

На правах рукописи

БЕЛЯКОВА СВЕТЛАНА ВИКТОРОВНА

**ТЕСТЫ НА ОСНОВЕ СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ
ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В ЭКОЛОГИЧЕСКОМ КОНТРОЛЕ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

Специальность: 03.00.16 – Экология

АВТОРЕФЕРЕТ

диссертация на соискание ученой
степени кандидата химических наук

Казань - 2002

Работа выполнена на кафедре прикладной экологии экологического факультета
Казанского государственного университета

Научный руководитель: доктор химических наук,
доцент Евтюгин Г.А.

Официальные оппоненты: доктор химических наук,
профессор Евгеньев М.И.
(Казанский государственный технологический
университет)

кандидат биологических наук, старший научный
сотрудник Зобов В.В.

(Институт органической и физической химии
им.А.Е.Арбузова КНЦ РАН)

Ведущая организация: Институт экологии природных экосистем Ака-
демии наук Республики Татарстан

Защита диссертации состоится "___" _____ 2002 г. в 14 ч. в зале заседаний
диссертационного совета Д 212.080.02 в Казанском государственном технологи-
ческом университете по адресу: 420015, г.Казань, ул.К.Маркса, 68, зал заседаний
Ученого совета (А-330).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского государственного
технологического университета

Автореферат разослан "___" _____ 2002 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат технических наук,
доцент

А.С.Сироткин

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Современное развитие экологического мониторинга характеризуется приоритетным развитием обобщенных методов оценки состояния окружающей среды. В условиях постоянного увеличения числа контролируемых параметров, ужесточения санитарно-гигиенических норм присутствия загрязнителей в объектах контроля тест-методы позволяют быстро оценить потенциальную опасность загрязнения для человека и биосферы в целом, произвести скрининг биологической активности вновь синтезируемых соединений, установить источник и характер загрязнения. Предварительный контроль с использованием тест-методов не только позволяет выиграть время и тем самым предотвратить поступление токсикантов по трофическим цепям, но и существенно сократить себестоимость экологического контроля, исключив из последующего детального изучения заведомо нетоксичные пробы.

В средствах биохимической диагностики индикация загрязнения или присутствия биологически активного вещества основана на его вовлечении в ферментативную реакцию. Полученные результаты характеризуют тот потенциальный вред, который тестируемые соединения могут нанести живому организму. Детальная количественная оценка токсического эффекта не только расширяет сферу действия экологического мониторинга, но и позволяет решать задачи экотоксикологии, фармакологии и т.д. (экологическое нормирование, поиск новых лекарственных препаратов, установление механизма метаболической трансформации и токсикации живого организма).

Внедрение средств биохимической диагностики в практику экологического мониторинга требует в первую очередь решить вопросы надежности детектирования и интерпретации биохимического сигнала, расширения круга определяемых соединений, в том числе с использованием модификаторов, обеспечивающих селективность детектирования конкретных токсикантов. Необходимо также выработать алгоритмы скрининга биологической активности вновь синтезируемых соединений.

Цель настоящей работы - развитие теоретических и практических подходов к диагностике загрязнения окружающей среды и скринингу токсичности органических соединений с помощью стабилизированных препаратов холинэстеразы с фотометрическим и потенциометрическим детектированием сигнала.

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

- изучены операционные характеристики тестов на основе холинэстеразы, включенной в состав водорастворимого стабилизатора - N-фталилхитозана, в опреде-

лении ингибиторов фермента в модельных растворах и объектах окружающей среды;

- установлено влияние макрокомпонентов объектов окружающей среды (почвы, зерно, виноградный сок, осадки сточных вод) на чувствительность и селективность определения фосфорорганических пестицидов с помощью разработанных тестов, предложить новые способы пробоподготовки, нивелирующие обнаруженное влияние матрицы сложных объектов;

- предложены подходы к скринингу токсического действия новых синтезированных элементоорганических соединений, не являющихся специфическими ингибиторами холинэстеразы;

- разработаны способы биохимической регистрации образования комплексов типа "гость-хозяин" с участием 1,3-дизамещенных каликсаренов и их тиааналогов, обосновать механизм влияния каликсаренов -комплексообразователей на активность нативной холинэстеразы, а также предложить методики фотометрического и потенциометрического определения органических соединений, участвующих в формировании комплексов.

Научная новизна работы заключается в том, что:

- определены рабочие условия прямого обнаружения и полуколичественной оценки содержания пестицидов антихолинэстеразного действия в растительных и почвенных экстрактах, виноградном соке и осадках сточных вод без предварительного концентрирования пробы;

- впервые установлено влияние процессов ионного обмена и миграции подвижных форм металлов на ингибирующее действие осадков сточных вод и почв и на этой основе предложено использовать показатели степени ингибирования в различных режимах пробоподготовки для предварительной обобщенной характеристики загрязненности объектов контроля;

- впервые установлен факт ингибирования холинэстераз 1,3-замещенными каликсаренами, предложен механизм ингибирования, включающий кооперативное взаимодействие комплекса типа "гость-хозяин" между субстратом и каликсареном и активного центра фермента без образования ковалентных связей или электростатического взаимодействия;

- впервые количественно охарактеризовано антихолинэстеразное действие фосфорилированных производных оксиндола и изатина, семичленных ацеталей производных витамина В6 и дельдрина, предложены методологические подходы к оценке механизма ингибирования и количественной оценке ингибирующего эффекта.

Практическая значимость работы состоит в том, что:

- разработаны простые и удобные в использовании ферментные тесты на основе коммерческих препаратов холинэстераз, включенных в водорастворимые пленки на основе фталилхитазана, и фотометрических и потенциометрических способов детектирования, отличающиеся повышенной стабильностью при хранении и использовании;
- предложены методики высокочувствительного детектирования остаточных количеств фосфорорганических соединений в объектах окружающей среды на уровне установленных норм, а также оценки общей загрязненности почв и осадков сточных вод подвижными формами тяжелых металлов без трудоемких способов пробоподготовки;
- разработаны алгоритмы оценки экотоксикологических характеристик и скрининга биохимической активности новых синтезированных органических веществ, содержащих несколько потенциальных центров связывания с ферментом.

