. Kamei, K. Tomita, Y. Hashimoto, N. Inagaki Unitika Ltd N 57-39654 Date of filing 14.03.1983, Publication date 24.06.1986.
114. Patent 5807671 United States. G01N 33/53 435/6 Method of screening for genetic predisposition to anticholinesterase therapy / H. Soreq, H. Zakut Yissum. Research Development Company of Hebrew University of Jerusalem Date of filing 9.06.1995. Publication date 09.15.1998.
115. Брагинский Л.П. Методы биоиндикации и биотестирования природных вод // Л.П. Брагинский, А.Н. Крайнюкова. Л.: Гидрометеоиздат. – 1989. – 263 с.
116. Будников Г.К. Экспресс-тестовые методы определения ингибиторов гидролитических ферментов с помощью электрохимических биосенсоров / Г.К. Будников, Г.А. Евтюгин // *Российский химический журнал.* – 2001. – Т. XLV. – № 4. – С. 86-94.

117. Будников Г.К. Сравнительная оценка электрохимических биосенсоров для определения ингибиторов - загрязнителей окружающей среды / Г.К. Будников, Г.А. Евтюгин, Е.П. Ризаева, А.Н. Иванов, В.З. Латыпова // Журнал аналитической химии, 1999. – Т. 54. – № 9. – С.973-982.
118. Бресткин А.П., Кузнецова А.П., Моралев С.Н., Розенгарт Е.В., Эпштейн Л.М. Холинэстеразы наземных животных и гидробионтов. Владивосток: ГИНРО. – 1997.
119. Бресткин А.П. Влияние природы субстрата, этанола и фосфатного буфера на торможение бутирилхолинэстеразного гидролиза обратимыми ингибиторами / А.П. Бресткин, Л.П. Кузнецова, Е.Б. Никольская // Украинский биохимический журнал. – 1991. – Т.63. – № 5. – С. 51-57.
120. Гиль Т.А. Гашение люминесценции светящихся бактерий как тест для оценки токсичности фенольных компонентов стоков / Т.А. Гиль, А.Э. Балаян, Д.И. Стом // Микробиология. – 1983. – Т.52. – № 6. – С. 1014–1016.
121. Гиль Т.А. Элиминирование хинонов из водных сред фенолами и влияние их смесей на люминесценцию бактерий *Vibrio harvey* / Т.А. Гиль, В.И. Нечаева А.Э. Балаян, Г.В. Шахова // Биолог. науки: МГУ. – 1985. – № 1. – С. 58 – 62.
122. Деева, А.А. Вариабельность структуры люцифераз и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаз светящихся бактерий: филогенетический анализ аминокислотных последовательностей и молекулярное моделирование. [Текст]: дис. ... канд. физ.-мат. наук: 03.01.02: защищена 13.12.18: утв. 25.05.12 / Деева Анна Андреевна. - Место защиты: ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук»], 2018. - 159 с.

123. Дементьева Е.И. Инактивация люциферазы светляков *Luciola mingrelica* гуанидинхлоридом и её реактивация / Е.И. Дементьева, Л.Г. Малошенок, Н.Н. Угарова // Вестник Московского университета. – 2000. – Сер. 2. – Т.41. – № 6. – С. 366-370.
124. Дерябин Д.Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты // Д.Г. Дерябин. М.: Наука, 2009. – 246 с.
125. Диунов А.Г. Качество природных вод реки Волги в пределах города Ярославля по данным биотестирования / А.Г. Диунов, Г.П. Жариков, А.В. Павлов, Г.Е. Сабуров; Яросл. мед. ин-т. – Ярославль, 1993. – 8 с.
126. Евтюгин Г.А. Электрохимические биосенсоры на основе холинэстеразы для группового определения токсикантов и диагностики загрязнения объектов окружающей среды: дис. ... док. хим. наук: 02.00.02. – Саратов, 1999. – 401 С.
127. Евтюгин Г.А. Экспресс-оценка качества вод с помощью иммобилизованной холинэстеразы. / Г.А. Евтюгин, В.У. Смирнова, Ю.В.Рыдванский, Л.Н.Пунегова, Г.А.Марченко // В кн. Эколого-токсикологическая характеристика г. Казани и пригородной зоны. Казань, Изд-во КГУ: 1991. – С.126-131.
128. Егорова Т.А. Основы биотехнологии: учеб. пособие для Высш. Пед. Учеб. Заведений / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. – М.: Издательский центр «Академия». – 2003. – 208 с.
129. Есимбекова Е.Н. Исследование чувствительности трехферментных систем с бактериальной люциферазой при биотестировании водных экосистем: Автореф. дис. ... канд. биолог.наук / Е.Н. Есимбекова. – Красноярск, 2000. – С. 17.
130. Есимбекова, Е.Н. Исследование влияния гелевого окружения на активность биферментной системы светящихся бактерий NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза / Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк, И.Г.

