

Сутормин Олег Сергеевич

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

Специальность: 03.01.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Красноярск – 2021

Работа выполнена на кафедре биофизики Института фундаментальной биологии и биотехнологии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский федеральный университет», г. Красноярск.

Научный руководитель: **Кратасюк Валентина Александровна**, доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Исмаилов Анвар Джураевич**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии и биохимии кафедры микробиологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»
Камнев Александр Анатольевич, доктор химических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии ФГБУН «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов» Российской академии наук

Ведущая организация: федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Южный федеральный университет»

Защита диссертации состоится «___» _____ 2021 года в ___ часов ___ минут на заседании Диссертационного совета Д 002.039.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук по адресу: 119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, Ленинский проспект, д. 38, и на сайте https://biochemphysics.ru/assets/upload/documents/documents2/Dissertaciya_Sutormin.pdf

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
Д 002.039.01, кандидат химических наук



Л.И. Мазалецкая

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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

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

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

фрагментов метаболических систем в вязком микроокружении для создания модели функционирования ферментов в гиалоплазме.

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

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

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

2. Оценить закономерности влияния вязкости реакционной среды на термостабильность цепей сопряжения ферментов с бактериальной люциферазой для выявления условий эффективного взаимодействия ферментов в биферментной (НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза) и триферментной (лактатдегидрогеназа + НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза) системах.

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

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

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

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

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Показано, что кинетические и термодинамические характеристики биферментной (НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза) и триферментной (лактатдегидрогеназа + НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза) систем зависят от вязкости реакционной среды, созданной водными растворами глицерина и сахарозы, и длины цепи сопряжения.
2. Увеличение термостабильности ферментативных систем, сопряженных с бактериальной люциферазой, может являться интегральным критерием оценки эффективности их кооперации.
3. Показано, что чувствительность биолюминесцентных ферментативных биотестов к почвенным токсикантам и наноматериалам зависит от количества ферментов в тест-объекте.

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

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

Апробация работы. Основные положения и выводы диссертации были представлены на: Международной онлайн конференции «Устойчивое развитие после COVID-19: экологические

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

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

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

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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении представлена актуальность проблемы, обоснованы цели и задачи, определена научная и практическая новизна проведенного научного исследования.

В главе 1 представлен обзор современных концепций и методов исследования функционирования ферментов при переходе от экспериментов *in vitro* к моделированию условий метаболических взаимодействий *in vivo*, показывающих, что положения классической

биохимии о функционировании ферментативных реакций, полученные в условиях *in vitro*, некорректно отражают метаболические процессы во внутриклеточных условиях клетки. Описаны современные подходы к экспериментальному моделированию внутриклеточной среды с использованием различных агентов краудинга или осмолитов для создания эффектов внутриклеточного окружения — исключенного объема или изменения вязкости реакционной среды. На основе существующих и подтвержденных экспериментальных моделей и гипотез приводится подробная информация о чувствительности моноферментных систем к изменению величины вязкости реакционной среды. Особое внимание уделено информации о влиянии вязкости реакционной среды на энергетические составляющие ферментативного катализа. Обсуждается возможность использования ферментов светящихся бактерий и сопряженных с люциферазой ферментативных реакций в качестве модельных систем для конструирования и исследования функционирования полиферментных систем в вязких средах, имитирующих внутриклеточную гиалоплазму.

Глава 2 диссертации посвящена описанию материалов, аппаратуры и методов. В работе использовали: лиофилизированный препарат высокоочищенных ферментов, входящий в комплект реактивов аналитической биолюминесценции (КРАБ) (Институт биофизики, ФИЦ КНЦ СО РАН «Красноярский научный центр СО РАН», Россия), содержащий 0,5 мг люциферазы (Л) ЕС 1.14.14.3 из рекомбинантного штамма *Escherichia coli* (*Photobacterium leiognathi*) и 0,15 ед. активности НАДН:ФМН-оксидоредуктазы (Р) ЕС 1.5.1.29 (*Vibrio fischeri*); препарат L-лактатдегидрогеназы из мышц кролика (ЛДГ, тип XI, Sigma Aldrich), НАДН (AppliChem), ФМН (Serva), тетрадеканаль (C₁₄) (Merck), НАД⁺ (AppliChem); DL-лактат (Sigma Aldrich), 0,05М калий-фосфатный буфер pH 6,9.

Активность биферментной системы Р + Л измеряли в реакционной смеси, содержащей 300 мкл буфера pH 6,9; 5 мкл раствора препарата ферментов Р + Л (пенициллиновый флакон содержащий КРАБ растворяли в 5 мл калий-фосфатного буфера pH 6,9); 50 мкл 0,0025 % раствора C₁₄ в буфере; 50 мкл 0,4 мМ раствора НАДН в буфере; 10 мкл 0,5 мМ раствора ФМН в дН₂О. В кювету вносили последовательно все компоненты реакционной смеси, быстро перемешивали, помещали кювету в люминометр (Termer BioSystems, США) и регистрировали величину максимальной интенсивности свечения (I_м). Реакцию свечения инициировали добавлением раствора ФМН.

Активность триферментной системы ЛДГ + Р + Л измеряли в реакционной смеси следующего состава: 300 мкл 0,05 М буфера pH 6,9; 5 мкл раствора ЛДГ (0,5 мг ЛДГ растворяли в 1 мл калий-фосфатного буфера pH 6,9); 10 мкл раствора Р + Л; 50 мкл 0,0025 % раствора C₁₄ в 0,05 М калий-фосфатном буфере pH 6,9; 50 мкл 15 мМ раствора лактата в дН₂О; 10 мкл 0,5 мМ раствора ФМН в дН₂О; 50 мкл 0,5 мМ раствора НАД⁺. В кювету вносили

последовательно все компоненты реакционной смеси, быстро перемешивали, помещали кювету в люминометр (Turner BioSystems, США) и регистрировали величину максимальной интенсивности свечения (I_m). Реакцию инициировали добавлением раствора НАД⁺.

Кинетические и термодинамические параметры ферментативных систем измеряли при добавлении в реакционную среду глицерина и сахарозы в концентрациях от 5 до 50 об. %. О влиянии вязкости реакционной среды на исследуемые ферментативные системы судили по: величине остаточной интенсивности свечения ферментативной системы ($I_{\text{остаточное}} = (I_{\text{экс}}/I_k) \cdot 100\%$, где $I_{\text{экс}}$ – величина интенсивности свечения ферментативной системы в присутствии глицерина/сахарозы; I_k – величина интенсивности свечения ферментативной системы в присутствии буферного раствора); по величине константы спада светоизлучения ($k_{\text{dec}} = (\ln I_{80} - \ln I_{20})/\Delta t$); и по величине общего количества высвеченных квантов света ($Q = I_m/k_{\text{dec}}$) [5,17].