На защиту выносятся:

- результаты исследования влияния макрокомпонентов матрицы на результаты определения пестицидов с помощью ферментных тестов на основе стабилизированных препаратов холинэстеразы и вывод о возможности прямого детектирования их количеств на уровне ПДК без концентрирования экстрактов или их очистки;
- обоснование возможности применения ферментных тестов для обобщенной оценки загрязнения почв и осадков сточных вод подвижными формами тяжелых металлов;
- сравнительное исследование процессов комплексообразования индофенилацетата различными 1,3-замещенными каликсаренами физико-химическими и биохимическими методами и обоснование кооперативного механизма ингибирования в системе каликсарен - холинэстераза - субстрат без образования ковалентных связей с активным центром фермента;
- влияние присутствия органических кислот и их эфиров, способных связываться с каликсаренами, на их ингибирующую способность и способ определения молекул – "гостей" по их либеративному действию на ингибированную холинэстеразу.
- результаты скрининга антихолинэстеразной активности производных изатина и оксиндола, семичленных ацеталей производных пиридоксина и дельдрина и подходы к определению центров связывания и механизма ингибирования холинэстераз полифункциональными неспецифическими ингибиторами.

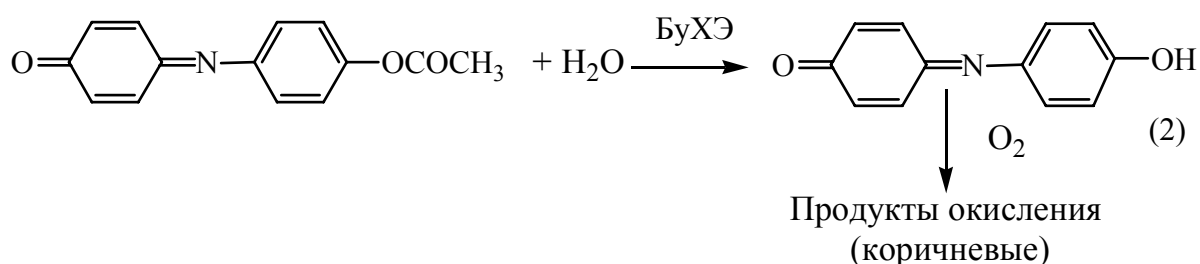
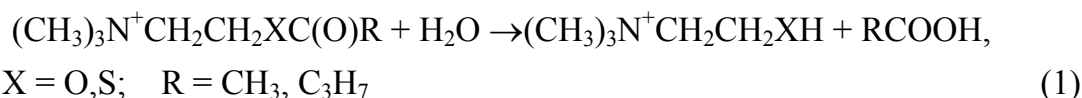
Апробация работы. Результаты исследований докладывались на Итоговых научных конференциях Казанского государственного университета (2000, 2001 гг.), Всероссийской конференции "Химический анализ веществ и материалов" (Москва, 2000 г.), Российско-германском симпозиуме "Биосенсоры для экологического мониторинга" (Иркутск, 2000 г.), Международном симпозиуме "Молекулярный дизайн и синтез супрамолекулярных структур" (Казань, 2000 г.), 11 Российско-японском симпозиуме по аналитической химии (Москва, 2000 г.), 1 Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра КГУ "Материалы и технологии XXI века" (Казань, 2000), 7 Симпозиуме по кинетическим методам анализа (Бухарест, 2001), Всероссийском симпозиуме по тест-методам анализа (Москва, 2001).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 2 статьи и 7 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 151 странице машинописного текста, включает 31 рисунок и 20 таблиц. Состоит из Введения, 4 глав, Выводов и Списка использованных библиографических источников, включающего 173 ссылки на отечественные и зарубежные работы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

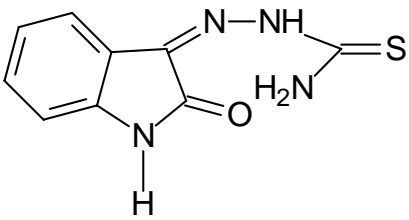
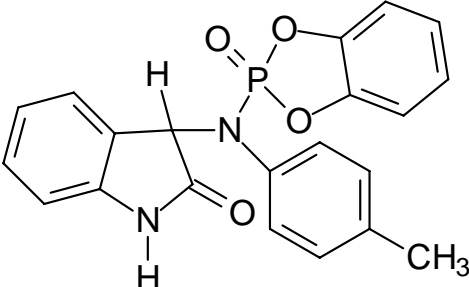
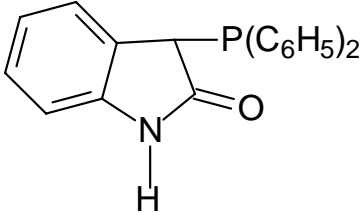
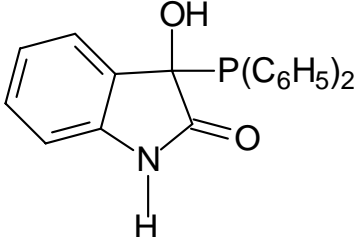
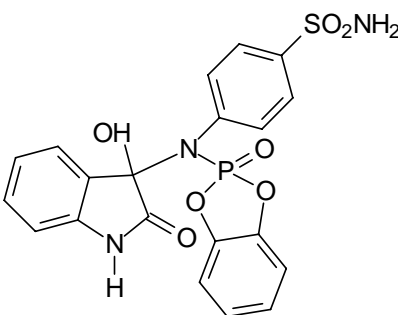
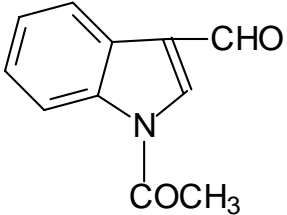
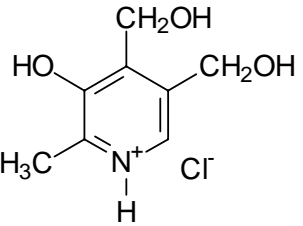
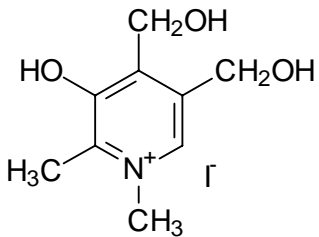
Использовали препараты бутирилхолинэстеразы (БуХЭ, К.Ф. 3.1.1.8) из сыворотки крови лошади ("Биомед", г.Пермь) с удельной активностью 4.2 ± 0.2 Е/мг белка, включенные в водорастворимые пленки на основе N-фталлилхитазана. В качестве субстратов использовали индофенилацетат (ИФА) и эфиры холина. Мерой скорости ферментативной реакции (1,2) служило время перехода окраски раствора t , отвечающее 30% конверсии субстрата. Измерения проводили с помощью фотоколориметрического анализатора АКИ-Ц-01 ("Биомашприбор", г.Йошкар-Ола).

