

Биокатализ: современные проблемы и приложения

С.Д.Варфоломеев,^{a,b} В.К.Швядас,^c Е.Н.Ефременко,^a А.М.Егоров,^a М.Г.Хренова,^a В.И.Тишков,^a Д.Л.Атрошенко,^{a,d} А.А.Пометун,^{a,d} С.С.Савин,^a Н.Н.Угарова,^a Г.Ю.Ломакина,^a И.В.Гачок,^a И.В.Лягин,^a В.И.Муронец,^e А.П.Синицын,^{a,d} О.А.Синицына,^a А.М.Рожкова,^{a,d} Г.Ф.Махаева,^f С.О.Бачурин,^f О.И.Лаврик,^g Д.О.Жарков,^g А.В.Юдкина,^g О.М.Панасенко,^h А.А.Байков,^c П.Массон,ⁱ Т.Н.Паширова,^j З.М.Шайхутдинова,^{i,j} Е.В.Попова,^a В.Е.Тихомирова,^a О.А.Кост,^a Е.В.Кудряшова,^a Н.В.Добрякова,^a Н.Л.Клячко,^a М.М.Веселов,^a А.В.Лопухов,^a И.М.Ле-Дейген,^a А.Д.Усвалиев,^a Ю.В.Чудосай,^a Н.Л.Еремеев,^a М.Э.Зверева,^a М.Ю.Рубцова,^a М.М.Уляшова,^a Г.В.Преснова,^a Л.В.Сиголаева,^a Д.В.Пергушов,^a И.Н.Курочкин,^{a,b} Е.Г.Евтушенко,^{a,b} И.А.Богинская,^k Ю.Ю.Звягина,^k Е.А.Слипченко,^k О.В.Крюкова,^a М.В.Седова,^k И.А.Рыжиков,^{k,l} В.В.Шумянцева,^{m,n} П.И.Королёва,^{m,n} Т.В.Булко,^m Л.Е.Агафонова,^m Р.А.Масамрех,^{m,n} Т.А.Филиппова,^{m,n} А.В.Кузиков,^{m,n} А.П.Савицкий,^d М.О.Шлеева,^d И.Д.Соловьев,^d Н.К.Марынич^d

^a Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Химический факультет, 119991 Москва, Россия

^b Институт биохимической физики имени Н.М.Эмануэля Российской академии наук, 119334 Москва, Россия

^c Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия

^d Институт биохимии имени А.Н.Баха Федерального исследовательского центра биотехнологии Российской академии наук, 119071 Москва, Россия

^e Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского, 119234 Москва, Россия

^f Институт физиологически активных веществ Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук, 142432 Черноголовка Московской обл., Россия

^g Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, 630090 Новосибирск, Россия

^h Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М.Лопухина Федерального медико-биологического агентства, 119435 Москва, Россия

ⁱ Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, 420008 Казань, Россия

^j Институт органической и физической химии имени А.Е.Арбузова Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук», 420088 Казань, Россия

^k Институт теоретической и прикладной электродинамики Российской академии наук, 125412 Москва, Россия

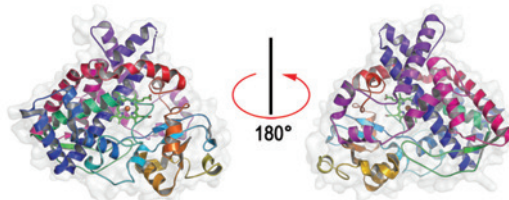
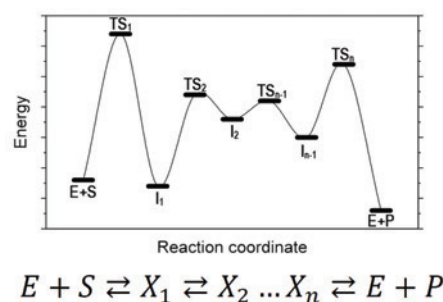
^l Московский государственный технический университета имени Н.Э.Баумана (национальный исследовательский университет), 105005 Москва, Россия

^m Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича, 119121 Москва, Россия

ⁿ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И.Пирогова, 117513 Москва, Россия

Обзор посвящен анализу современных достижений, актуальных проблем и практических применений ферментов в рамках химической и инженерной энзимологии. Рассмотрены достижения в фундаментальном понимании молекулярных механизмов, реализуемых в каталитических циклах ферментативных реакций, на основе методов квантовой (молекулярной) механики с использованием суперкомпьютерных технологий и методов биоинформатики. Конструирование белковых молекул биокатализаторов с новыми свойствами является принципиально значимой методологией биоинженерного подхода к решению практических задач, что продемонстрировано на ряде примеров. Возрастающая роль биокатализа в медицине и медико-биологических исследованиях проиллюстрирована решением задач синтеза антибиотиков и преодоления бактериальной резистентности к ним, изучением механизмов нейродегенеративных заболеваний и разработкой препаратов для борьбы с болезнью Альцгеймера, исследованиями биокаталитических процессов репарации ДНК, роли механизмов функционирования гемсодержащих пероксидаз в организме человека. Большое развитие в последние десятилетия получило использование ферментов, разрушающих различные эндогенные и экзогенные токсиканты. Проанализированы успехи и проблемы применения ферментов в терапии и доставке лекарственных средств. Особо отмечена принципиально важная роль ферментов в современном анализе и диагностике. В обзоре рассмотрено также новое направление создания биоаналитических методов при использовании аптамеров, мультианалитических биочипов, систем гигантского комбинационного рассеяния и биоэлектроанализа. Библиография — 460 ссылок.

Ключевые слова: биоинформатический анализ, постгеномные модификации, белковый дизайн, биоэлектрокатализ, биочипы, биомедицина, биодетекция.