Значения энергии термоинактивации сопряженных полиферментных систем с люциферазой определяли графически способом (в координатах $\ln k_{\text{dec}}$ от $1/T$, где $\ln k_{\text{dec}}$ – логарифм константы спада биолюминесценции при определенной температуре, T – заданная температура, выраженная в кельвинах) [17].

Спектры флуоресценции ферментов регистрировали на сканирующем спектрометре Aminco-Bowman Series 2 (Thermo Spectronic, США) с шириной щели 2–4 нм в диапазоне длин волн 300–500 нм, длина волны возбуждения 295 нм.

Методология оценки термодинамической кооперации ферментов в исследуемых ферментативных системах была основана на оценки изменения термостабильности системы и величины энергии активации ферментативной реакции в присутствии вязких агентов [6-7].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ EXCEL («Microsoft», США) и Origin 8 («OriginLab Corporation», США), а также управляющей программы спектрофотометра Amino-Bowman Series 2. Ошибка экспериментов не превышала 15%.

В главе 3 представлены результаты экспериментального изучения изменений кинетических параметров Р + Л системы в присутствии различных значений вязкости реакционной среды, созданных добавлением водных растворов глицерина и сахарозы. На рисунке 3.1. представлена временная кинетика изменения интенсивности свечения биферментной системы в буфере и при значениях вязкости реакционной среды 1,26 и 1,31 сП, которые имитировались добавлением 10% сахарозы и 10% глицерина соответственно.

Из рисунка 3.1. видно, что при моделировании значения вязкости реакционной среды $\eta = 1,26$ сП водным раствором 10% сахарозы, происходит значительное изменение профиля кинетики биферментной Р + Л системы. В то время как при вязкости реакционной среды $\eta =$

1,31 сП, созданной водно-глицериновым раствором, существенного изменения профиля кинетики ферментативной Р + Л системы не происходит.

В дополнение, следует отметить, что величина I_M в биферментной системе зависит от вязкости реакционной среды так, что чем выше значение вязкости реакционной среды, тем меньше значение I_M . Например, при вязкости реакционной среды $\eta = 6$ сП, моделируемой водно-глицериновым раствором, величина I_M биферментной Р + Л системы составляла 17% от величины I_M зарегистрированной в буфере. В присутствии вязкости реакционной среды $\eta = 6,20$ сП, моделируемой водным раствором сахарозы, величина I_M биферментной Р + Л системы составляла 36% относительно величины I_M в буферном растворе.

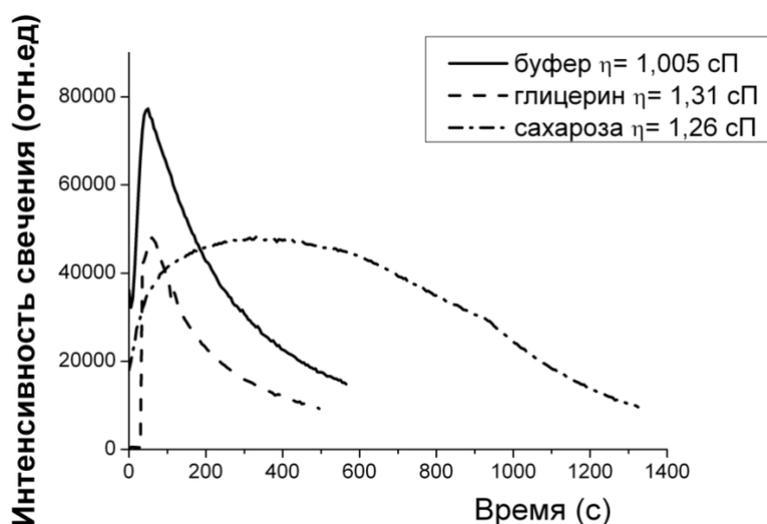


Рисунок 3.1. – Зависимость динамики интенсивности свечения биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза от времени в буферном растворе и при значениях вязкости реакционной смеси $\eta = 1,26$ сП и $\eta = 1,31$ сП при $t=20^\circ\text{C}$.

Таким образом, добавление водно-глицериновых растворов, для изменения вязкости реакционной среды, в наибольшей степени приводит к уменьшению величины I_M по сравнению с водно-сахарозными растворами, но при этом водно-глицериновые растворы существенно не изменяют кинетический профиль биферментной системы Р + Л (рисунок 3.1). Поэтому величина I_M не может быть использована в качестве информативного параметра при исследовании влияния вязкости среды больше 3,2 сП, которая имитируется добавлением сахарозы, на кинетические характеристики ферментативной Р + Л системы, из-за невозможности определить какой фактор обладает наибольшим воздействием на I_M – природа используемого агента или вязкость реакционной среды. Ранее было показано, что чем больше

значения вязкости реакционной среды, тем меньше каталитическая активность ферментативной системы [5-7].

На рисунке 3.2. показано влияние водных растворов глицерина и сахарозы на величину константы спада свечения (k_{dec}) (рисунок 3.2.а) и общий выход квантов света (Q) (рисунок 3.2.б) биферментной системы Р + Л. На графике видно, что с увеличением вязкости микроокружения Р + Л системы, путем добавления водно-глицериновых растворов, величина k_{dec} монотонно увеличивается, при достижении значения вязкости реакционной среды $\eta = 6$ сП величина k_{dec} увеличивается в 2 раза по сравнению с контролем. Для водно-сахарозных растворов такого эффекта не наблюдается. Вероятнее всего, такое существенное изменение величины k_{dec} , при использовании водно-глицериновых растворов, в качестве агента имитируемого значения вязкости реакционной среды, можно объяснить негативным влиянием вязкости микроокружения на скорость диффузии субстратов и высвобождения продукта реакции из активного центра фермента путем ограничения его структурной подвижности [5].