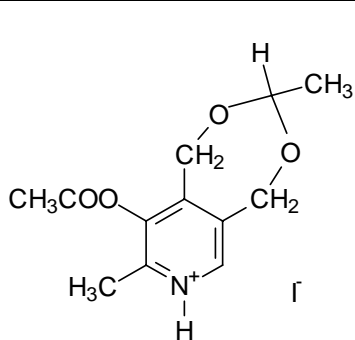


Потенциометрические измерения с помощью иономера И-130 ("Измеритель", г.Гомель). Изученные соединения - неспецифические ингибиторы БУХЭ - приведены в табл.1. Производные индола были переданы для исследований проф. Гуревичем П.А., семичленные кетали - ст.н.с.Штырлиным Ю.Г., каликсарены и их тиоаналоги - ст.преп.Стойковым И.И.

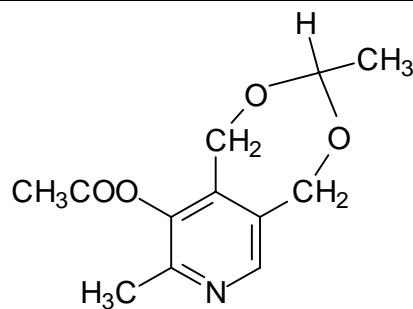
Таблица 1

Структура и шифры исследованных соединений

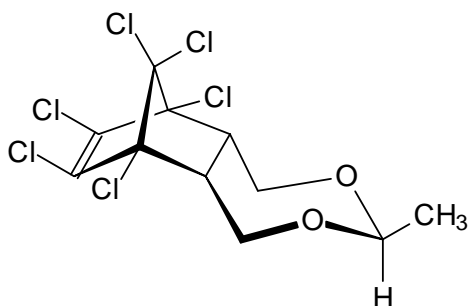
Производные оксиндола и изатина			
	3		6
	4		7
	5		8
Семичленные кетали - производные дельдрина и витамина В6			
	9		10



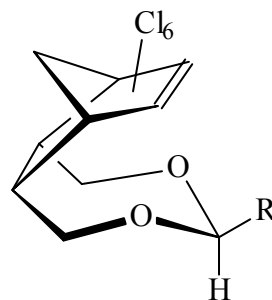
11



12



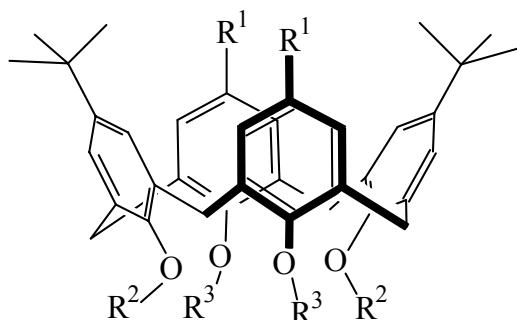
13



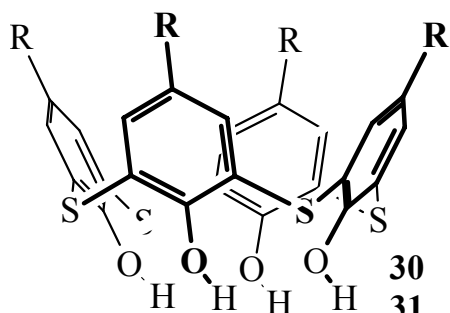
14

(R = CH₃,
R = H)

1,3-замещенные калексарены и их тиопроизводные

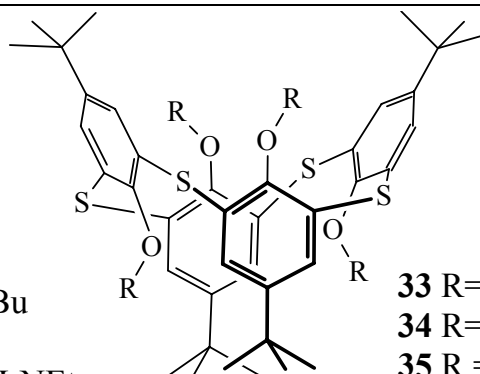


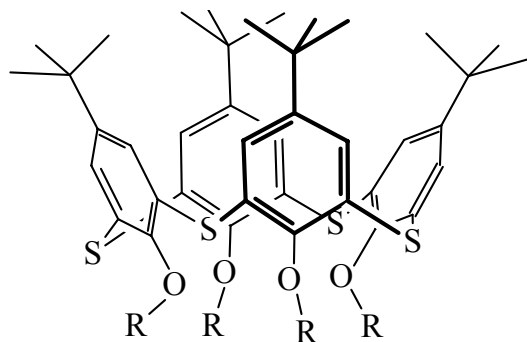
- 15 R¹=-t-Bu, R²= H, R³=-9-CH₂-флуоренил,
 16 R¹=-t-Bu, R²= H, R³=-4-CH₂-C₆H₄-NO₂,
 17 R¹=-t-Bu, R²= H, R³=-4-CH₂-C₆H₄-CN,
 18 R¹=-t-Bu, R²= H, R³=-t-CH₂-CH=CH-Ph,
 19 R¹=-t-Bu, R²= H, R³=-CH₂-Ph,
 20 R¹=-t-Bu, R²= H, R³=-4-CH₂-C₆H₄-COOEt,
 21 R¹=-t-Bu, R²= H, R³=-2-CH₂-нафтил,
 22 R¹=-NO₂, R²= -CH₂-Ph, R³= H

23 R¹=-t-Bu, R²=R³=-CH₂-COOEt,24 R¹=-t-Bu, R²=R³=-CH₂-C(O)NHCH₂Ph25 R¹=-t-Bu, R²=R³=-CH₂CH₂NHC(O)Ph26 R¹=-t-Bu, R²=R³=-CH₂-CH₂-NH₂27 R¹=-CH₂-N(C₂H₅)₂, R²=R³=H28 R¹=-t-Bu, R²=R³=-CH₂-CH₂-CH₂-CN29 R¹=-t-Bu, R²=R³=-CH₂-C(O)-CH₃