Оглавление

1. Введение. Химический и биологический катализ — комплементарные основы устойчивого развития	2
2. Суперкомпьютерные технологии и биоинформатика — фундаментальный прорыв в понимании молекулярных механизмов действия ферментов	5
3. Постгеномная эпоха — новые технологии поиска и создания биокатализаторов	8
3.1. Выбор исходного фермента	9
3.2. Биоинженерия фермента	11
3.3. Гибридные биокатализаторы на основе ферментов	11
4. Белковая инженерия и посттрансляционные модификации — создание ферментов с новыми свойствами	11
4.1. Люциферазы — ферменты, продуцирующие кванты света	11
4.2. Органофосфатгидролазы — ферменты, разрушающие нейротоксины	13
4.3. Посттрансляционные модификации ферментов	14
4.4. Генно-инженерные полисахаридгидролазы	16
5. Биокатализ в медицине	17
5.1. Биокаталитический синтез и бактериальная резистентность к антибиотикам	17
5.2. Ингибиторы холинэстераз — борьба с болезнью Альцгеймера	18
5.3. Биокаталитические процессы репарации ДНК	19
5.4. Гемсодержащие пероксидазы: двойственная роль в организме человека	22

5.5. Мембранные и растворимые гидролазы (синтетазы) пирофосфата — ключевые ферменты энергетического обмена	24
5.6. Ферменты в детоксикационном биокатализе	26
5.7. Терапевтические ферментативные нанореакторы	27
5.8. Ферменты и наноматериалы в терапии и доставке лекарств	28
5.9. Ферменты — противоопухолевые препараты	30
5.10. Наноконтейнеры для доставки белков и нуклеиновых кислот	31
6. Ферменты в анализе и диагностике	32
6.1. Аптамеры в диагностике и терапии	32
6.2. Технология биочипов с ферментативной детекцией для мультианализа	33
6.3. Ферменты в стимул-чувствительных микрогелях	34
6.4. Измерение активности ферментов и исследование белков с использованием спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния	36
6.5. Биоэлектрокатализ и новые методы биоэлектроанализа	38
6.6. Молекулярный имиджинг ферментативной активности <i>in vivo</i>	38
7. Заключение	39
8. Благодарности	40
9. Список сокращений	41
10. Сведения об авторах	41
11. Литература	45

1. Введение. Химический и биологический катализ — комплементарные основы устойчивого развития

Современные ресурсные, энергетические и экологические проблемы ставят общество перед необходимостью создания и масштабирования принципиально новых методов конверсии вещества и энергии. Материально-технологическое и экологическое развитие общества, рост народонаселения требуют интенсификации производства и в ряде случаев качественного изменения базовых технологических

процессов, создающих основу условий существования человека. Принципиально важными являются глобальные проблемы взаимодействия человека и окружающей среды. Особенно актуальными представляются оценка тенденций научно-технического прогресса и разработка основ стратегического государственного планирования с учетом этих тенденций и имеющегося технологического опыта.

С целью достижения устойчивого развития, декларированного ООН в 2015 г., международное индустриальное и экономическое сообщество прилагает значительные усилия для преобразования и улучшения существующих производ-

ственных процессов и технологий. Накоплены большие объемы информации, идет поиск решений, способных существенно образом изменить как современную технологическую структуру общества, так и системы потребления продуктов и предоставления услуг.

Интенсивность и скорость работ по созданию и внедрению новых, более совершенных технологий весьма высоки. Основой технологий устойчивого развития являются несколько принципиальных критериев:

- возобновляемые или практически бесконечные запасы ресурсов;
- улучшение качества окружающей среды в результате промышленной реализации технологического процесса;
- обеспечение в ходе научно-технологического развития создания и масштабированного внедрения новых эффективных процессов конверсии вещества;
- понимание и анализ процессов, происходящих в природе и в организме человека.

Химические процессы с участием ферментов наиболее полно соответствуют данным критериям, поскольку эти биомолекулы потенциально обладают мощным каталитическим действием.

Сравнение ферментов с «классическими» химическими катализаторами в аналогичных условиях (температура, концентрация) демонстрирует явные преимущества первых для ускорения химических реакций.¹ Например, известное сравнение ферментов с ионом водорода (ион гидроксония — наиболее типичный химический катализатор гидролиза) показывает, что отношение их констант скорости реакции достигает $1.7 \cdot 10^{12}$ раз. Это означает, что если реакция под действием фермента протекает в течение 1 с, то продолжительность данного процесса в присутствии иона водорода будет составлять ~55 000 лет.

С момента открытия катализа, в том числе биологического варианта, российским аптекарем и исследователем К.С.Кирхгофом (1812–1818 гг.) биокатализ в течение многих десятилетий привлекает внимание исследователей как основной предмет биохимии. Однако в середине прошлого столетия стало ясно, что биокатализ может быть основой наиболее эффективных технологических процессов. Благодаря каталитической активности, высокой специфичности (селективности), беспрецедентной доступности и огромных возможностей конструирования белковых молекул катализ ферментами стал объектом интенсивных химических и технологических исследований. Принципиально важный вклад в изучение природы биокатализа и расширение областей его практического применения внес член-корреспондент АН СССР Илья Васильевич Березин, 100-летие со дня его рождения которого отмечалось в 2023 г. Определяющая роль в развитии химической энзимологии в СССР и далее в России принадлежит научной школе И.В.Березина, профессора и декана Химического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова, сформировавшейся под влиянием знаменитой школы химической кинетики под руководством лауреата Нобелевской премии по химии академика Н.Н.Семенова и академика Н.М.Эмануэля. Научные достижения И.В.Березина хорошо иллюстрирует предложенный им тезис: «Ферменты — химические катализаторы». Если до Ильи Васильевича существовало представление о биологическом катализе как о сложном, непонятном явлении, несущем в себе элементы витализма, то в результате исследований И.В.Березина и работ его учеников стало ясно, что ферментативный катализ как явление достаточно просто и надежно интерпретируется в терминах физической химии и

имеет огромный потенциал для технической реализации многих химических реакций. Информация о структуре ферментов и понимание механизма их действия позволяют создать принципиально новые возможности для медицины и экологии.

