

Список литературы / References:

1. Bachurin S.O., Shevtsova E., Kireeva E.G., Oxenkrug G.F., Sablin S.O. Mitochondria as a Target for Neurotoxins and Neuroprotective Agents. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2003, vol. 993, pp. 334-344.
2. Robinson A.D., Ramanathan K.B., Newman K.P., Weber K.T., McGee J.E. [et al.] Oxidative stress and cardiomyocyte necrosis with elevated serum troponins: pathophysiologic mechanisms. *Am. J. Med. Sci.*, 2011, vol. 342, pp. 129-134.
3. Яременко К.В. Учение Н.В. Лазарева о СНПС и адаптогенах как базовая теория профилактической медицины. *Психофармакология и биологическая наркология*, 2005, т. 5, № 4, с. 1086-1092. [Yremenko K.V. N.V. Lazarev doctrine about INRO and adaptogens as a basic theory of preventive medicine. *Psychopharmacologia and biologicheskaya narcologiya*, 2005, vol. 5, no. 4, pp. 1086-1092. (In Russ.)]
4. Тодоров И.Н. Митохондрии: окислительный стресс и мутации митохондриальной ДНК в развитии патологий, процессе старения и апоптозе. *Рос. хим. Журнал*, 2007, т. 51, с. 93-106. [Todorov I.N. Mitochondria: oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in the development of pathologies, the aging process and apoptosis. *Russian. Chem. Journal*, 2007, vol. 51, pp. 93-106. (In Russ.)]
5. Kirkinezos I.G., Moraes C.T. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Cell & Developmental Biology*, 2001, vol. 12, pp. 449-457.
6. Vladimirov Yu.A., Olenev V.I., Suslova T.V., Cheremisina Z.V. Lipid peroxidation in mitochondrial membrane. *Adv. Lipid Res.*, 1980, vol. 17, no. 1, pp. 173-249.
7. Munoz-Pinedo C., Guio-Carrion A., Goldstein J.C., Fitzgerald P., Newmeyer D.D., Green D.R. Different mitochondrial inter membrane space proteins are released during apoptosis in a manner that is coordinately initiated but can vary in duration. *PNAS*, 2006, vol. 103, no. 31, pp. 11573-81.
8. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Часовских Н.Ю., Кайгородова Н.В., Старикова Е.Г., Стариков Ю.В., Радзивил Т.Т., Крат И.В. Роль редокс-зависимых сигнальных систем в регуляции апоптоза при окислительном стрессе. *Цитология*, 2009, т. 51, № 4, с. 329-334. [Ryazantseva N.V., Novitsky V.V., Chasovskikh N.Yu., Kaigorodova N.V., Starikova E.G., Starikov Yu.V., Radzivil T.T., Krat I.V. The role of redox-dependent signaling systems in the regulation of apoptosis in oxidative stress. *Cytologiya*, 2009, vol. 51, no. 4, pp. 329-334. (In Russ.)]
9. Tailor N.L., Day D.A., Millar A.H. Targets of stress-induced oxidative damage in plant mitochondria and their impact on cell carbon/nitrogen metabolism. *J. of Exp. Botany*, 2003, vol. 55, no. 394, pp. 1-10.
10. Ковтун Г.А. Реакционная способность взаимодействия фенольных антиоксидантов с пероксильными радикалами. *Катализ и нефтехимия*, 2000, № 4, с. 1-9. [Kovtun G.A. Reactivity of the interaction of phenolic antioxidants with peroxy radicals. *Cataliz and neftehimiya*, 2000, no. 4, pp. 1-9. (In Russ.)]
11. Mokhova E.N., Skulachev V.P., Zhigacheva I.V. Activation of the external pathway of NADH oxidation in liver mitochondria of cold-adapted rats. *BBA*, 1977, vol. 501, pp. 415-423.
12. Pryor W.A., Porter N.A. A suggested mechanism for the production of 4-hydroxy-2-nonenal from the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Research and Communications*, 1990, vol. 8, pp. 541-543.
13. Лукьянова Л.Д. Биоэнергетическая гипоксия: понятие, механизмы и способы коррекции. *Бюл. эксперим. биол. мед.*, 1997, т. 124, № 9, с. 244-254. [Lukyanova L.D. Bioenergetic hypoxia: concept, mechanisms and methods of correction. *Bul. Experiment. Biol. And medecina.*, 1997, vol. 124, no. 9, pp. 244-254. (In Russ.)]
14. Paradies G., Petrosillo G, Pistolesse M., Venosa N., Federici A., Ruggiero F.M. Decrease in Mitochondrial Complex I Activity in Ischemic/Reperfused Rat Heart: Involvement of Reactive Oxygen Species and Cardiolipin. *Circulation Research*, 2004, vol. 94, pp. 53-59.
15. Володькин А.А., Ерохин В.Н., Бурлакова Е.Б., Заиков Г.Е., Ломакин С.М. Строение и биологические свойства 1-карбоксо-1-(N-метиламид)-2-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)-пропанатов натрия и калия. *Хим. физика*, 2013, т. 32, № 2, с. 66-72. [Volodkin A.A., Erokhin V.N., Burlakova E.B., Zaikov G.E., Lomakin S.M. The structure and biological properties of 1-carboxy-1-(N-methylamide)-2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-propanates of sodium and potassium. *Journal of Physicheskoy Khimii*, 2013, vol. 32, no. 2, pp. 66-72. (In Russ.)]