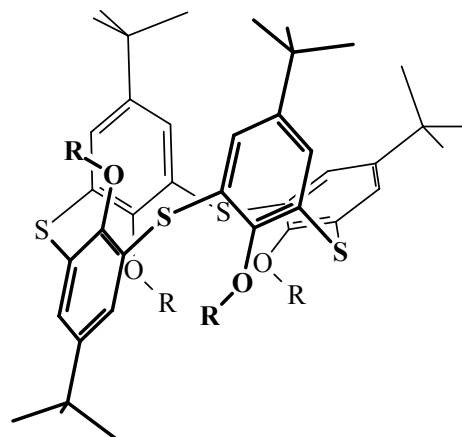
30 R=-t-Bu

31 R=H

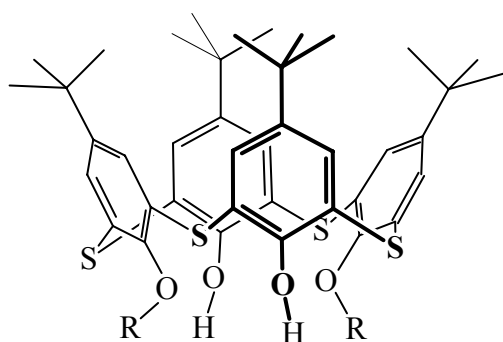
32 R=-CH₂NEt₂33 R=-CH₂C(O)NEt₂34 R=-CH₂C(O)CH₃35 R=-CH₂C(O)NH₂36 R=-CH₂C(O)Ph



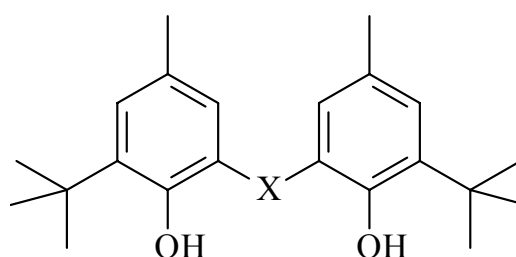
37 R=-CH₂-C(O)-Ph



38 R=-CH₂-C(O)Ph



39 R=-CH₂-C(O)-Ph



40 X=CH₂ 41 X=S

ХОЛИНЭСТЕРАЗНЫЕ ФОТОКОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ В КОНТРОЛЕ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Стабилизация БуХЭ в N-фталхитазане позволяет проводить быстрое и надежное определение ингибирующего действия токсикантов в течение по меньшей мере полугода при хранении тестов при 4°С в сухом виде. Некоторые характеристики теста приведены в табл.2.

Предварительно были установлены характеристики определения пестицидов в водных модельных растворах. Тионовые пестициды перед инкубированием электрохимически окисляли до кислородных аналогов. Все изученные фосфорорганические пестициды оказывают строго необратимое ингибирующее действие в диапазоне концентраций $n \times (10^{-9} - 10^{-6})$ М. По достигнутым пределам обнаружения изученные токсиканты располагаются в ряд, соответствующий изменению значений их ПДК: базудин < фозалон \approx малатион < кумафос \approx хлорпирифос < гутион < паратион-метил < трихлорфон.

Таблица 2

Операционные характеристики холинэстеразных тестов

Удельная активность БуХЭ, мг / ячейку планшета	0.05
Е / ячейку планшета	0.12
Скорость растворения ферментсодержащей пленки, мин. Свежеприготовленного планшета	2
Через 3 месяца хранения	3
Величина сигнала (время перехода окраски, отвечающего 30% конверсии субстрата), с Свежеприготовленного планшета	10-15
Через 3 месяца хранения	35-45
Относительная погрешность измерения отклика, % для 6 измерений на одном планшете (P 0.90) Свежеприготовленного планшета	3
Через 3 месяца хранения	4.5

Единственным исключением явился пиримифос-метил. Предел его обнаружения (1.3×10^{-5} М) почти в 100 раз выше ПДК, что, возможно, связано с его частичным разрушением в процессе пробоподготовки. В присутствии 10-15% ацетона и этанола время перехода окраски теста увеличивается по сравнению с контролем на 10-20 %, а при использовании ацетонитрила - снижается на 5-15%. Добавки указанных растворителей не меняют наклона градуировочных зависимостей пестицидов, но повышают пределы их обнаружения. Кроме того, присутствие ацетонитрила несколько сокращает время, необходимое для окисления тионового пестицида. Активирующее влияние ацетонитрила и ингибирующее влияние пестицида аддитивно складываются и описываются единым градуировочным уравнением.

Растительная продукция. Разработана методика прямого определения присутствия пестицидов в органических экстрактах после их предварительного разбавления до конечного содержания растворителя 15 об.%. Экстракция в течение 10 мин ацетонитрилом позволяет извлечь до 60% пестицидов, ацетоном и этанолом - до 40 %. В качестве примера на рис.1 представлены результаты определения хлорпирифоса в зерне. С учетом разбавления экстракта методика позволяет детектировать присутствие до 0.1 мг/кг изученных пестицидов. Степень извлечения (по данным ГЖХ) и чувствительность ферментативного определения пестицидов снижаются с уменьшением содержания масла в культуре. Природные ингибиторы фермента (катехоламины) при 10 минутной экстракции на сигнал не влияют.