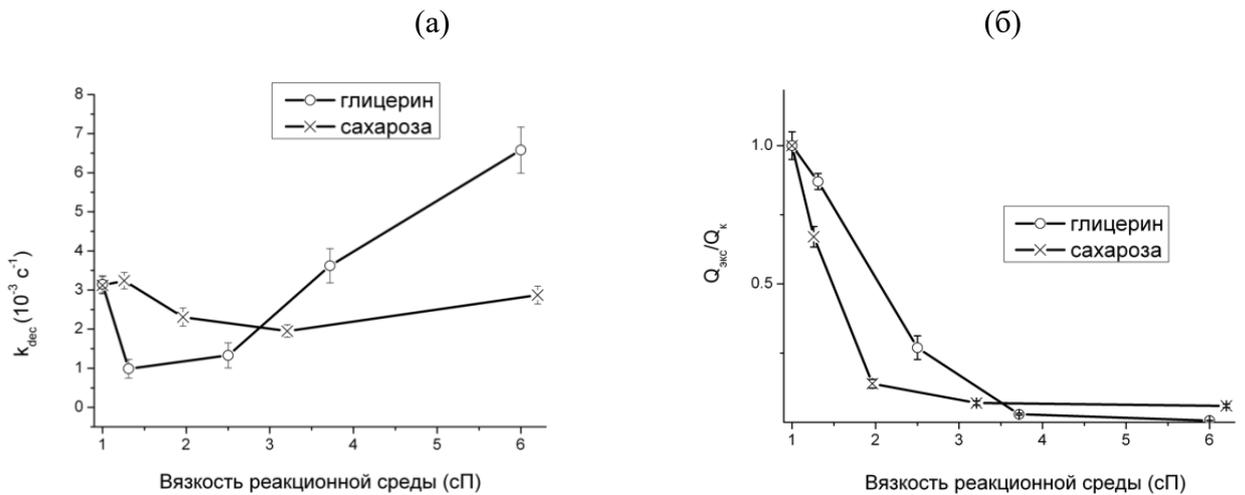


Рисунок 3.2. – Зависимость константы спада светоизлучения (а) и общего количества высвеченных квантов света (б) биферментной Р + Л системы от вязкости реакционной среды при $t=20^{\circ}\text{C}$.

В свою очередь, вязкость реакционной среды, имитируемая добавлением водно-сахарозных растворов, не приводит к существенному изменению величины k_{dec} биферментной системы. В диапазоне значений вязкости реакционной среды от 1,26 до 6,2 сП наблюдаются некоторые флуктуации величины k_{dec} биферментной системы, но при достижении вязкости реакционной среды $\eta = 6,2$ сП величина k_{dec} системы Р + Л соответствует контрольным значениям. Исходя из этого можно предположить, что наблюдаемые эффекты влияния водно-сахарозных растворов на кинетические характеристики системы Р + Л зависят от природы используемого агента, а не от вязкостных характеристик имитируемого сахарозой микроокружения.

Величина общего числа излученных квантов (Q) в биферментной системе $P + L$ не является информативным параметром для изучения влияния вязкости реакционной среды на кинетические характеристики биферментной системы. По полученным зависимостям (рисунок 3.2.б.) сложно определить доминирующий фактор, который существенным образом влияет на изменение величины Q биферментной системы $P + L$ – природа модельного агента или вязкость реакционной среды.

Проведенные исследования показывают, что система $P + L$ проявляет активность в исследованном диапазоне вязкости реакционной среды от 1,0 до 6,2 сП. При этом глицерин является наиболее предпочтительным осмолитом для моделирования эффектов вязкости реакционной среды в биферментной системе. В дополнение, величины I_m и k_{dec} также являются информативными параметрами системы $P + L$, по которым можно судить о степени влияния вязкости реакционной среды, создаваемой водными растворами глицерина. В случае использования сахарозы, в качестве эффектора вязкости реакционной среды, высока вероятность неправильной интерпретации получаемых результатов из-за возможного большего влияния природы агента.

Далее было изучено влияние вязкого микроокружения на триферментную систему ЛДГ + $P + L$. Ранее было показано, что ЛДГ + $P + L$ система имеет высокую чувствительность при анализе метаболитов [16]. На рисунке 3.3. представлена динамика интенсивности свечения системы ЛДГ + $P + L$ во времени в буфере и в вязком микроокружении средах, имитируемым растворами сахарозы и глицерина.

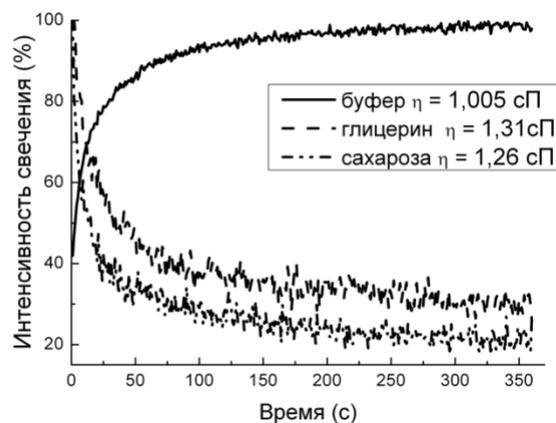


Рисунок 3.3. – Динамика интенсивности свечения триферментной ЛДГ + $P + L$ системы от вязкости реакционной среды при $t=20^\circ\text{C}$ во времени в буфере и в вязких средах, созданных растворами сахарозы и глицерина.

Видно, что изменение вязкости реакционной среды существенно изменяет динамику свечения триферментной системы по сравнению с контрольным свечением. Стоит отметить, что подобные зависимости влияния вязкости реакционной среды на кинетическую активность

триферментной системы были получены во всем исследованном диапазоне значений вязкостей реакционной среды (от $\eta = 1,26$ сП до $\eta = 6,2$ сП). Следовательно, можно сделать вывод об ингибирующем влиянии вязкости реакционной среды на интенсивность свечения триферментной ЛДГ + Р + Л системы, при этом степень ингибирующего воздействия глицерина и сахарозы, которыми моделируются вязкостные эффекты реакционной среды, практически одинакова, что говорит о том, что система чувствительна именно к изменению вязкости реакционной среды и не зависит от природы используемых осмолитов.

Зависимость величины k_{dec} для ЛДГ + Р + Л системы от вязкости реакционной среды (рисунок 3.4.а.) имеет сходную зависимость, полученную для Р + Л системы (рисунок 3.2.а.). При добавлении в реакционную среду водно-глицериновых растворов, величина k_{dec} для триферментной системы ЛДГ + Р + Л монотонно увеличивается с увеличением вязкости микроокружения, при $\eta = 6$ сП величина k_{dec} увеличивается в 1,2 раза по сравнению с k_{dec} в контроле. Вероятно, такую зависимость можно также объяснить негативным влиянием вязкости микроокружения на скорость диффузии субстратов и высвобождения продукта реакции из активного центра фермента путем ограничения его структурной подвижности [1,5].