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ИНУЛИНАЗЫ: ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Холявка М.Г., Артюхов В.Г.

Воронежский государственный университет
Университетская пл., 1, г. Воронеж, 394018, РФ
e-mail: marinaholyavka@yahoo.com

Аннотация. В сравнительном аспекте исследованы структурно-функциональные, физико-химические и кинетические свойства инулиназ из различных продуцентов. Проведен анализ методов их иммобилизации, т.е. закрепления на нерастворимых полимерных матрицах очищенных ферментов или ферментных систем, что приводит к стабилизации каталитической активности препаратов и превращает их в технологически более удобные гетерогенные катализаторы. Рассмотрены некоторые пути и перспективы практического использования иммобилизованных инулиназ.

Ключевые слова: инулиназа, иммобилизация, гетерогенные биокатализаторы.

IMMOBILIZED INULINASES: THEORETICAL ASPECTS AND PRACTICAL APPLICATIONS

Holyavka M.G., Artyukhov V.G.
Voronezh State University
Universitetskaya sq., 1, Voronezh, 394018, Russia
e-mail: marinaholyavka@yahoo.com

Abstract. Structural, functional, physical, chemical and kinetic properties of inulinases from various producers have been studied in a comparative aspect. The analysis of methods to their immobilization is carried out. Immobilization – is fixing of purified enzymes or enzyme systems on insoluble polymer matrices, which leads to stabilization of the catalytic activity of the preparations and turns them into technologically more convenient heterogeneous catalysts. Some ways and prospects of practical application of immobilized inulinases are considered.

Key words: inulinase, immobilization, heterogeneous biocatalysts.

Инулиназы (КФ 3.2.1.7) – гидролитические ферменты, которые расщепляет инулин и другие фруктосодержащие полимеры до фруктозы и могут быть использованы в пищевой промышленности при получении продуктов функционального питания для больных сахарным диабетом и/или ожирением.

В сравнительном аспекте были проанализированы методы регулирования активности инулиназ, дана характеристика гетерогенных препаратов на основе иммобилизованного фермента и предложены пути их применения. Изучены индукторы синтеза инулиназы, определены наиболее перспективные ее продуценты, установлены зависимости каталитической активности этого фермента от присутствия в реакционной смеси различных активаторов, ингибиторов, ионов металлов [1].

Проанализированы физико-химические и кинетические свойства инулиназ из различных продуцентов. Особое внимание было уделено описанию функциональных свойств этих ферментов в условиях различного микроокружения, выявлению оптимальных для их функционирования параметров системы, характеристике стабильности белковых макромолекул, устойчивости их к температурным воздействиям и экстремальным значениям pH среды. Обсуждены перспективы развития биотехнологических процессов с использованием свободных и иммобилизованных инулиназ [2].

Продемонстрировано, что в качестве продуцентов инулиназы могут быть использованы культуры микроорганизмов из различных таксономических групп: бактерий, дрожжей, актиномицетов и других микроскопических грибов, а также некоторые высшие растения [3].