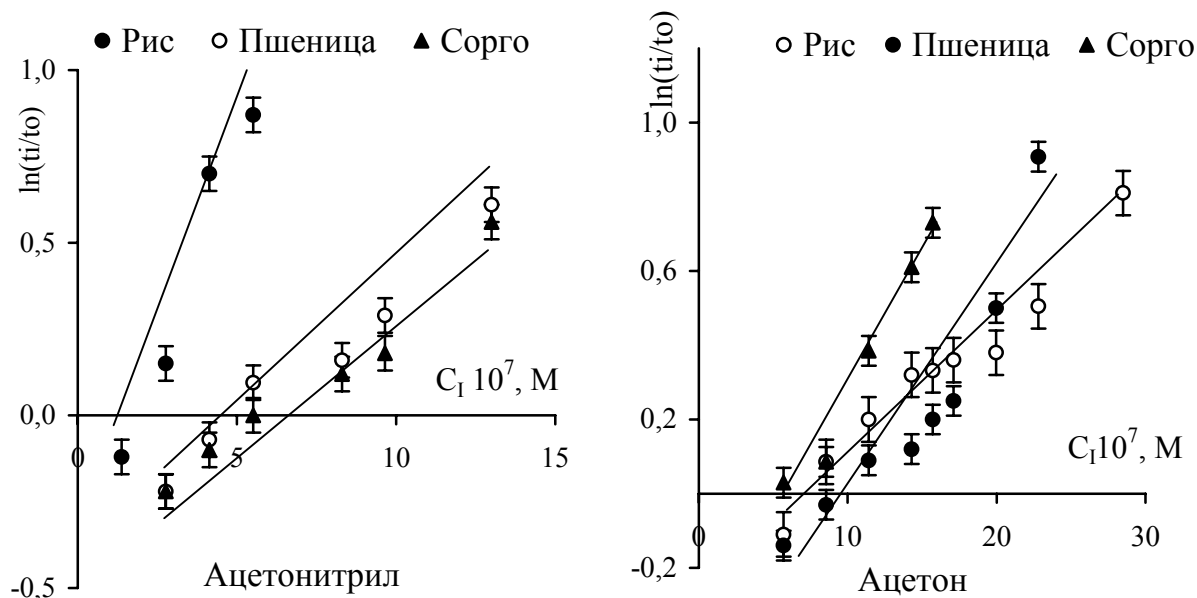


Рисунок 1. Определение хлорпирифоса в зерне риса, пшеницы и сорго при экстракции ацетонитрилом и ацетоном

Аналогичным образом проводилось определение остаточных количеств пестицидов в виноградном соке. Для повышения чувствительности определения окисление пестицидов проводили непосредственно в неразбавленном соке, при этом из-за высокого содержания фенольных соединений продолжительность электрохимического окисления была увеличена до 8 мин.). Минимально определяемые содержания пестицидов в белом виноградном соке составили 1×10^{-6} М для кумафоса и 8×10^{-8} М для хлорпирифос-метила.

Почвы и осадки сточных вод. При использовании фосфатного буферного раствора металлы, содержащиеся в почвах, не оказывают значимого влияния на скорость ферментативной реакции. Экстракция пестицидов позволяет извлечь до 40% их количеств. При содержании пестицидов свыше 0.6 мг/кг ингибирование БуХЭ перестает меняться, что связано, возможно, с влиянием соэкстрагируемых органических компонентов на эффективность электрохимического окисления тионовых пестицидов.

Проведение ферментативной реакции в трис-буферном растворе позволяет выявить вклад подвижных форм металлов. Для образцов почв, отобранных в г.Казани, с увеличением расстояния от автомобильных магистралей ингибирующее действие водного и кислотного экстрактов из почв закономерно снижается. Установлена корреляция между величиной степени ингибирования БуХЭ

I,%, и суммарным содержанием ΣC_{Me} подвижных форм кадмия, цинка и свинца в почвенном покрове, мг/кг, определенным методом ААС, для почв юго-востока Татарстана.

$$I, \% = 0.9 \times \Sigma C_{Me} - 1.2, r = 0.9755 \quad (1)$$

При внесении солей металлов в водные экстракты из осадков сточных вод их ингибирующее действие снижается при сохранении конкурентного механизма ингибирования. Если же соли металлов добавлять непосредственно в осадки в количестве до 10 мг/кг, получаемые экстракты практически не ингибируют фермент. В некоторых случаях наблюдается увеличение скорости реакции. Это связано с обменными процессами, протекающими между органическим веществом осадка и ионами металлов, и связано с высвобождением ионов кальция и магния - активаторов БуХЭ. В подтверждение данного механизма влияние экстрактов на БуХЭ зависит от минерализации осадков (времени хранения) и условий обработки: электролиз, разрушая органические комплексы, снижает влияние экстрактов, а увеличение продолжительности инкубирования экстракта и БуХЭ - увеличивает (рис.2).

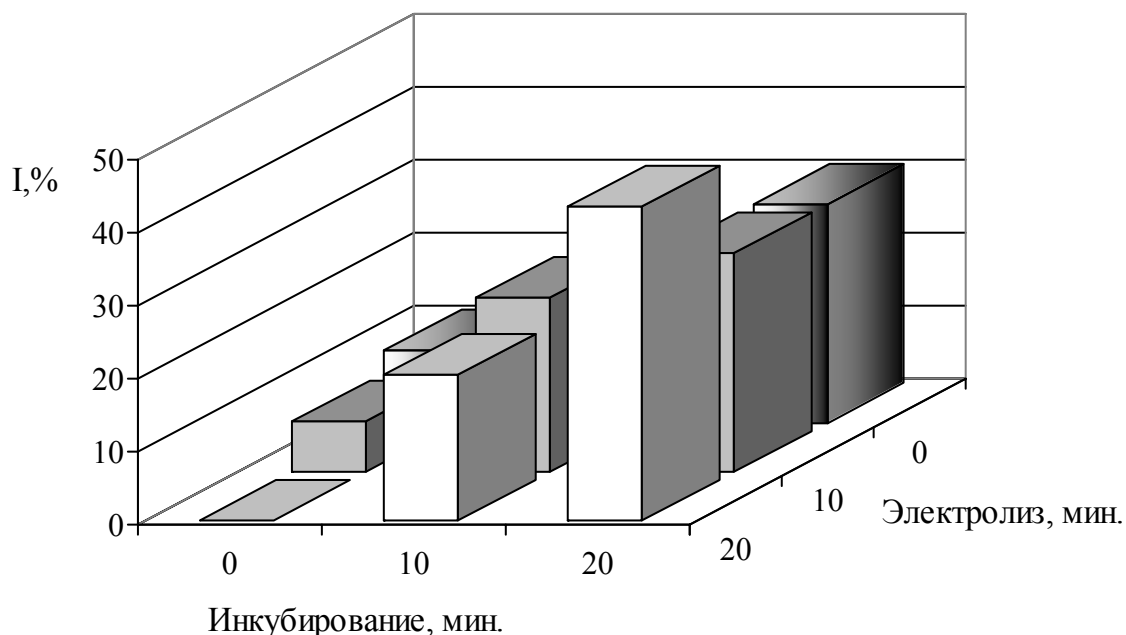


Рисунок 2. Влияние условий пробоподготовки на ингибирующее действие ацетонового экстракта из осадков сточных вод очистных сооружений г.Казани

Полученные результаты позволяют использовать разработанные ферментные тесты для оценки подвижности тяжелых металлов в почвах и осадках сточных вод. Установлена также корреляция показателей антихолинэстеразной ак-

тивности ацетоновых экстрактов из осадков сточных вод и острой токсичности экстрактов для *Paramecium caudatum* (экспозиции 1 час).