- Торгашина // Материалы III-го Съезда биофизиков России. – 2004. – С. 33-34.
131. Есимбекова, Е.Н. Имобилизованный реагент на основе биферментной системы светящихся бактерий NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза / Е.Н. Есимбекова, В.А. Кратасюк, И.Г. Торгашина // Материалы IV съезда фотобиологов. – 2005. – С. 44-45.
132. Есимбекова Е.Н. Сравнение иммобилизованной и растворимой биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза / Е.Н. Есимбекова, И.Г. Торгашина, В.А. Кратасюк // Биохимия. – 2009. – Т. 74. – Вып. 6. – С. 853-859.
133. 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. – 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. – Т. 491. – №1. – P. 43-46.)
134. 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. – Т. 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. – Springer Nature BV. – 2015. – Т. 461. – № 1. – P. 102.)
135. Кратасюк В.А. Билюминесцентный микроанализ на основе бактериальной люциферазы и светящихся бактерий / В.А. Кратасюк, С.Е. Медведева, Н.С. Кудряшева, Е.Н. Есимбекова // Очерки экологической биофизики, отв. ред. Т.Г. Волова, Новосибирск: изд-во СО РАН. – 2003. – С.174-186.

136. Кудряшева Н.С. Физико–химические основы биолюминесцентного анализа / Н.С. Кудряшева, В.А. Кратасюк, Е.Н. Есимбекова; Краснояр. гос. ун–т. – Красноярск, 2002. – 154 с.
137. Кудряшева Н.С. Действие солей металлов на бактериальные биолюминесцентные системы различной сложности / Н.С. Кудряшева, Е.В. Зюзикова, Т.В. Гутник, А.М. Кузнецов // Биофизика. – 1996. – Т. 41. – Вып. 6. – С. 853 – 859.
138. Кудряшева Н.С. Закономерности ингибирования биолюминесцентной реакции хинонами и фенолами – компонентами сточных вод / Н.С. Кудряшева, Е.В. Шалаева, Е.Н. Задорожная, В.А. Кратасюк, А.Э. Балаян, Д.И. Стом // Биофизика. – 1994. – Т. 39. – № 3. – С. 455-464.
139. Кузнецова Л.П. Влияние солевого состава среды и этанола на холинэстеразный гидролиз некоторых субстратов / Л.П. Кузнецова, Е.Б. Никольская // Украинский биохимический журнал. – 1988. – Т.60. – № 4. – С. 35-40.
140. 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. (Kolossova E. M. Set of enzymatic bioassays for assessment of soil contamination / E.M. Kolossova, O.S. Sutormin, E.N. Esimbekova, V.I. Lonshakova-Mukina, V.A. Kratasyuk // Doklady Biological Sciences. – 2019. – Т. 489. – № 1. – P. 165-168.)
141. Ломакина Г. Ю. Повышение термостабильности люциферазы светляков *Luciola mingrelica* сайт-направленным мутагенезом неконсервативных остатков / Г.Ю. Ломакина, Ю.А. Модестова, Н.Н. Угарова // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. – 2008. – Т. 49. – № 2. – С. 81-85.
142. 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.)
143. Лундовских И.А. Кинетика и механизм термоинактивации рекомбинантной люциферазы светляков *Luciolamingrelica* / И.А. Лундовских, Е.И. Дементьева, Н.Н. Угарова // Вестник Московского Университета. – 2000. – Сер.2. – Т.41. – № 6. – С. 362-366.
144. Малыгин В.В. Моделирование связи структуры о-фосфорилированных оксимов с их антихолинэстеразной активностью и селективностью с помощью метода анализа топологии молекулярного поля (MFTA) / В.В. Малыгин, Е.В. Радченко, Г.Ф. Махаева, В.Б. Соколов, В.А. Палюлин, Н.С. Зефиоров // Доклады Академии наук. – 2008. – Т 418. – № 6. – С. 837-841.
145. Массон П. Кинетические особенности реакций, катализируемых холинэстеразами / П. Массон // Биохимия. – 2012. – Т. 77. – № 10. – С. 1383-1400.
146. Медянцева Э.П. Ферментный электрод на основе иммобилизованной холинэстеразы / Э.П. Медянцева, Г.К. Будников, С.С. Бабкина // Журнал аналитической химии. – 1990. – Т. 45. – № 7. – С. 1386-1389.
147. Мороз, Н. А. Стабилизация АТФ-реагентов, содержащих люциферазу светляков *L. mingrelica*, в присутствии полоиолов / Н. А. Мороз, Д. Я. Гурский, Н. Н. Угарова // Вестник Московского Университета. Сер. 2. – 2008. – Т. 49. – № 2. – С. 86-90.
148. Никольская Е.Б. Применение холинэстераз в аналитической химии / Е.Б. Никольская, Г.А. Евтюгин // Журнал аналитической химии. – 1992. – Т.47. – № 8. – С. 1358-1377.