Исследована структурная организация инулиназ микробного и растительного происхождения. Для изучения размера, молекулярной массы, надмолекулярной организации был разработан подход, заключающийся в сочетании атомно-силовой микроскопии с методами динамического светорассеяния, гель-хроматографии и электрофореза. Показано, что инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* и *Aspergillus niger* образуют гетеродимеры, а инулиназы из клубней *Helianthus tuberosus* представлены как димерной, так и мономерной формами. Был рассмотрен вопрос о роли различных форм фермента в проявлении функциональной активности молекул инулиназ [4].

Создана компьютерная модель надмолекулярной организации инулиназы из *Aspergillus niger* и описан механизм процесса димеризации молекул фермента. Показано, что в процессе димеризации инулиназы при образовании контактов между мономерными формами фермента определяющая роль принадлежит неполярным аминокислотным остаткам [5].

Показано, что одним из эффективных путей регулирования и стабилизации активности гидролаз является их иммобилизация. Выдвинуто предположение, что механизмы стабилизации иммобилизованного фермента в условиях экстремальных значений pH, температуры, а также других денатурирующих агентов в главных чертах совпадают и обусловлены, прежде всего, изменением степени мобильности третичной структуры белка, ответственной за образование фермент-субстратного комплекса. Установлено, что универсального метода иммобилизации гидролитических ферментов в настоящее время не существует, каждый из способов имеет свои преимущества и недостатки. В целом выбор метода иммобилизации биокатализатора зависит от задач исследования и направления использования получаемого препарата в той или иной области науки и производства [6].

В связи с тем, что в базе данных PDB выложены данные рентгеноструктурного анализа лишь для двух инулиназ из продуцентов рода *Aspergillus*, что не позволяет проводить эксперименты *in silico* для ферментов, выделенных из других микроорганизмов и растительных объектов, нами был предложен алгоритм реконструкции инулиназ на основании данных об их первичной структуре [7]. Далее методами компьютерного моделирования был выполнен виртуальный скрининг высокоаффинных лигандов для иммобилизации инулиназы. Изученный нами набор лигандов представлял собой высокомолекулярные соединения – поликатиониты и полианиониты, гликопротеины, пролино-фенилаланиновый пептид, полилактат. На основе сравнительного анализа величин полной энергии и локализации мест связывания лигандов, а также литературных данных, были высказаны соображения о механизмах взаимодействия предлагаемых нами матриц для иммобилизации молекул фермента и структурных особенностях таких комплексов [8,9].

Предложен ряд ионообменных смол и волокон для получения гетерогенных биокатализаторов на основе инулиназы. Установлено, что хитозаны различной молекулярной массы, ионообменные смолы АВ-17-2П, КУ-2, АВ-16-ГС, АМ 21А, ИМАС-НР, PUROLITE и волокна ВИОН КН-1, ВИОН АН-1, КОПАН-90 могут применяться

в качестве носителей для иммобилизации инулиназы. Анализ ИК-спектров энзима, носителей и гетерогенных ферментных препаратов показал, что связывание инулиназы с заряженными матрицами носителей происходит в основном за счет электростатических взаимодействий. Выдвинуто предположение о том, что механизмы связывания инулиназы с матрицей катионо- и анионообменных полимеров принципиально отличаются друг от друга: в процессе адсорбции молекулы фермента принимают участие разные участки белковой глобулы, что обуславливает различные по своей природе конформационные перестройки в молекуле энзима [10-12].

Оптимизирована методика сорбционной иммобилизации инулиназы, позволяющая сохранить до 80 % первоначальной ферментативной активности. Исследованы физико-химические и кинетические свойства гетерогенных препаратов. Установлено, что иммобилизованная инулиназа проявляет максимальную каталитическую активность в диапазоне температур до 70 °С, тогда как оптимум ее растворимой формы составляет 50 °С. Сравнительный анализ значений основных кинетических параметров реакций гидролиза инулина гетерогенными биопрепаратами позволяет нам заключить, что наибольшее сродство к субстрату проявляет энзим, адсорбированный на катионите КУ-2 [13-15].

Предложена модель процесса гидролиза инулина ферментным препаратом инулиназы [16]. Протестированы экстракты некоторых инулинсодержащих растений в качестве субстрата для иммобилизованного фермента. Установлено, что иммобилизованный препарат инулиназы проявляет максимальную каталитическую способность при гидролизе экстрактов топинамбура, цикория, девясила, которые по этой причине являются перспективным сырьем для промышленного использования с целью получения фруктозы ферментативным путем.