СКРИНИНГ АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Ингибирование БуХЭ может рассматриваться в системе биотестирования объектов окружающей среды как миграционный показатель токсичности при переносе загрязнителей к высшим животным. Разнообразие факторов, влияющих на активность фермента, позволяет использовать разработанные тесты не только для оценки воздействия на передачу нервного импульса, но и обобщенной оценки биологической активности новых синтезированных соединений, предлагаемых для внедрения в промышленность.

Производные индола играют важную роль в жизнедеятельности живых организмов, многие их производные используются как красители, лекарственные препараты, стимуляторы роста растений. Нами обнаружено ингибирующее действие производных **3-8** в различных условиях измерения сигнала (табл.3).

Таблица 3

Ингибирующее действие производных изатина и оксиндола

№	$t_i/t_0 = a + b \times (C_I, \text{мМ})$			$C_{\text{min}}, \text{мМ}$	$pI_{50}, \text{М}$	Диапазон определяемых концентраций, мМ
	a	b	r^2			
3	0.87±0.09	3.53±0.25	0.9873	0.3	3.0	0.4-1.7
4	1.08±0.04	0.86±0.15	0.9534	0.2	3.0	0.4 -6.3
5^{†)}	-0.06±0.2	2.35±0.15	0.9900	0.03	-	0.07-0.26
6[*])	0.96±0.04	2.19±0.11	0.9969	0.5	3.3	0.8-8.2
7	1.06±0.02	3.45±0.53	0.9657	0.2	2.9	0.3-3.0
7[*])	1.04±0.03	3.44±0.44	0.9766	0.15	3.0	0.17-0.70
8	1.11±0.03	0.50±0.10	0.9259	0.2	2.7	0.6-6

([†]) Инкубирование в отсутствие субстрата, $\ln(t_i/t_0) = a + b \times (C_I, \text{мМ})$

(^{*}) После предварительного электрохимического окисления

Ингибирующее действие соединений **3,4** и **7** обусловлено с процессами карбамоилирования БуХЭ и конкурентного действия сульфамидной и фосфо-

ниевой группировки и не связано с реакциями фосфорилирования. В подтверждение этого циклические фосфаты и фосфонаты, не содержащие активных заместителей, активность БуХЭ не меняют. Электрохимическая активация увеличивает антихолинэстеразное действие изученных соединений, по-видимому, за счет изменения механизма ингибирования: окисление инициирует фосфонат-фосфатную перегруппировку и облегчает фосфорилирование активного центра фермента. Соединения **5,7** по своему токсическому действию сопоставимы с такими инсектицидами, как октаметил или хлорофос. Важно также, что данные соединения повышают свое антихолинэстеразное действие в результате окисления. Данная процедура моделирует метаболическую активацию токсикантов, которую сложно оценить в лабораторных тестах.

Семичленные ацетали - производные пиридоксина **11,12** и дельдрина **13,14** - демонстрируют неконкурентное ингибирование в диапазоне концентраций 0.06-4.0 мМ (табл.4).

Таблица 4

№	Ингибирующее действие семичленных ацеталей			C_{min} , мМ	Диапазон определяемых концентраций, мМ
	$\ln(t_i/t_0) = a + b \times (C_1, \text{мМ})$				
	a	b	r^2		
11	0.043±0.041	0.10±0.02	0.9494	0.1	0.2-4.0
12	0.017±0.028	0.60±0.06	0.9789	0.05	0.06-0.6
13	1.03±0.04	1.0±0.14	0.9755	0.07	0.1-0.7
14	1.01±0.03	1.3±0.13	0.9851	0.05	0.07-0.6

При переходе от исходных производных пиридоксина **9,10** к циклическим производным **11,12** ингибирующее действие резко возрастает, что связано со стерическим ограничением доступа молекулы ингибитора в складку белковой глобулы вблизи активного центра БуХЭ. Для производных дельдрина **13,14** ингибирование связано с неспецифическими гидрофобными взаимодействиями с остатками аминокислот, выстилающими вход к активному центру фермента. Стерическое ограничение доступа субстрата без образования ковалентных связей с активным центром объясняет неконкурентный характер ингибирования: включение ИФА в состав фермент-субстратного комплекса сохраняет возможность ориентации ацеталей по гидрофобным остаткам вблизи активного центра, т.е. возможность проявления ингибирующего действия. В силу неспецифического характера связывания не удастся также разделить диастереомеры производ-

ных дельдрина: несмотря на низкие действующие концентрации, они оказывают в целом сходный ингибирующий эффект на БуХЭ.

1,3-дизамещенные каликс[4]арены и их тиоаналоги. Нами было впервые установлено ингибирующее действие ряда каликс[4]аренов на БуХЭ при использовании в качестве субстрата ИФА (табл.5).

Таблица 5

Ингибирующее действие 1,3-замещенных каликс[4]аренов на БуХЭ,
фотометрическая регистрация сигнала, $t_i/t_0 = a + b \times (C_i, \text{мкМ})$

№	a	b	r	Диапазон определяемых концентраций, мкМ
15	0.90±0.09	0.0160±0.0013	0.9820	12-100
16	1.06±0.14	0.0093±0.0008	0.9846	20-320
17	1.05±0.34	0.0083±0.0019	0.9310	80-180
18	0.93±0.03	0.0084±0.0002	0.9990	60-280
19	1.02±0.04	0.014±0.003	0.9809	13-120
20	0.82±0.10	0.021±0.002	0.9656	10-46
21	1.07±0.02	0.0148±0.0007	0.9922	10-55
22	0.79±0.03	0.0193±0.0067	0.9207	15-65
23	1.04±0.06	0.022±0.002	0.9832	15-50
24	1.10±0.03	0.012±0.001	0.9942	2-100
25	0.98±0.01	0.0013±0.0001	0.9328	-
26	0.96±0.02	0.0029±0.0002	0.9950	14-100
29	0.95±0.04	0.042±0.004	0.9912	2.4-18
30	0.40±0.37	0.009±0.001	0.9434	70-350
31	0.93±0.04	0.003±0.0015	0.9532	70-400
33	0.81±0.05	0.031±0.002	0.9901	13-34
34	1.1±0.02	0.016±0.002	0.9765	2-20
35	0.85±0.05	0.041±0.005	0.9824	2-20
36	1.06±0.018	0.020±0.002	0.9755	1.7-13
37	1.09±0.03	0.0030±0.0005	0.9734	2-8.5
38	1.02±0.004	0.0029±0.0001	0.9923	1.7-8.4
39	1.0±0.01	0.028±0.002	0.9951	2-10