Обсуждая тенденции развития химической энзимологии, нельзя не отметить факторы, которые оказали существенное влияние на эту область науки не только в России, но и в мире. На первом этапе основное внимание было сосредоточено на изучении кинетики ферментативных реакций и физико-химических механизмов ферментативного катализа, что в дальнейшем способствовало применению ферментов в самых разных областях человеческой деятельности. Важным организационным достижением было создание в 1974 г. кафедры химической энзимологии на Химическом факультете МГУ им. М.В.Ломоносова, что позволило начать подготовку высококвалифицированных специалистов, впоследствии ставших лидерами исследовательских групп в российских и мировых университетах и компаниях.^{2,3}

Среди научно-методических материалов следует упомянуть целый ряд изданий.^{4–12} Эти книги и учебники, написанные «первым кругом» учеников и последователей И.В.Березина, обобщили известный на то время передовой опыт в изучении и применении биокатализа и способствовали как профессиональному росту авторов, так и созданию образовательных программ на кафедре химической энзимологии, ставшей одной из самых популярных среди студентов-химиков.

Важным шагом к популяризации и развитию отечественных работ в области биокатализа стала также организация регулярно проводимых в России международных конференций по биокатализу. Активные исследования химических механизмов биокатализа в XX в. позволили раскрыть уникальные свойства ферментов и в значительной степени понять, каким образом они способны обеспечить невероятные ускорения многих превращений.^{13–17}

Наряду с достоинствами ферментов как катализаторов стали ясны и их наиболее важные преимущества по сравнению с химическими катализаторами, в первую очередь высокие показатели хемо-, регио- и стереоселективности. Начиная с 60-х годов XX в. благодаря внедрению методов иммобилизации, которые позволили многократно использовать дорогие в то время ферменты, а также накопленным фундаментальным знаниям о кинетике, регуляции и механизмах биокаталитических реакций существенное развитие получило практическое внедрение биокатализа в промышленные процессы. В дальнейшем одним из принципиальных моментов для масштабного использования ферментов в производстве стало развитие методов генной инженерии, позволивших экспрессировать практически любой фермент в подходящем продуценте и получать его в больших количествах. Это сделало ферменты доступными катализаторами и в конечном итоге свело к минимуму вклад биокатализатора в стоимость целевых продуктов. В настоящее время мы являемся свидетелями активного использования биокатализа и ферментов в производстве самых разных продуктов.

Необходимо отметить и другие факторы, которые способствуют внедрению биокатализа. В первую очередь следует выделить начавшееся в 80-х гг. прошлого века широкое общественное и политическое обсуждение экологических проблем, которое привело к формированию концепций «зеленой» химии, замкнутых циклов, устойчивого развития, ориентации на возобновляемые источники

сырья и энергии, а также к осознанию необходимости бережного отношения к невозобновляемым ресурсам.^{18–21} За постановкой этих вопросов последовала формулировка конкретных задач, эффективное решение которых в значительной степени связано с использованием биокатализа.²² Для решения глобальных проблем необходимо применять самые разные методы, а в широком круге доступных средств нужно определить те области, где использование биокатализа представляется наиболее перспективным. На одну из «горячих точек» для практического приложения каталитических преимуществ ферментов указывает использование Е-фактора (экологического фактора, отражающего наличие загрязнений) при характеристике отходов, производимых в различных областях промышленной химии²³ (табл. 1). Необходимость снижения отходов стало одним из ключевых вопросов развития концепции «зеленой» химии.

Ферменты способны проводить химические превращения с высокими скоростями и выходами, однако для этого нужно найти или создать ферментативный катализатор с необходимой специфичностью, стабильный в условиях процесса. Из тысяч ферментов, обеспечивающих протекание химических процессов в живых системах, в настоящее время находят практическое применение лишь несколько сотен. Это показывает, что потенциал биокатализа в промышленности пока реализуется недостаточно.

Какие из поставленных задач можно выделить как первоочередные? Одной из них является более активное использование биокатализа в тонком органическом синтезе и фармацевтической промышленности (см. табл. 1). Анализ опыта крупнейших фармацевтических компаний в области синтеза,^{24,25} а также дискуссия²⁶ на эту тему показали, что среди ключевых задач фармацевтической промышленности, для решения которых может быть использован биокатализ, являются следующие:

- необходимость разработки эффективных методов образования амидной связи,
- сокращение расхода органических растворителей, вносящих наибольший вклад (до 80%) в производство отходов,
- увеличение хемоселективности реакций,
- недопустимость генотоксических загрязнений в конечном продукте (уменьшение числа катализаторов на основе комплексов тяжелых металлов).

Большие перспективы связаны с реализацией таких отличительных каталитических свойств ферментов, как хемо- и региоселективность, что обещает исключить стадии введения и снятия защитных групп в химическом синтезе и при сокращении количества стадий существенно повысить его экономическую эффективность.

Таблица 1. Производство отходов в различных областях промышленной химии.²³

Область промышленной химии	Масштаб производства, т в год	Фактор загрязнения ^a
Переработка нефти и газа	10 ⁶ –10 ⁸	<< 0.1
Основной органический синтез	10 ⁴ –10 ⁶	1–5
Тонкий органический синтез	10–10 ⁴	5–50
Фармацевтика	1–10 ³	25–>100

^a Отношение количества отходов к количеству продуктов.