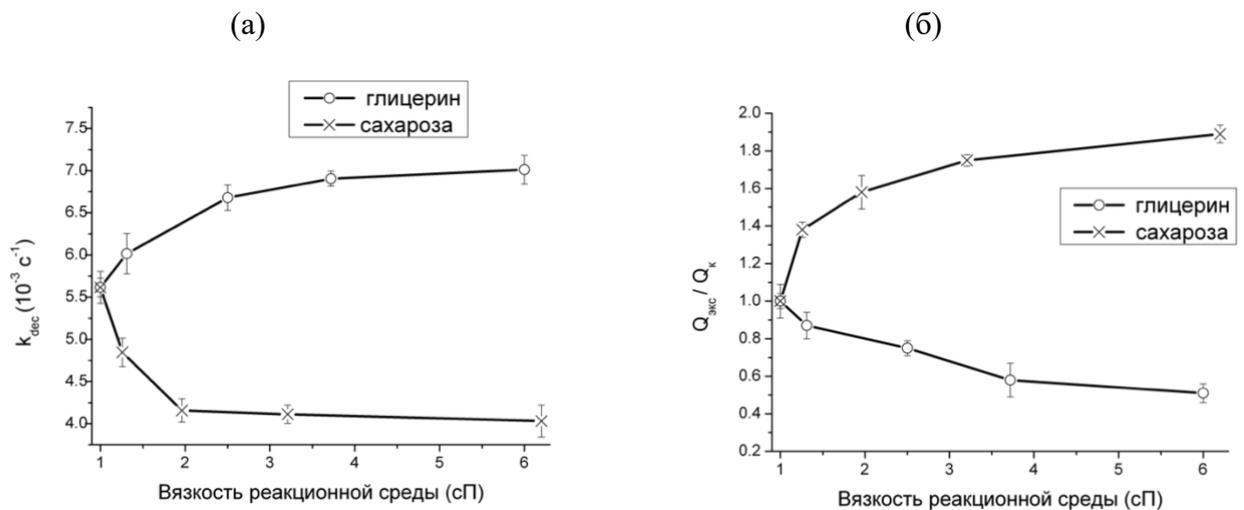


Рисунок 3.4. — Зависимость величины константы спада свечения (k_{dec}) (а) и общего количества квантов света (Q) (б) для триферментной ЛДГ + Р + Л системы от вязкости микроокружения при $t=20^\circ\text{C}$.

В свою очередь, вязкость реакционной среды, создаваемая добавлением в систему водно-сахарозных растворов, приводит к уменьшению величины k_{dec} триферментной ЛДГ + Р + Л системы. Например, величины вязкости реакционной среды ($\eta = 6,2$ сП) величина k_{dec} для ЛДГ + Р + Л системы в 0,7 раз меньше контрольных значений. Исходя из этого можно сделать вывод, что наблюдаемые процессы влияния водно-сахарозных растворов на кинетические характеристики ЛДГ + Р + Л системы связаны с действием природы используемого вязкого агента на ферменты, а не с вязкостными характеристиками микроокружения. Такой вывод

делается на основании того, что при увеличении вязкости реакционной среды за счёт использования водно-сахарозных смесей должны изменяться скорости диффузионных процессов [9] и, следовательно, увеличиваться константа спада триферментной системы, как в случае для водно-глицериновой среды.

Величина общего количества квантов света (Q) в триферментной системе ЛДГ + Р+ Л, на первый взгляд, зависит от химической природы используемых осмолитов. Так, в водно-глицериновых средах величина Q уменьшается, а при использовании водно-сахарозных растворов увеличивается (рисунок 3.4.б.). В связи с тем, что при расчете величины Q используется величина k_{dec} , можно предположить, что величина Q также не является информативным параметром, по которому можно судить о степени воздействия вязкого микроокружения в триферментной системе.

Уменьшение каталитической активности ЛДГ + Р + Л системы при варьировании вязкости реакционной среды, вероятно, связано с высокой чувствительностью ЛДГ к вязкому микроокружению [18]. При этом следует отметить, что интересным и требующим дальнейшего исследования является тот факт, что активность ЛДГ напрямую зависела от добавляемой концентрации глицерина или сахарозы [18]. В нашем случае, подобной концентрационной зависимости между вязкостью реакционной среды и каталитической активностью триферментной системы ЛДГ + Р + Л выявлено не было.

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

Глава 4 посвящена исследованию температурной стабильности сконструированных биферментной и триферментной систем в присутствии глицерина и сахарозы, имитирующих вязкостные характеристики гиалоплазмы.

Температурная зависимость активности биферментной Р + Л системы была исследована в растворах повышенной вязкости, в присутствии сахарозы и глицерина, в диапазоне температур 20-45°C. Было установлено, что увеличение добавляемых концентраций глицерина и сахарозы приводит к сдвигу температурного максимума свечения биферментной системы в сторону более высоких температур, то есть увеличивается термостабильность биферментной системы (рисунок 4.1.). При добавлении 50% глицерина и 40% сахарозы максимальные значения I_m биферментной системы были зарегистрированы при температуре 35°C. Интенсивность свечения Р + Л системы при указанных концентрациях глицерина и сахарозы была в 2 раза выше значений, полученных в буфере при этой же температуре. При этом, известно, что температурный

оптимум бактериальной люциферазы находится в диапазоне 22-28°C [17]. При температурах >30°C люцифераза начинает быстро терять активность, что свидетельствует о ограниченности применения сопряженных ферментативных систем с бактериальной люциферазой при температурах выше 30°C. Инактивация НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы происходит при температуре 37°C [17].