Анализ данных ИК- и ЯМР ^1H спектров показал, что субстрат образует с изученными каликсаренами комплекс "гость-хозяин", в котором ИФА располагается вне полости в молекулярной щели, образуемой заместителями нижнего обода (рис.3). Координация молекулы "гостя" обеспечивает образование водородных связей с участием гидроксильных групп калисарена и π -стекинг взаимодействием ароматических систем заместителей R^2 и ИФА (R). Сходное строение имеют также комплексы изученных каликсаренов с бензойной кислотой и глицином. Анализ зависимости степени ингибирования БуХЭ от концентрации субстрата и каликсарена показал конкурентный характер ингибирования, что предполагает взаимодействие реагентов с одним и тем же центром связывания фермента. Это позволило предложить механизм ингибирования, включающий кооперативное взаимодействие всех трех компонентов реакции.

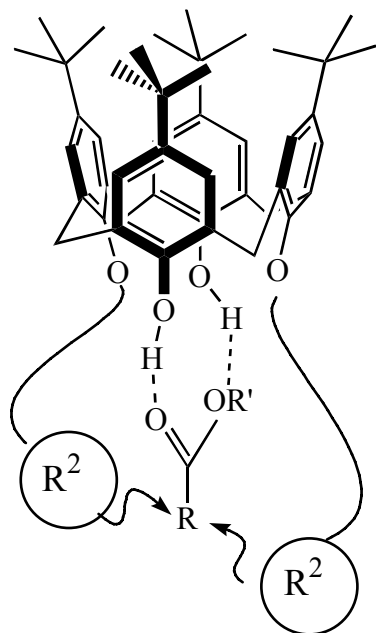


Рисунок 3. Строение комплекса "гость-хозяин"

Комплекс, образуемый в растворе, вовлекается в складку на поверхности белка, каликсареновая платформа плотно закрывает вход к активному центру за счет гидрофобных взаимодействий с остатками триптофана, выстилающими стенки складки, и объемных трет-бутильных радикалов, ограничивающих продвижение комплекса вглубь белковой глобулы. Предлагаемый механизм хорошо объясняет зависимость ингибирующего действия каликс[4]аренов от строения радикалов R^2 : увеличение длины алифатических линкеров, включение полярных заместителей в состав бензильного фрагмента снижает степень ингибирования БуХЭ. При использовании в качестве субстрата эфиров холина, не способных координироваться по нижнему ободу, ингибирующего действия каликс[4]аренов не наблюдалось. Механизм ингибирования подтверждает также влияние органических кислот, вытесняющих ИФА из состава комплекса. Глицин и бензойная кислота снижают чувствительность определения каликс[4]аренов и увеличивают пределы их обнаружения. Ингибирующее действие amino- и амидопроизводных **24-26** снижается также в присутствии ионов переходных металлов. Минимальные концентрации ионов металлов, снижающие действие каликс[4]аренов, составляют

0.04-10 мкМ, что сопоставимо с чувствительностью их электрохимического определения.

Поведение тиокаликс[4]аренов осложняется их конформационной лабильностью. Замена метиленовых групп на атомы серы увеличивает размер полости и способствует более плотному контакту тиокаликсарена с БуХЭ. В результате тиоаналоги сильнее снижают активность фермента по сравнению с традиционными каликсаренами. 1,3-Альтернаты дают возможность координации ИФА между заместителями, поэтому их ингибирующее действие сохраняется. Дизамещенные тиокаликс[4]арены в конформации "частичный конус", как и тетразамещенные тиокаликс[4]арены, БуХЭ практически не ингибируют.

Реализация предложенного механизма взаимодействия в системе БуХЭ - ИФА - каликс[4]арен предполагает выполнение определенных условий: соответствие размеров каликсареновой платформы и складки в области активного центра БуХЭ, определенное расстояние между ИФА и полостью каликсарена в комплексе, обеспечивающее плотный контакт со стенками складки белковой глобулы. Обнаруженное действие каликс[4]аренов позволяет расширить спектр соединений, определяемых с помощью холинэстеразной индикаторной реакции.

Были предприняты также попытки потенциометрической регистрации сигнала БуХЭ в присутствии каликс[4]аренов с помощью графитового электрода, модифицированного полианилином. Сенсор позволяет регистрировать изменение редокс-потенциала раствора в ходе ферментативной реакции. В качестве субстрата БуХЭ использовали эфиры тиохолина. Изученные каликс[4]арены при содержании в $n \times (10^{-7} - 10^{-5})$ М и тиокаликсарены в наномолярных концентрациях оказывают активирующее действие на БуХЭ. Регистрируемое изменение потенциала электрода после добавления субстрата было в 1.5-2.5 раза выше отклика в отсутствие комплексообразователей. Все указанные явления вызваны, по видимому, сорбцией реагентов на поверхности сенсора и их влиянием на редокс-процессы с участием тиохолина, образующегося в ферментативной реакции.

Вещества, связывающиеся с каликс[4]аренами в комплексы типа "гость-хозяин", меняют координацию каликс[4]арена на поверхности сенсора и подавляют активирующий эффект. Так, добавление 5×10^{-5} М глицина или бензойной кислоты в 2-5 раз снижает активирующий эффект каликс[4]аренов **15,16** и **26**. Также происходит подавление острых максимумов сигнала, наблюдающихся у тиокаликс[4]аренов в области наномолярных концентраций. Сходным образом действуют ионы металлов. В концентрациях $n \times 10^{-8}$ М ионы серебра и ртути (II)

полностью нивелируют влияние каликс[4]аренов на активность БуХЭ во всем диапазоне концентраций субстрата и каликсарена.