Наряду с хемо-, регио- и стереоселективностью биокатализ способен обеспечить «мягкие» условия реакции, более простой набор реагентов, менее дорогостоящее и более безопасное аппаратное оформление промышленного процесса, поскольку для эффективного протекания ферментативных превращений не нужно применять высокие давления и другие экстремальные условия (высокие или низкие рН, температуры), взрыво- и пожароопасные органические растворители, так как предпочтительной средой для ферментативных превращений являются водные растворы. Это не исключает использования ферментов в органических растворителях,²⁷ что указывает на перспективу создания комплексных процессов, объединяющих возможности биологического и химического катализа. Такая идея активно развивается в последние годы.^{28–30}

Развитие технологий ферментативного катализа и «классических» химических катализаторов происходит параллельно и комплементарно друг другу. Сопоставление химических и биологических катализаторов проводилось неоднократно в различных обзорах и продолжается сегодня в силу преобладания тех или иных тенденций в развитии мировой экономики и ее отдельных отраслей. В нефтяной промышленности, обработке пластиков, пиролизе различных отходов, процессах Фишера–Тропша и т.д., требующих высоких температуры и давления, безусловными лидерами являются преимущественно неорганические катализаторы. Однако ферменты как основные биологические катализаторы имеют огромное превосходство в процессах, требующих низких капитальных затрат, высокой специфичности действия, энантиоселективности, проявления высокой активности при низких и средних температурах процессов, обеспечения максимально высоких выходов целевых соединений в каталитических реакциях наряду с минимальным количеством побочных продуктов.

Сегодня ферменты (преимущественно гидролазы — протеазы, карбогидразы, липазы, полимеразы и нуклеазы)^{31,32} практически не имеют конкурентов среди химических катализаторов и применяются в составах низкотемпературных стиральных порошков и добавок к кормам для животных, в сельском хозяйстве, в медицине при лечении различных ферментативных дисфункций, в генетическом анализе и диагностике, в пищевой промышленности (табл. 2).

Немаловажную роль ферменты играют в текстильной и целлюлозно-бумажной промышленности, а также в качестве компонентов биосенсоров. Так, классическим примером служит глюкозооксидаза, широко применяемая для контроля глюкозы в крови.⁴⁰ Возможность генетической модификации ферментов значительно расширяет их каталитический потенциал по отношению к субстратам, температурным условиям проведения реакций и величине рН.

В 2022 г. стоимость производства биокатализаторов составляла 25% от общих расходов на производство всех катализаторов в мире.⁴¹ В ближайшие 10 лет роль ферментов в мировой экономике, медицине, экологии будет существенно возрастать.

Химический и биологический катализ как основа биотехнологии создает базис современных методов трансформации вещества в технологизированном обществе. Крупномасштабное производство ферментов для нужд пищевой и текстильной промышленности, сельского хозяйства составляет неотъемлемую часть базовых технологических процессов. С учетом того что промышленная микробиологиче-

Таблица 2. Применение ферментов как биокатализаторов.

Ферменты	Предназначение	Ссылки
<i>Низкотемпературные стиральные порошки</i>		
Протеазы, амилазы, липазы, целлюлазы, маннанназа	Гидролитическое удаление с тканевых изделий белковых, жировых загрязнений, травяного сока, следов чая и кофе, древесной смолы	33
<i>Добавка к кормам</i>		
Протеазы, целлюлазы, ксиланазы, фитазы	Гидролиз высокомолекулярных соединений в составе крахмало- и целлюлозосодержащего сырья, повышения питательной ценности и улучшения усваиваемости кормов	34
<i>Сельское хозяйство</i>		
Амилазы, липазы, протеазы	Гидролиз биоорганических соединений, участвующих в формировании плотных оболочек семян, улучшения прорастания семян и повышения вхожести растений	35
Уреаза, фосфатаза, сульфатазы, дегидрогеназы	Гидролитические и окислительные процессы в почве с целью интенсификации разложения (гумификации) органических веществ и формирования структуры плодородной почвы	35
Хитиназа, протеаза, липаза	Гидролиз биополимеров, входящих в состав тканей насекомых, и инсектицидная защита растений	35
<i>Медицина (анализ, диагностика, лечение)</i>		
Кислая фосфатаза, катепсин, лактатдегидрогеназа, тимидинкиназа, креатинкиназа	Использование в качестве биомаркеров рака и сердечно-сосудистых заболеваний	36
Щелочная фосфатаза	Биомаркер диабета	36
Амилазы, липазы, протеазы, галактозидаза, <i>L</i> -фенилаланин-аммоний-лиаза, аспарагиназа, лизоцим, наттокиназа	Компенсация недостатка собственных ферментов человека, обеспечивающих регулярный метаболизм клеток, и подавление развития атипичных клеток	37
<i>Пищевая промышленность</i>		
Протеазы, липазы, амилазы, пектиназы, гемицеллюлазы, лизоцим, реннин	Гидролиз высокомолекулярных биоорганических соединений в составе сырья, конвертируемого в пищевые продукты	38, 39

ская технология основана на знании о ферментах и методах управления их экспрессией, практическая значимость ферментативного катализа становится очевидной. Известны ограничения при реализации промышленных технологий с применением белкового катализа:

— многие практически значимые процессы требуют для реализации термодинамических условий высоких температур, а ферменты могут «работать» при температурах до 90°C;

— ферменты — гомогенные катализаторы и используются в большинстве случаев как расходные реагенты, если это экономически оправдано; хотя проблема решается путем иммобилизации ферментов на неорганических или полимерных носителях, такая процедура требует дополнительных технологических стадий и экономических затрат;

— ограничением использования ферментов в крупнотоннажных производствах часто является их невысокая стабильность при длительной эксплуатации; значительная часть работ направлена на увеличение устойчивости белковых молекул посредством генетических модификаций и белковой инженерии (см. ниже);

— технологическое использование ферментов в ряде случаев осложняется их выдающейся специфичностью и селективностью по отношению к субстрату-реагенту, однако уникальные возможности современной генетической инженерии позволяют модифицировать активные центры фермента и «подстраивать» активный центр под новые соединения (см. ниже).

Поскольку общая генеральная тенденция развития химико-технологических процессов в определенной степени направлена на использование природных органических ресурсов (биотоплива, биополимеров, биофармацевтических

препаратов и др.), в нее хорошо вписываются современные исследования ферментов.

Данный обзор посвящен анализу наиболее значимых тенденций в развитии химической и инженерной энзимологии, выдающимся результатам и перспективным областям применения ферментов как катализаторов, хотя и оставляет без детального рассмотрения многие промышленные аспекты биокатализа. Основное внимание сосредоточено на современных фундаментальных достижениях в области физико-химических основ молекулярных процессов в активных центрах ферментов, использовании методов генетической инженерии как белковой стратегии создания ферментов с новыми свойствами, роли ферментативных процессов в молекулярной медицине и разработке новых методов анализа и диагностики.