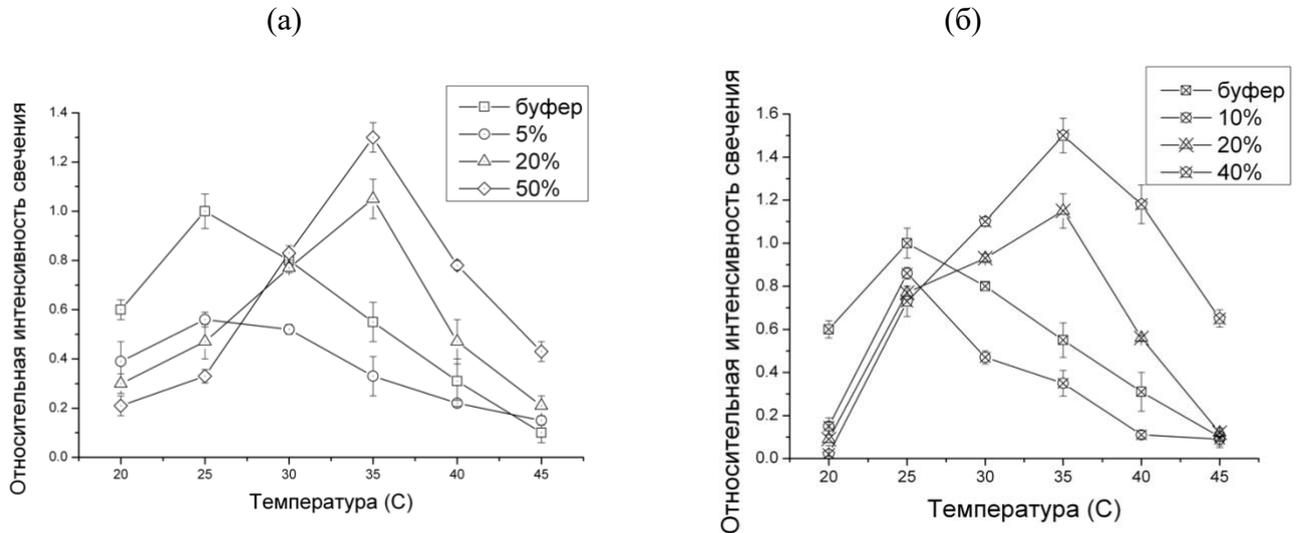


Рисунок 4.1. – Зависимость активности биферментной системы НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза (I_m) от температуры среды при различном содержании глицерина (а) и сахарозы (б). Нормировано на I_m свечения реакции в буфере.

В связи с этим, исследованы кинетические кривые термоинактивации биферментной Р + Л системы при температуре 35°C. Были получены моноэкспоненциальные зависимости спада активности Р + Л системы от времени экспозиции при различных концентрациях глицерина (5–50 %) и сахарозы (10–40 %). Вид полученных зависимостей спада активности биферментной системы во времени свидетельствует о том, что термоинактивация биферментной системы является мономолекулярным процессом, а значение константы первого порядка скорости инактивации биферментной системы является величиной, напрямую характеризующей термостабильность люциферазы и (или) НАДН:ФМН-оксидоредуктазы в данных условиях.

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

Анализируя значения E_a можно сделать предположение о том, что значения E_a не всегда напрямую связаны с величиной уменьшения каталитической активности фермента. Например, увеличение вязкости реакционной среды до величины 3,8 сП - 3,9 сП, путем добавления 40%

сахарозы и 50% глицерина, приводит как к увеличению значения E_a , в случае сахарозы, так и к уменьшению значений E_a , в случае глицерина, по сравнению с контрольным значением.

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

На рисунке 4.2. показана зависимость интенсивности свечения триферментной системы от температуры в буфере и в растворах 5% глицерина и 10% сахарозы.

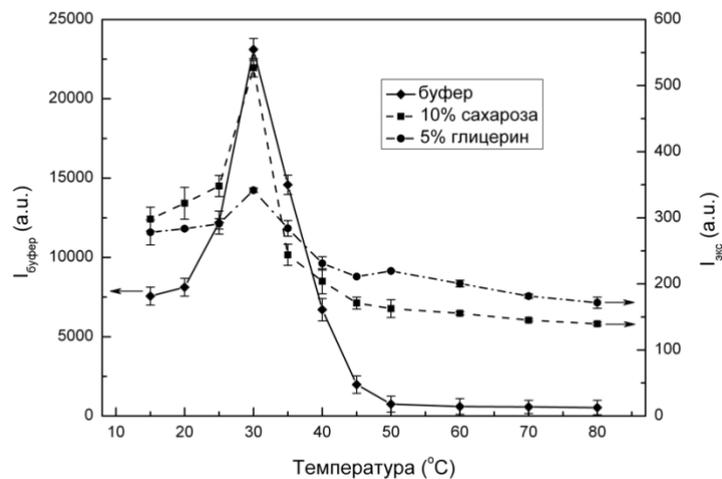


Рисунок 4.2. — Температурная зависимость максимальной интенсивности свечения триферментной системы ЛДГ + Р + Л в присутствии 10% сахарозы и 5% глицерина. Правая Y-ось показывает активность триферментной системы в присутствии осмолитов, левая Y-ось - активность триферментной системы в буфере.

Из рисунка видно, что температурный оптимум триферментной системы составляет 30°C. Также, как и в случае Р + Л системы, присутствие в реакционной среде небольших концентраций глицерина и сахарозы (5-10%) не приводит к увеличению активности триферментной системы при повышении температуры. Дальнейшее повышение содержания водно-глицериновых и водно-сахарозных растворов (>10%) в реакционной среде не приводит к

повышению температурной резистентности триферментной ЛДГ + Р + Л системы, как это наблюдалось ранее в случае Р + Л системы при температурах выше 25°C (рисунок 4.1.). Кроме этого, как в присутствии водно-глицериновых растворов 20% и 50%, так и в присутствии водно-сахарозных растворов 20% и 40%, в системе перестает наблюдаться явный пик активности ферментативной ЛДГ + Р + Л системы при температуре 30°C (рисунок 4.3.), который наблюдается в контроле и в присутствии 5% глицерина и 10% сахарозы (рисунок 4.2.). Одинаковая степень воздействия различных концентраций глицерина и сахарозы на активность триферментной системы при различных температурах, скорее всего, свидетельствует о доминирующем воздействии вязкости реакционной среды на активность системы ЛДГ + Р + Л, чем природы используемых осмолитов.

(а)

(б)

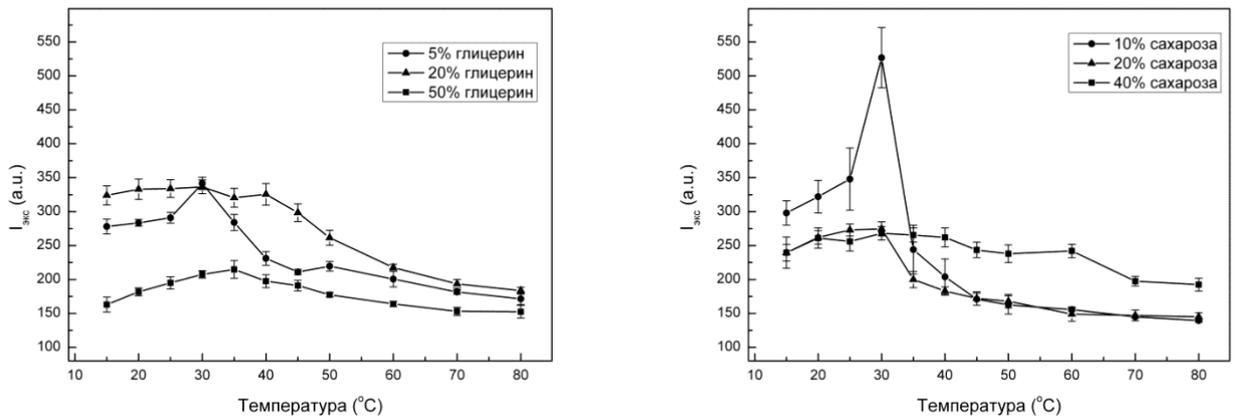


Рисунок 4.3. – Температурная зависимость активности триферментной системы ЛДГ + НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза в присутствии различных концентраций глицерина (а) и сахарозы (б).