Показано, что исследованные сорбенты, нативные и иммобилизованные инулиназы не проявляют мутагенной, ДНК-повреждающей и цитотоксической активности, что позволяет рекомендовать их для использования в качестве катализаторов для пищевой промышленности.

Список литературы / References:

1. Kovaleva T.A., Kholiyavka M.G., Artyukhov V.G. Characteristics of inulinases: methods for regulation and stabilization of their activity. *Biotechnology in Russia*, 2012, no. 1, pp. 43-63.
2. Artyukhov V.G., Holyavka M.G., Kovaleva T.A. Structural and functional properties of inulinases. Ways to regulate their activity. *Biophysics*, 2013, vol. 58, no. 4, pp. 493-501.
3. Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Kovaleva T.A. Structural and functional properties of inulinases: a review. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2016, vol. 34, no. 1, pp. 1-17.
4. Holyavka M.G., Kovaleva T.A., Grechkina M.V., Ostankova I.V., Artyukhov V.G. Inulinases from various producers: the features of their permolecular organization. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2014, vol. 50, no. 1, pp. 10-16.
5. Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Makin S.M. Investigation of inulinase permolecular organization from producers of the genus *Aspergillus* using several computing and experimental methods. *Biophysics*, 2015, vol. 60, no. 4, pp. 522-528.
6. Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Kovaleva T.A. *The handbook of microbial bioresources*. Chapter 22. Characteristics of microbial inulinases: physical and chemical bases of their activity regulation / Edited by V.K. Gupta, G.D. Sharma, M.G. Tuohy, R. Gaur, Boston: CABI, 2016, pp. 361-368.
7. Abdullatypov A.V., Kondratyev M.S., Kholiyavka M.G., Artyukhov V.G. Reconstruction of the spatial structure of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* to find regulatory pathways of its catalytic activity. *Biophysics*, 2016, vol. 61, no. 4, pp. 565-571.
8. Holyavka M.G., Kondratyev M.S., Samchenko A.A., Kabanov A.V., Komarov V.M., Artyukhov V.G. In silico design of high-affinity ligands for the immobilization of inulinase. *Computers in biology and medicine*, 2016, vol. 71, pp. 198-204.
9. Kondratyev M.S., Kholiyavka M.G., Kabanov A.V., Sorokin A.A., Artyukhov V.G. In silico design and virtual screening of inulinase immobilization ligands with highest affinity. *Journal of biomolecular structure and dynamics*, 2015, vol. 33, suppl., pp. 128-129.
10. Kovaleva T.A., Holyavka M.G., Bogdanova S.S. Inulinase immobilization on macroporous anion-exchange resins by different methods. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2009, vol. 148, no. 1, pp. 39-41.
11. Holyavka M.G., Kovaleva T.A., Karpov S.I., Seredin P.V., Artyukhov V.G. Investigation of mechanisms of interaction between inulinase from *Kluyveromyces marxianus* and the matrices of ion-exchange resins and fiber. *Biophysics*, 2014, vol. 59, no. 2, pp. 222-228.
12. Holyavka M.G., Kondratyev M.S., Terentyev V.V., Samchenko A.A., Kabanov A.V., Komarov V.M., Artyukhov V.G. The Molecular Mechanism of Adsorption Immobilization of Inulinase on Polymer Matrices. *Biophysics*, 2017, vol. 62, no. 1, pp. 5-11.
13. Kovaleva T.A., Kholiyavka M.G., Takha A.S. Development of a heterogenous biocatalyst on the basis of immobilized inulinase preparation from *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology in Russia*, 2007, no. 3, pp. 106-116.
14. Kovaleva T.A., Kholiyavka M.G., Takha A.S. Study on a few characteristics on immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* as a perspective catalyst for inulin hydrolysis. *Biotechnology in Russia*, 2009, no. 2, pp. 73-80.

15. Kholiyavka M.G., Kovaleva T.A., Khrupina E.A., Volkova S.A., Artyukhov V.G. design of a heterogeneous enzymatic preparation on the basis of immobilized inulinase from *Helianthus tuberosus*. *Biotechnology in Russia*, 2012, no. 6, pp. 31-41.