2. Суперкомпьютерные технологии и биоинформатика — фундаментальный прорыв в понимании молекулярных механизмов действия ферментов

С накоплением больших объемов информации в публичных базах данных об аминокислотных последовательностях и структурах белков, а также с развитием суперкомпьютерных технологий стал возможен биоинформатический анализ больших суперсемейств белков⁴² (рис. 1). Он позволил определять наиболее важные для функционирования ферментов аминокислотные остатки, выявлять ранее неизвестные участки связывания регуляторных лигандов,⁴³ устанавливать взаимосвязи между различными участками связывания и активным центром фермента.⁴⁴ Использование методов биоинформатики и молекулярного моделиро-

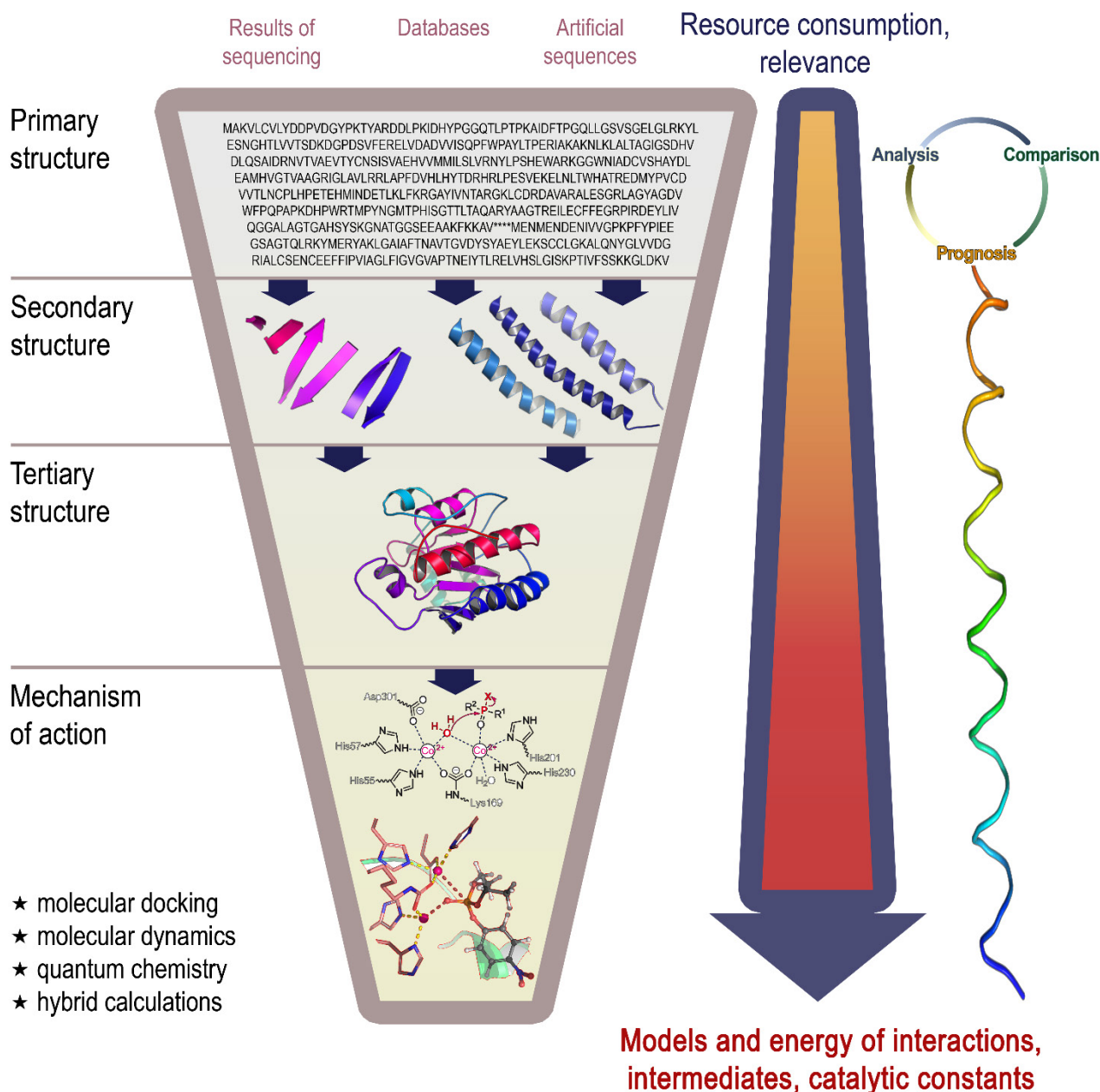


Рисунок 1. Генерализованная стратегия биоинформатических методов исследования ферментов, в том числе с использованием суперкомпьютеров. Отмечено спиралевидное движение от простого к сложному — от первичной аминокислотной (или нуклеотидной) последовательности к зрелой трехмерной структуре фермента и последующему изучению механизма его действия, причем каждый следующий уровень требует большего количества ресурсов и дает более интересные результаты для науки и практики.

вания обеспечило качественно новый уровень изучения механизма действия ферментов и структурной организации их активных центров.⁴⁵ Например, было показано, что гидролазы можно разделить на 4 группы по типу организации активных центров и каталитическим циклам, различающимся механизмом активации воды. Была установлена важная роль остатков Gly, Pro и Cys в структурной организации белковых молекул и их активных центров.⁴⁶

Биоинформатический анализ позволяет идентифицировать аминокислотные остатки двух функциональных типов: в консервативных позициях суперсемейства ферментов, которые принимают непосредственное участие в каталитическом механизме, и в специфических позициях, которые отвечают за функциональные различия между подсемействами.⁴⁷ Для поиска специфических позиций подсемейств

используют функцию оценки специфичности позиций на основании геномной и структурной информации.^{46–49} Важной особенностью такого анализа является то, что он пригоден не только для детально охарактеризованных белков, но и для малоизученных ферментов, для которых известна лишь первичная аминокислотная последовательность.