Были рассчитаны значения энергии активации (E_a) ЛДГ + Р + Л системы в присутствии сахарозы и глицерина при температуре $t = 35^\circ\text{C}$. Полученные значения энергии активации составили: $85,7 \pm 0,1$; $35,1 \pm 0,9$ и $77,5 \pm 0,8$ кДж/моль в присутствии сахарозы, глицерина и буфера, соответственно. Как было указано выше, значения E_a характеризуют ограничение пространственной подвижности белковых глобул в присутствии модельных агентов, моделирующих значения вязкости реакционной среды [7]. Следует отметить, что, во-первых, в присутствии сахарозы происходит существенное ограничение пространственной подвижности белковых глобул, входящих в состав триферментной системы, по сравнению с буфером и глицерином. Такая же манера ограничения пространственной подвижности белковых глобул наблюдалась и для Р + Л системы. Во-вторых, в присутствии водно-глицериновых растворов происходит уменьшение величины E_a триферментной системы в 2,2 раза по сравнению с

контрольным значением, похожая зависимость изменения величины E_a в присутствии водно-глицериновых растворов была получена и при исследовании биферментной системы.

Примечательно, что, несмотря на формирование более благоприятных, с точки зрения термодинамики, условий в триферментной системе в присутствии глицерина в данной ферментативной ЛДГ + Р + Л системе не наблюдается никаких изменений каталитической активности триферментной системы. Скорее всего, лимитирующим фактором в триферментной системе является активность ЛДГ. Как было показано ранее, значительное уменьшение активности ЛДГ происходит при увеличении добавляемых в реакционную смесь концентраций глицерина и сахарозы более 40 об. % [18]. Полученные нами результаты, показывают, что даже присутствие в реакционной среде 10-20 об. % осмолитов негативно сказывается на каталитической активности ЛДГ, что ведет к отклонению ферментативной системы от стандартных условий [19]. Этим же, скорее всего, можно объяснить отсутствие максимумов интенсивности свечения триферментной системы в присутствии концентраций глицерина и сахарозы, превышающих 10%, при варьировании температурных условий.

Инактивация триферментной системы соответствует кинетике реакции второго порядка, причем инактивация ЛДГ + Р + Л системы включает в себя два разных механизма, которые последовательно сменяют друг друга и происходят с разными скоростями. Как известно, ЛДГ, Р и Л имеют четвертичную структуру и представляют собой тетрамерный фермент, гомодимер и гетеродимер, соответственно. Следовательно, первой стадией инактивации триферментной системы, вероятно, является диссоциация ферментов на субъединицы. После диссоциации происходит необратимая денатурация фермента, которой соответствует второй «линейный» участок кинетической кривой термоинактивации. Таким образом, термоинактивация триферментной ЛДГ + Р + Л системы может быть объяснена диссоциативным механизмом, который характерен для большинства олигомерных белков.

Проведенные исследования активности биферментной и триферментной систем при варьировании значений вязкости реакционной среды и температуры показали: во-первых, увеличение значений вязкости реакционной среды, путем добавления глицерина и сахарозы, приводят к повышению термостабильности биферментной Р + Л системы. В Р + Л системе наблюдается увеличение каталитической активности при температуре 35°C в присутствии 50% глицерина и 40% сахарозы. Во-вторых, вязкое микроокружение сказывается на пространственной подвижности исследуемых ферментов. При этом на основании полученных значений E_a , имитирование эффектов вязкости реакционной среды путем добавления водно-сахарозных растворов ведет к более существенному ограничению пространственной подвижности ферментов в исследуемых системах, чем при добавлении водно-глицериновых растворов. Существенное ограничение пространственной подвижности в присутствии сахарозы

скорее всего связано с высокой гидрофильностью молекулы сахарозы, что приводит к увеличению общей фракции упаковки раствора. Таким образом, такой высоко упакованный раствор, как «шуба» защищает пространственную структуру белков от воздействия критических для них температур [9].

Отдельно стоит отметить несмотря на то, что в присутствии глицерина происходит снижение значения E_a для триферментной ЛДГ + Р + Л системы в 2,2 раза по сравнению с контрольным значением, в системе не наблюдается увеличение термостабильности ЛДГ + Р + Л системы, как например, в случае Р + Л системы (рисунок 4.1). Другими словами, три сопряженных фермента в системе не используют сформировавшееся энергетически выгодное положение для реализации кооперативных взаимодействий, которые являются неотъемлемыми и представляют собой часть коммуникационной сети в макромолекулярном ансамбле ферментов [20]. Данный факт позволяет ввести новый критерий оценки адекватного конструирования ферментативных систем по изменению параметра термостабильности сопряженных ферментативных систем.

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

Р + Л система была использована в качестве тест-объекта при определении потенциальной токсичности одностенных углеродных нанотрубок (ОУНТ), многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ) и водного раствора гидратированного фуллерена C_{60} ($C_{60}H_nF_n$). Показано, что МУНТ ингибируют активность ферментативной системы Р + Л, при этом МУНТ являются более сильным ингибитором по сравнению с ОУНТ. Чувствительность Р + Л системы к МУНТ составляет от 0,012 до 0,16 мг/л, в зависимости от типа МУНТ. В таблице 5.1. представлены значения параметров ингибирования системы IC_{50} и IC_{20} для этих нанотрубок, вызывающие ингибирование свечения Р+Л системы на 50 или 20 % по сравнению с контрольным уровнем свечения.

Если предположить, что значения токсикологических параметров EC_{50} и EC_{20} коррелируют с полученными нами значениями IC_{50} и IC_{20} , образцы МУНТ и ОУНТ могут быть охарактеризованы как чрезвычайно токсичные и очень токсичные, соответственно. Биферментная система Р + Л оказалась более чувствительной к МУНТ, чем светящиеся бактерии. Так, значения EC_{50} полученные на бактериальных клетках в 2-3 раза выше значений, полученных с использованием системы Р + Л.

Чувствительность Р + Л системы к фуллерену $C_{60}H_nF_n$ мала, параметр IC_{20} равен 3,7 мг/л. Параметр IC_{50} не удалось определить, так как его значение было за рамками максимальной концентрации имеющейся пробы фуллерена C_{60} , составляющей 7,5 мг/л. Таким образом,

биферментная система Р + Л может быть использована для оценки потенциальной токсичности МУНТ, но чувствительность к разным типам наноматериалов может различаться.