149. Петушков В.Н. Биферментная система NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза из светящихся бактерий / В.Н. Петушков, Г.А. Кратасюк, Н.С. Родионова, А.М. Фиш, П.И. Белобров // Биохимия. – 1984. – Т.49. – Вып.4. – С. 692-702.
150. Романова Н.А. Билюминесцентное определение аденозин-5'-трифосфата, вытекающего из клеток дрожжей при их фотодинамическом повреждении / Н.А. Романова, Е.В. Пометун, А.П. Савицкий, Н.Н. Угарова // Вестник Московского Университета. – 2000. – Т. 41. – № 6. – С. 404-407.
151. Старостина В.К. Холинэстераза: методы анализа и диагностическое значение: информационно-методическое пособие / В.К. Старостина, С.А. Дёгтева // Новосибирск: Вектор-Бест. – 2008. – Т. 35. – С. 36.
152. Старостина В.К. Холинэстераза: диагностическое значение и методы анализа / В.К. Старостина, С.А. Дегтева // Поликлиника. – 2010. – Т. 3. – С. 26.
153. Строганов Н.С. Теоретические проблемы водной токсикологии. Норма и патология // Н.С. Строганов. М.: Наука, 1983. – 183 с.
154. Шеховцова Т.Н. Ферменты: их использование в химическом анализе / Т.Н. Шеховцова // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т 6. – № 1. – С. 44-48.
155. Ягофаров, Д.Ш. Физико-химические свойства картофельного крахмала / Д.Ш. Ягофаров, А.В. Канарский, Ю.Д. Сидоров, М.А. Поливанов // Вестник Казанского технологического университета. – 2002. – Т. 15. – № 12. – С. 212-215.
156. Патент РФ 2153675. Способ определения активности холинэстеразы крови / Э.Т. Гайнуллина, В.И. Искалин, В.А. Пашинин, И.В. Рыбальченко, В.Ф. Таранченко; заявители и патентообладатели ВУРХиБЗ № 98110717/14; заявл. 08.06.1998; опубл. 27.07.2000, Бюл. № 5. 4 с.

157. Патент РФ 2420594. Реагент для определения аденозин-5'-трифосфата / Н.Н. Угарова, М.И. Кошкарров, Г.Ю. Ломакина; заявители и патентообладатели Москва. МУГ. № 2009118840/10; заявл. 20.05.2009; опубл. 10.06.2011, Бюл. № 16. 17с.
158. Технические условия 2639-001-93879568-2009 «Реагент «Энзимоллюм», зарегистрированы 25.12.2009 за № 003534.