Специфичность и консервативность аминокислотных остатков в структурных полостях ферментов служат критерием оценки функциональной важности участков связывания, а также позволяют их идентифицировать и классифицировать.⁵⁰ Идентификация специфических позиций подсемейств (консервативных внутри подсемейств ферментов бактерий или млекопитающих, но различающихся между собой) помогает выявить разницу в строении участков связывания в гомологичных ферментах патогенных бакте-

рий и человека и в вовлеченности таких аминокислотных остатков во взаимодействие с лигандами.^{50,51} Для реализации разработанных подходов создано 7 доступных веб-серверов, которые носят следующие названия (в скобках указан адрес сайта):

- Mustguseal (<https://biokinet.belozersky.msu.ru/mustguseal>);
- Zebra2 (<https://biokinet.belozersky.msu.ru/zebra2>);
- Zebra3d (<https://biokinet.belozersky.msu.ru/zebra3d>);
- pocketZebra (<https://biokinet.belozersky.msu.ru/pocketzebra>);
- visualCMAT (<https://biokinet.belozersky.msu.ru/visualcmat>);
- vsFilt (<https://biokinet.belozersky.msu.ru/vsfilt>);
- Yosshi (<https://biokinet.belozersky.msu.ru/yosshi>).

Ключевой веб-сервер Mustguseal позволяет автоматически строить выравнивания больших суперсемейств белков с использованием информации об их структурах и последовательностях в публичных базах данных; для высокопроизводительного анализа больших массивов данных разработана также реализация с использованием суперкомпьютера. Веб-сервер обладает функционалом, которого нет у известных мировых аналогов и позволяет не только выравнивать, но и делать выборку структурно и функционально разнообразных родственных белков из публичных баз данных, а также строить большие выравнивания суперсемейств белков, включающих тысячи структур и последовательностей гомологов. Это достигается при помощи алгоритмов поиска по структурному сходству для выявления эволюционно удаленных белков, их структурного выравнивания, дальнейшего поиска по сходству аминокислотных последовательностей с целью выявления эволюционно близких белков в анализируемых семействах и последующего выравнивания аминокислотных последовательностей. Такие структурно-опосредованные выравнивания с использованием разработанного подхода можно проводить в автоматическом *on line* режиме.

«Сестринские» веб-серверы Zebra2 и pocketZebra позволяют проводить анализ полученных выравниваний, чтобы определить консервативные и специфические позиции в суперсемействе, найти неизвестные участки связывания в структурах изучаемых белков (ферментов), выявить их важность для проявления функциональных свойств и определить отличительные особенности в конкретном представителе семейства. С помощью веб-сервера visualCMAT можно обнаружить взаимосвязь между различными участками в структуре белка, а также сети взаимодействующих аминокислотных остатков.⁴⁴

Веб-сервер Zebra3d позволяет находить 3D-специфические паттерны в суперсемействе белков, которые представляют важные для механизма их действия структурные элементы ферментов и отвечают за различие свойств (таких как субстратная специфичность, каталитическая активность) между ферментами, принадлежащими к разным функциональным подсемействам, и конформерами одного фермента благодаря известной пространственной ориентации ключевых аминокислотных остатков и участков основной цепи. 3D-Специфические паттерны могут быть использованы при функциональной аннотации и рациональном дизайне белков.⁵² Определение 3D-специфических паттернов качественно дополняет информацию о специфических и коррелирующих позициях в подсемействе ферментов и расширяет возможности методологии белкового дизайна, например, в результате вставки 3D-мотивов дисульфидных мостиков в структуру белков с целью получения биомолекул с измененными функциональными свойствами (веб-сервер Yosshi).⁵³

Веб-сервер vsFilt позволяет учитывать специфические взаимодействия между белком-мишенью и модулятором его функциональных свойств при отборе наиболее перспективных соединений в качестве прототипов лекарственных средств.⁵⁴ Биоинформатический анализ семейств гомологичных ферментов помогает определить различия в строении активных центров гомологичных ферментов и на этой основе создавать селективные ингибиторы, используя, например, алгоритм структурной фильтрации vsFilt⁵⁴ на стадии компьютерного скрининга.

На основе данных, полученных с использованием описанных выше методов биоинформатического анализа, предложены новые пути решения ряда научных и практических задач: обоснованы новые пути регуляции активности ферментов, проведен поиск селективных ингибиторов ферментов патогенов, определен выбор аминокислотных замен при биоинженерии ферментов с целью направленного изменения их функциональных свойств.^{55,56} Опыт применения методов биоинформатики показал эффективность их использования при изучении механизма действия и инженерии различных ферментов.^{57–61}

В последние годы предложена методология поиска модуляторов ферментов нового типа, основанная на выявлении неизвестных ранее участков связывания, отличных от активного центра. Анализ показывает, что в структурах белков есть множество потенциальных участков связывания лигандов, функциональная роль которых неизвестна. Возможно, на функциональную значимость таких участков может указывать наличие в их структуре специфических или консервативных аминокислотных остатков, определяемых в результате биоинформатического анализа суперсемейств белков.^{43,62} Вычислительная платформа на основе веб-сервера Mustguseal позволяет провести поиск таких участков связывания и выявить комплементарные лиганды с учетом различий в структурной организации участков для ферментов патогенов, человека и животных.