Таблица 5.1. – Значения параметров ингибирования IC₅₀ и IC₂₀ (мг/л) определенных во время оценки влияния УНТ на интенсивность свечения растворимой Р + Л системы.

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

Вторая часть главы 5 посвящена оценке возможности использования ферментативных систем разной сложности в качестве биотестов для оценки степени загрязнения почв. Для этого определяли чувствительность моно- (Р), би (Р + Л)- и три (ЛДГ + Р + Л)- ферментных систем к пестицидам (малатион и диазинон) и хлориду меди (II) в воде и водных экстрактах из почв, различающихся гранулометрическим составом и содержанием гумуса. Объектом исследования являлись 5 эталонных образцов почв (песок, легкий суглинок, средний суглинок, тяжелый суглинок, чернозём), отобранных и охарактеризованных в соответствии с ГОСТ 17.4.4.02-84 (2008). Для каждого тестируемого образца определяли параметр ингибирования IC₂₀, отражающий предел чувствительности тест-системы к загрязнителю.

На первом этапе исследовали действие водных растворов почвенных токсикантов на активность трех ферментативных систем (Р, Р + Л, ЛДГ + Р + Л) (таблица 5.2., образец дН₂О). По параметру IC₂₀ установлено, что моноферментная система Р малочувствительна к воздействию водных растворов малатиона (IC₂₀ >> ПДК), поэтому в экспериментах по оценке чувствительности Р к токсикантам, содержащимся в экстрактах из почв, малатион был исключен.

Далее исследовали влияние на ферментативные системы пяти незагрязненных образцов почв (песка, легкого суглинка, среднего суглинка, тяжелого суглинка и чернозёма) с различным содержанием гумуса. Из пяти почвенных экстрактов на активность Р существенное ингибирующее воздействие оказывает только экстракт из чернозема. Активность биферментной системы Р + Л существенно снижалась в присутствии легкого суглинка, среднего суглинка и чернозема. На активность триферментной системы ЛДГ + Р + Л наибольшее ингибирующее воздействие оказали экстракты из песчаной почвы, тяжелого суглинка и чернозема. В дальнейшем для исключения влияния компонентов незагрязненной

почвы на результаты ферментативного тестирования в качестве контроля использовали водный экстракт из почвы соответствующего типа.

Таблица 5.2. – Параметр IC₂₀ (мг/кг) для исследованных загрязнителей при использовании ферментативных тест-систем Р, Р + Л и ЛДГ + Р + Л.

Образец	Малатион			Диазинон			Хлорид меди (II)		
	Р	Р+Л	ЛДГ+Р+Л	Р	Р+Л	ЛДГ+Р+Л	Р	Р+Л	ЛДГ+Р+Л
дН ₂ О	4400	39	2	350	1,3	0,35	0,4	0,06	0,004
Песок	-	30	1	1500	1,15	0,15	169,8	0,21	0,004
Легкий суглинок	-	600	20	300	9	3	6,35	0,12	0,004
Средний суглинок	-	130	20	1800	2,4	0,5	17	0,03	0,16
Тяжелый суглинок	-	18,5	8	300	16,5	0,15	21,25	0,55	0,04
Чернозем	-	39	1	3000	1,7	0,3	255	0,7	0,0045
ПДК	1,0 [21]			0,1 [21]			3,0 [22]		

На финальном этапе исследования были проведены модельные эксперименты оценки чувствительности ферментативных систем по параметру IC₂₀ к воздействию токсических веществ при их внесении непосредственно в экстракты из почв (таблица 5.2.). Для большинства исследуемых образцов почвенных токсикантов наблюдалось снижение их ингибирующего воздействия на ферментативные системы. Так, чувствительность Р и Р + Л систем к экстрактам чернозема с хлоридом меди упала на три и один порядок соответственно, и в 10 раз при его тестировании в экстракте из среднего суглинка с помощью ЛДГ + Р + Л системы. Сравнительный анализ активности ферментных систем в присутствии загрязненных и незагрязненных экстрактов почв показал, что моноферментная система не позволяет фиксировать загрязнение почв хлоридом меди на уровне, близком к ПДК для данного вещества.

Также, с использованием языка программирования JavaScript, был разработан программный алгоритм для ферментативного биосенсора для решения задач, связанных с анализом загрязнения почвы. Созданный алгоритм для хранения, анализа и визуализации данных основан на сопоставлении данных анализа 51 некоммерческих стандартных образцов почвы и их ингибирующего воздействия на три ферментативные системы различной сложности (моноферментная система – бутирилхолинэстераза; биферментная система - Р + Л; триферментная система - ЛДГ + Р + Л). Разработанный программный алгоритм позволяет

выявить влияние химических свойств образцов почвы, не содержащих токсичных агентов, на ферментные биосенсоры. Такое программное обеспечение может найти широкое применение в мониторинге окружающей среды.

Заключение

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

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

Выводы:

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

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

3. Показано, что сочетание биферментной (НАДН:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза)

системы с субстратами (НАДН, ФМН, тетрадеканаль) и глицерином или сахарозой может быть использовано для построения экспериментальной модели эффективного взаимодействия ферментов в метаболических фрагментах в условиях вязкости реакционной среды, стилизующей внутриклеточные значения.

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

Список цитированной литературы

1. Luby-Phelps, K. Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area / K. Luby-Phelps // *International review of cytology*. — 1999. — V. 192. — P. 189-221.
2. Pastor, I. Effect of crowding by Dextran in enzymatic reactions / I. Pastor, L. Pitulice, C. Balcells, E. Vilaseca, S. Madurga, A. Isvoran, M. Cascante, F. Mas // *Biophysical chemistry*. — 2014. — V. 185. — P. 8-13.
3. van Eunen, K. The importance and challenges of in vivo-like enzyme kinetics / K. van Eunen, B. M. Bakker // *Perspectives in Science*. — 2014. — V. 1. — P. 126-130.
4. Fushimi, K. Low viscosity in the aqueous domain of cell cytoplasm measured by picosecond polarization microfluorimetry / K. Fushimi, A. S. Verkman // *The Journal of cell biology*. — 1991. — V. 112. — P. 719-725.
5. Суковатая, И. Е. Кинетика биолюминесцентной реакции в нетрадиционных средах : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.02 / Суковатая Ирина Егоровна. — Красноярск, 2000. — 21 с.
6. Chebotareva, N. A. Biochemical effects of molecular crowding / N. A. Chebotareva, B. I. Kurganov, N. B. Livanova // *Biochemistry (Moscow)*. — 2004. — V. 69. — P. 1239-1251.
7. Rauscher, A. Internal friction in enzyme reactions / A. Rauscher, I. Derényi, L. Gráf, A. Málnási-Csizmadia // *IUBMB life*. — 2013. — V. 1. — P. 35-42.
8. Poggi, C. G. Macromolecular crowding and the steady-state kinetics of malate dehydrogenase / C. G. Poggi, K. M. Slade // *Biochemistry*. — 2015. — V. 2. — P. 260-267.
9. Oshima, H. Effects of sugars on the thermal stability of a protein / H. Oshima, M. Kinoshita // *The Journal of chemical physics*. — 2013. — V. 138. — P. 06B612_1.
10. Arakawa, T. The stabilization of proteins by osmolytes / T. Arakawa, S. N. Timasheff // *Biophysical journal*. — 1985. — V. 47. — P. 411-414.