Полученные результаты могут составить основу для создания ферментных сенсоров для экспресс-определения как самих каликсаренов, применяемых в мембранных технологиях очистки сточных вод от тяжелых металлов, так и соединений - "гостей", участвующих в комплексообразовании. Подобные сенсоры с широким спектром действия имеют перспективы использования в программах биохимического и экологического мониторинга.

ВЫВОДЫ

1. Стабилизация бутирилхолинэстеразы в водорастворимых пленках на основе N-фталилхитазана в сочетании с фотометрической регистрацией скорости ферментативного гидролиза субстрата - индофенилацетата - позволяет надежно обнаруживать и полуколичественно определять остаточные количества пестицидов антихолинэстеразного действия в почвах, зерне и виноградном соке на уровне установленных максимально допустимых уровней. Найденные оптимальные условия измерения в сочетании с электрохимического предобработкой пробы позволяют полностью исключить влияние компонентов матрицы и необходимость в удалении органического экстрагента и иных способов концентрирования.
2. Внесение известных количеств солей металлов в почвы и осадки сточных вод с последующей экстракцией показало, что ингибирующее действие экстрактов на холинэстеразу обусловлено содержанием подвижных форм металлов и зависит от соотношения процессов гидролиза и включения ионов металлов в состав комплексов с экстрагируемыми органическими компонентами. Установлена корреляция между степенью ингибирования холинэстеразы и суммарным содержанием подвижных форм наиболее токсичных металлов в водных экстрактах почв юго-востока Татарстана. Это позволяет предложить разработанные ферментные тесты для обобщенной характеристики сильного загрязнения почв и осадков сточных вод, а также выявления потенциальной опасности миграции токсикантов антихолинэстеразного действия в сопредельные среды.
3. На основании комплекса физико-химических и биохимических исследований установлен механизм впервые обнаруженного ингибирующего действия 1,3-дизамещенных каликсаренов на холинэстеразу. Как показано, кооперативное взаимодействие комплекса "гость-хозяин" с участием каликсарена и индофенил-

ацетата с ферментом приводит к стерическому блокированию доступа субстрата к активному центру без образования с ним ковалентных или иных связей.

4. Предложен новый подход к тестированию биологически активных соединений, основанный на сочетании принципов молекулярного распознавания с участием функционализированных каликсаренов и биохимической регистрации образования комплексов "гость-хозяин". На примере органических кислот (глицин, бензойная кислота) и ионов металлов показано возможность обнаружения биологически активных веществ, не являющихся специфическими ингибиторами холинэстераз.

5. Проведен скрининг антихолинэстеразной активности фосфорилированных производных индола и семичленных ацеталей производных витамина В6 и дельдрин, позволивший выявить механизм взаимодействия полифункциональных соединений с ферментом и количественно охарактеризовать ингибирующее действие изученных соединений.

6. Разработан комплекс простых методик пробоподготовки и кинетического анализа ингибирования, позволяющий модифицировать разработанные ферментные тесты для решения задач биохимического мониторинга различных объектов окружающей среды и направленно регулировать чувствительность ферментных тестов в отношении приоритетных токсикантов в зависимости от требований чувствительности их обнаружения и влияния компонентов матрицы объектов контроля.

Основные результаты работы изложены в публикациях:

1. Evtugyn G.A., Stoikova E.E., Budnikov H.C., Beljakova S.V., Latipova V.Z. Development of enzyme biosensing devices for the direct monitoring of soil and sewage sludge pollution in field. / "New Trends in Biosensor Development" Program and Abstract of NATO Advanced Research Workshop. Kiev (Vorzel), Ukraine, July 6-9, 1998. P.65.

2. Budnikov H.C., Evtugyn G.A., Stoikova E.E., Beljakova S.V. Cholinesterase biosensing devices for the detection of environmental pollutants in field. / INCO-Copernicus Meeting "Biosensors for direct determination of environmental pollutants in field". 1999. Otrokovice, Chechia. P.19.

3. Стойкова Е.Е., Белякова С.В., Будников Г.К., Евтюгин Г.А. Ферментные тест-системы для определения остаточных количеств фосфорорганических пест-

тицидов в растительном материале. / Всерос.конф. "Химический анализ веществ и материалов." Москва, 16-21 апреля 2000. С.128.

4. Стойкова Е.Е., Евтюгин Г.А., Белякова С.В., Хрусталеv А.А., Антипин И.С., Будников Г.К., Коновалов А.И. Специфическое связывание 1,3-замещенных п-трет-бутилкаликс[4] аренов с бутирилхолинэстеразой. / 1 Научн. конф. мол. ученых, асп. и студ. научно-образовательного центра КГУ "Материалы и технологии XXI века" Тез.докл. Казань, 20-21 октября 2000 г. С.93.

5. Evtugyn G.A., Ivanov A.N., Beljakova S.V., Budnikov H.C., Vinter V.G. Disposable cholinesterase sensors for the general estimation of environmental pollutants. / Russian-German International Scientific Workshop "Biosensors for Environmental Monitoring". Irkutsk, 21-26 July 2000, P.36-37.

6. Евтюгин Г.А., Стойкова Е.Е., Белякова С.В., Стойков И.И., Будников Г.К., Антипин И.С. Каликсарены и ферментные тесты – новые перспективы. / Всероссийский симпозиум "Тест-методы химического анализа". Москва 28-30 ноября 2001 г. Л7.

7. Evtugyn G.A., Stoikova E.E., Stoikov I.I., Beljakova S.V., Budnikov H.C., Antipin I.S. A novel approach to the determination of organic compounds based on biochemical detection of host-guest complexation. / 7th Intern.Symp.on Kinetics in Analytical Chemistry, 26-29 Sept. 2001, Bucharest, Romania, Book of Abstracts, O13.

8. Beljakova S.V., Stoikova E.E., Evtugyn G.A., Latypova V.Z. Enzymatic test kit for the rapid and sensitive detection of insecticides in the corn. // Environ. Radioecol. Appl. Ecol. 2001. V.7. №2 P. 35-42.

9. Stoikova E.E., Evtugyn G.A., Beljakova S.V., Khrustalev A.A., Stoikov I.I., Antipin I.S., Budnikov H.C., Konovalov A.I. 1,3-Disubstituted p-tert-butylcalix[4]arenes as cholinesterase inhibitors.// J. Inclusion Phenomena. 2001. Vol.39. № 3-4. P.339-346.

Соискатель

Белякова С.В.