Понимание особенностей и различий в организации активных центров и других участков связывания в ферментах из разных источников важно не только для создания селективных ингибиторов, но и для определения влияния компонентов реакционной смеси на эффективность биокаталитических технологий, а также для поиска ферментов с необходимой специфичностью в условиях биокатализа. Соответствующая процедура компьютерного дизайна была апробована на примере поиска бифункциональных ингибиторов нейраминидазы вируса гриппа,^{63,64} нейраминидазы *A* из *Streptococcus pneumoniae*,⁶⁵ транскетолазы, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и *L,D*-транспептидазы-2 из *Mycobacterium tuberculosis*.^{66–69} Такая методология способствует выявлению селективных ингибиторов, эффективных против патогенов, но безопасных для человека. Наряду с компьютерным скринингом, предваряющим и ускоряющим процесс создания лекарственных препаратов, важную роль в нем играют методы молекулярного моделирования.^{16,17,50,51} Внедрение методов биоинформатики и молекулярного моделирования позволяет существенно ускорить путь разработки новых лекарств, в том числе с принципиально иным механизмом действия.

Биоинформатический анализ суперсемейств ферментов и соответствующие веб-серверы можно также использовать для определения круга мутаций в ключевых белках(ферментах) человека, связанных с патологическими состояниями организма. В результате может быть создана единая база ключевых белков(ферментов) человека с переч-

нем патологических мутаций, на основе которого будет сформирована информационная служба персонализированной медицины и создан автоматизированный сервис по данным секвенирования ДНК пациентов.

Фундаментальные причины высокой скорости действия белковых катализаторов являются предметом современной физической химии.¹ Революционные возможности в развитии этого направления предоставили суперкомпьютерные технологии,⁷⁰ позволившие на основе фундаментальных уравнений квантовой механики и методов квантовой химии проследить структурно-кинетические изменения белковой молекулы в процессе каталитического цикла.^{71,72}

Молекулярное моделирование предоставило инструмент для расшифровки механизмов ферментативных реакций, определения метастабильных промежуточных соединений и установления структуры переходных состояний. Принципиально важной оказалась возможность построения профиля изменения свободной энергии в процессе перехода от реагента к продукту реакции с идентификацией экстремумов на энергетическом пути. Такой профиль позволяет оценить константы скорости всех элементарных стадий каталитического цикла, причем из-за нестабильности интермедиатов, образующихся с высокими скоростями, идентификация их структур и скоростей взаимопревращения современными экспериментальными методами практически невозможны. Суперкомпьютерное моделирование открывает путь к решению данной «нерешаемой» задачи.^{73–79}

Фундаментальные особенности ферментативного катализа, ярко выявленные в результате суперкомпьютерного моделирования, заключаются в следующем:

1) все ферментативные реакции в рамках каталитического цикла превращения исходных реагентов в продукты многостадийны и включают образование промежуточных стабильных и нестабильных химических соединений. Время жизни этих интермедиатов лежит в диапазоне нано(микро, милли)секунд. Классическими примерами ферментов, катализирующих многостадийные реакции, являются сериновые гидролазы, рибонуклеазы и аминоксиферменты. Современные методы молекулярного моделирования с использованием высокопроизводительных вычислений посредством анализа механизмов реакций идентифицируют все метастабильные промежуточные соединения.^{76–79}

2) каталитический цикл ферментативных превращений реализуется в конформационно-подвижной полимерной матрице с участием функциональных групп, которые идентифицируются как компоненты активного центра. Структурно-функциональное моделирование каталитических циклов методами квантовой механики/молекулярной механики (КМ/ММ) иллюстрирует важную роль конформационных изменений структуры активного центра в процессе каталитического превращения. Конформационные изменения определяются строением и стерическими особенностями активного центра и обеспечивают локализацию и перемещения реакционных групп в необходимые точки активации тех или иных связей в молекуле реагента или промежуточного соединения.^{80–82} В некотором приближении такие изменения в процессе каталитического цикла могут быть описаны как работа «молекулярного станка», формирующего последовательность необходимых каталитических стадий;

3) методами суперкомпьютерного моделирования был проведен анализ большого числа механизмов ферментативных реакций, в числе которых:

— синтез *N*-ацетиласпарагиновой кислоты в присутствии фермента аспартат-*N*-ацетилтрансферазы, кодируемой геном *NAT8L*;^{83–85}

— гидролиз нейропептида *N*-ацетиласпартилглутамата, который играет важнейшую роль в функционировании глутаматных синапсов и реализации механизмов записи и считывания информации, определяющих память,⁸⁶ под действием глутаматкарбоксипептидазы II типа;^{74,75,80–82}

— гидролиз *N*-ацетиласпартата аспартоацилазой, являющейся одним из ключевых ферментов нейроваскулярного сопряжения и участвующей в метаболизме мозга человека в ответ на внешний возбуждающий сигнал.^{69,87,88}

С развитием графических ускорителей и реализации на них пакетов программ по квантовой химии стало возможным проведение расчетов методом молекулярной динамики с потенциалами КМ/ММ. Это значительно расширило представления о механизмах ферментативных реакций и позволило по динамическому поведению фермент-субстратных комплексов судить о путях протекания реакции в гидролазах.^{63–65} Были предложены критерии, с помощью которых стало возможным определение электрофильных атомов в органических молекулах, содержащих карбонильные группы, на основании анализа трехмерных карт электронной плотности. Применимость этих методик для описания разнообразных структур в фермент-субстратных комплексах была показана в работах^{89–92}. Было доказано, что молекулярное моделирование, основанное на применении метода КМ/ММ, позволяет корректно интерпретировать экспериментальные данные,⁹² выявлять наиболее вероятный механизм химической реакции, а также объяснять разнообразие данных, которые были получены для набора родственных систем, в частности ферментов, содержащих аминокислотные замены.⁹¹ Использование методов молекулярного моделирования способствует ускорению процесса создания новых ингибиторов ферментов и установлению механизмов их действия.