11. Sutormin, O. S. Effect of viscosity on efficiency of enzyme catalysis of bacterial luciferase coupled with lactate dehydrogenase and NAD(P)H:FMN-Oxidoreductase / O. S. Sutormin, I. E. Sukovataya, S. Pande, V. A. Kratasyuk // *Molecular Catalysis*. — 2018. — V. 458. — P. 60-66.
12. Кратасюк, В. А. Люциферазное биотестирование: биофизические основы, методы и применение : автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.00 / Кратасюк Валентина Александровна. — Красноярск., 1994. — 31 с.
13. Гительзон, И. И. Экологическая биофизика : учебное пособие / И. И. Гительзон, В. А. Кратасюк, В. Н. Лопатин, А. Д. Апонасенко, В. С. Филимонов, В. В. Фишов, З. Г. Холостова, Н. А. Гаевский, Ю. С. Григорьев, А. А. Тихомиров — Москва : Логос, 2002.—328 с.
14. Deeva, A. A. The role of electrostatic interactions in complex formation between bacterial luciferase and NADPH: FMN-oxidoreductase / A. A. Deeva, E. V. Nemtseva, V. A. Kratasyuk // *Journal of Siberian Federal University. Biology*. — 2018. — V. 10. — P. 106-113.
15. Kudryasheva, N. S. Effect of quinones and phenols on the triple-enzyme bioluminescent system with protease / N. S. Kudryasheva, E. N. Esimbekova, N. N. Remmel, V. A. Kratasyuk, A. J. W. G. Visser, A. J. W. G. van Hoek // *Luminescence: the journal of biological and chemical luminescence*. — 2003. — V. 18. — P. 224-228.
16. Ugarova, N. N. Bioluminescent microassay of various metabolites using bacterial luciferase co-immobilized with multienzyme systems / N. N. Ugarova, O. V. Lebedeva, I. G. Frumkina // *Analytical biochemistry*. — 1988. — V. 173. — P. 221-227.
17. Tyulkova, N. A. Comparative study of temperature effects on bacterial luciferases / N. A. Tyulkova, T. P. Sandalova // *Biochemistry (Moscow)*. — 1996. — V. 61. — P. 205-214.
18. Demchenko, A. P. Kinetics of the lactate dehydrogenase reaction in high-viscosity media / A. P. Demchenko, O. I. Rusyn, E. A. Saburova // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. — 1989. — V. 998. — P. 196-203.
19. Bisswanger, H. Enzyme assays / H. Bisswanger // *Perspectives in Science*. — 2014. — V. 1. — P. 41-55.
20. Porter, C. M. Cooperativity in monomeric enzymes with single ligand-binding sites / C. M. Porter, B. G. Miller // *Bioorganic chemistry*. — 2012. — V. 43. — P. 44-50.
21. ГН 1.2.3111-13—2014 Гигиенические нормативы содержания пестицидов в объектах окружающей среды (перечень). — М. : Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014. — 131 с.
22. ГН 2.1.7.2041-06—2006 Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в почве. — М. : Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006 — 15 с.

Список статей, опубликованных автором по теме диссертации

1. Kratasyuk, V. A. Software for matching standard activity enzyme biosensors for soil pollution analysis / V. A. Kratasyuk, E. M. Kolosova, **O. S. Sutormin**, V. I. Lonshakova-Mukina, M. M. Baygin, N. V. Rimatskaya, I. E. Sukovataya, A. A. Shpedt // *Sensors*. — 2021. — V. 21. — P. 1017.
2. Колосова, Е. М. Комплексный ферментативный биотест для оценки загрязнения почвы / Е. М. Колосова, **О. С. Сутормин**, Е. Н. Есимбекова, В. И. Лоншакова-Мукина, В. А. Кратасюк // *Доклады академии наук*. — 2019. — № 1. — С. 103-107.
3. Сутормин, О. С. Ферментативное биотестирование почв: сравнение чувствительности к токсикантам моно-, би-и триферментной систем / **О. С. Сутормин**, Е. М. Колосова, Е. В. Немцева, О. В. Искорнева, А. Е. Лисица, В. С. Матвиенко, Е.Н. Есимбекова, В. А. Кратасюк // *Цитология*. — 2018.— № 10. — С. 826-829.
4. Sutormin, O. S. Effect of viscosity on efficiency of enzyme catalysis of bacterial luciferase coupled with lactate dehydrogenase and NAD(P)H:FMN-Oxidoreductase / **O. S. Sutormin**, I. E. Sukovataya, S. Pande, V. A. Kratasyuk // *Molecular Catalysis*. — 2018. — V. 458. —P. 60-66;
5. Esimbekova, E. N. Bioluminescent enzyme inhibition-based assay to predict the potential toxicity of carbon nanomaterials / E. N. Esimbekova, E. V. Nemtseva, A. E. Bezrukikh, G. V. Jukova, A. E. Lisitsa, V. I. Lonshakova-Mukina, N. V. Rimatskaya, **O. S. Sutormin**, V. A. Kratasyuk // *Toxicology in Vitro*. — 2017. — V. 45. —P. 128-133.
6. Сутормин, О. С. Спектры флуоресценции ферментов биолюминесцентной реакции бактерий в вязких средах / **О. С. Сутормин**, И. Е. Суковатая, В. А. Кратасюк // *Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология*. — 2014. — № 7. — С. 20–26.
7. Сутормин, О. С. Влияние вязкости реакционной среды на кинетику биферментной биолюминесцентной системы НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза / **О. С. Сутормин**, И. Е. Суковатая, В. А. Кратасюк // *Известия Алтайского государственного университета*. — 2013. — № 3. — С. 47-51.
8. Сутормин, О. С. Стабилизирующий эффект глицерина и сахарозы на биферментную систему светящихся бактерий НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза-люцифераза / **О. С. Сутормин**, И. Е. Суковатая, В. А. Кратасюк // *Вестник Оренбургского государственного университета*. — 2013. — № 10. — С. 148-151.