16. Holyavka M.G., Evstigneev M.P., Artyukhov V.G., Savin V.V Development of heterogeneous preparation with inulinase for tubular reactor systems. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2016, vol. 129, pp. 1-5.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ ИОНОВ АЛЮМИНИЯ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ РЫБ РАЗЛИЧНЫХ ПЕЛАГИЧЕСКИХ ЗОН

Сухаренко Е.В.¹, Недзвецкий В.С.²

¹Керченский государственный морской технологический университет
ул. Орджоникидзе, 82, г. Керчь, 238309, РФ
e-mail: helenasuhar@gmail.com

²Бингельский университет
ул. Селахаддин-и Эйюби Мах. Айдинлик Кад, Бингель, 12000, Турция
e-mail: nedzvetskyvictor@gmail.com

Аннотация. Исследовали нейротоксические эффекты (в течение 45 суток) повышенных концентраций хлорида алюминия (10 мг/л) на интенсивность оксидативного стресса и содержание астроцит-специфических белков (цитоскелетного ГФКБ и цитозольного кальций-связывающего протеина S100 β) особей рыб различных пелагических зон (солнечного окуня, карася, плотвы обыкновенной, бычка-песочника). Определены отличия показателей оксидативного стресса в печени и головном мозге рыб в модельных условиях интоксикации ионами алюминия. Полученные результаты свидетельствуют о высокой чувствительности клеток нервной ткани к действию ионов алюминия. Установлено, что ионы алюминия индуцируют в головном мозге рыб достоверное повышение уровня конечных продуктов ПОЛ, рост активности ферментов антиоксидантной защиты, реактивацию глиальных клеток, повышение экспрессии ГФКБ и протеина S100 β , увеличение содержания полипептидных фрагментов астроцит-специфических белков в результате их ограниченного протеолиза. Представленные результаты свидетельствуют о развитии характерной астроглиальной реакции в ответ на хроническое воздействие хлорида алюминия в головном мозге рыб различных пелагических зон.

Ключевые слова: гидробионты, оксидативный стресс, нейроспецифические белки, глиальный фибриллярный кислый белок, протеин S100 β .

MOLECULAR MECHANISMS OF ALUMINIUM IONS NEUROTOXICITY IN BRAIN CELLS OF FISH FROM DIFFERENT PELAGIC AREAS

Sukharensko E.V.¹, Nedzvetsky V.S.²

¹Kerch state marine technological university,
Ordjonikidze str., 82, Kerch, 238309, Russia
e-mail: helenasuhar@gmail.com

²Bingol university,
Selahaddin-i Eyyubi Mah. Aydınlık Cad., 12000, Bingöl, Turkey,
e-mail: nedzvetskyvictor@gmail.com

Abstract. Neurotoxic effects of aluminum chloride in heightened concentration (10 mg/L) were studied in a brain of fish from different pelagic areas, especially sun fish, carasius, roach, and bullhead. The intensity of oxidative stress and the content of both cytoskeleton protein GFAP and cytosol Ca-binding protein S100 β were determined. The differences in oxidative stress data were observed in liver and brain of fish while 45 days treatment with aluminum chloride. Obtained data showed high sensitivity of neural tissue cells to exposure of aluminium ions. There was observed that aluminum ions induce integrated changes, especially more eminent of them - reliable increase of final LPO products, a rising of antioxidant enzyme activity, a reactivation of glial cells in brain, and overexpression both GFAP and S100 β protein. Moreover, aluminum ions induce growth of the content of polypeptide fragments from these astrocyte-specific proteins caused by limited proteolysis in fish brain cells. Presented results showed evident fact on the development of typical astroglial reaction against chronic effect aluminum chloride in a brain of fishes from distinct pelagic areas.

Key words: hydrobionts, oxidative stress, neurospecific proteins, glial fibrillary acidic protein GFAP, S100 β .

Алюминий – самый распространенный в природе металл. Включая алюмосиликаты – соединения, составляющие примерно 82% массы земной коры, число минералов, в состав которых входит алюминий, превышает 250. Как один из наиболее распространенных элементов земной коры, алюминий содержится практически во всех природных водоемах, в состав которых он попадает различными путями: при частичном растворении глин и алюмосиликатов, с атмосферными осадками, сточными водами, с промышленными отходами [1].

В современной токсикологии повышенные концентрации ионов алюминия рассматриваются в качестве наиболее опасного из «скрытых» неблагоприятных факторов окружающей среды. Токсическое действие