3. Постгеномная эпоха — новые технологии поиска и создания биокатализаторов

Ферменты являются уникальными высокоспецифичными катализаторами. Однако очень часто это свойство оказывается в их недостатком, поскольку в ходе эволюции природа оптимизировала специфичность ферментов к природным субстратам, в то время как по структуре многие целевые соединения отличаются от природных молекул. В качестве примера можно привести пенициллинацилазу, которая довольно высокоэффективна в синтезе ампициллина (Amp) и в несколько раз менее активна при получении амоксициллина, хотя последний по антибактериальным свойствам намного превосходит Amp и отличается от него дополнительной гидроксильной группой в *para*-положении бензольного кольца *D*-фенилглицина. Именно специфичность ферментов наряду с их невысокой стабильностью и высокой стоимостью получения из природных источников сильно ограничивали внедрение биокаталитических процессов в практику. Кроме того, оптимальные условия функционирования ферментов в клетке (например, величина pH для проявления активности) часто отличались от оптимальных параметров процесса получения целевого продукта. В результате реальный процесс по своим характеристикам представлял собой компромисс между оптимальными условиями функционирования биокатализатора и проведения

химической реакции. Другим исключительно важным фактором, влияющим на создание и разработку новых биокаталитических процессов, являлось отсутствие фермента с необходимой активностью, а известные методы поиска новых биокатализаторов были экстенсивными и давали малопредсказуемый результат. Кроме того, в большинстве случаев на практике в качестве источника фермента использовали микроорганизмы. Однако хорошо известно, что более 99.9999% микроорганизмов, существующих в природе, невозможно получить в чистом виде в лаборатории.

Ситуация начала кардинально меняться (и до сих пор улучшается в плане прогресса) с конца 80-х – начала 90-х гг. XX в., с момента вступления мирового сообщества в так называемую «постгеномную эпоху». Именно в этот период в «науках о живом» стали применять в качестве инструмента исследования новые методы и подходы.⁹³ Здесь достаточно упомянуть Нобелевские премии по химии за секвенирование ДНК (1980 г.), создание разнообразных вариантов полимеразной цепной реакции (ПЦР) (1994 г.), разработку методов и подходов геномной инженерии и дизайна белков (2018 г.). Совершенно новое наполнение и развитие получили такие методы, как рентгеноструктурный анализ, электронная микроскопия, ядерный магнитный резонанс, компьютерное моделирование и др. Термин «постгеномная эпоха» следует воспринимать не как техническое достижение в секвенировании различных геномов — от архей и бактерий до человека, хотя и такая информация является исключительно важной и полезной, но и, например, успехи в диагностике различных наследственных заболеваний, открытие новых метаболических путей и ферментов, участвующих в них, анализ механизмов резистентности патогенов и др.

Современные методы высокопроцессивного секвенирования позволяют определять последовательности ДНК в образце с последующей сборкой полученных последовательностей в отдельные геномы. Такая возможность сразу способствовала решению проблемы некультивируемых организмов, а для энзимологов выбор потенциальных ферментов увеличился сразу в миллионы раз. Секвенирование сотен тысяч (и даже миллионов) геномов привело к переходу «от количества в качество». Было создано колоссальное информационное пространство, для работы с которым потребовались разработка соответствующих методов биоинформатики и создание суперкомпьютеров. Данные о последовательностях и свойствах известных ферментов были объединены в специализированные базы данных, использование которых позволяет резко сузить круг поиска фермента с определенными свойствами. «Массовый» анализ аминокислотных последовательностей белков и ферментов достаточно подробно описан в предыдущем разделе, однако к его результатам следует относиться с большой осторожностью, о чем свидетельствуют многочисленные ошибки при аннотации новых геномов как по количеству генов определенного фермента, так и по функционалу (в качестве примера см. раздел 3.1). То же самое можно сказать и про структурное моделирование. Ошибки связаны с тем, что точность расчета составляет ± 1 ккал · моль⁻¹, и в результате при докинг максимальной и минимальная величины констант взаимодействия белка с лигандом будут отличаться в 50 раз. По этой причине решающую роль на предварительном отборе кандидатов-ферментов до сих пор играет экспертная оценка.

Тем не менее описанные выше методы обычно используют на начальном этапе создания биокатализаторов под кон-

кретный процесс. В результате полностью изменилась идеология создания новых биокаталитических процессов. Сначала определяют оптимальные условия проведения процесса, затем выбирают исходный фермент и методами белковой инженерии его свойства приводят в соответствие с требованиями процесса. Более того, можно изменить и сам биокатализатор. Например, в настоящее время для получения аминопенициллинов и аминоцефалоспоринов разрабатывают реакции с использованием гидролазы эфиров α -D-аминокислот (НАА)[†] вместо пенициллинацилазы (РА). Более высокая эффективность НАА связана с тем, что ацил-содержащий фермент образуется из метилового эфира, а не из гораздо менее реакционноспособного амида, как в случае РА. Кроме того, поскольку НАА является эстеразой, то гидролиз конечного продукта (амида) этим ферментом происходит намного медленнее, чем РА, которая является амидазой. В результате выход конечного продукта в присутствии НАА часто намного выше по сравнению с таковым для РА.

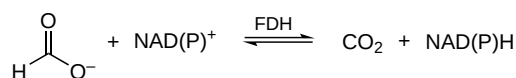
«Постгеномная эпоха» характеризуется также появлением новых биокаталитических процессов. В качестве примера можно привести систему редактирования генома CRISPR/Cas (Нобелевская премия по химии 2020 г.). В настоящее время существует несколько вариантов этой системы и предлагаются все новые, а проблема ее практической реализации лежит в этической и законодательной сфере.

В силу ограниченности объема ниже рассмотрены только особенности получения «классических» биокатализаторов. Были проведены работы⁹⁴ с самыми разнообразными практически важными ферментами, причем в зависимости от поставленной задачи фермент одного и того же типа был получен из различных источников по описанным методам (см. примеры ниже). Нами выбраны в качестве примеров два фермента — форматдегидрогеназа (FDH) и оксидаза D-аминокислот (ДААО), поскольку такие биокатализаторы представляют два крайних случая ферментов с высокой и очень низкой гомологией. Рассмотрим ключевые этапы такого исследования.

3.1. Выбор исходного фермента

Выбор фермента является одним из наиболее сложных этапов. Различия в свойствах одного и того же фермента, но выделенного из разных источников, могут быть легко оценены по созданию системы регенерации восстановленной формы никотинамиддинуклеотидфосфата (NADPH) на основе форматдегидрогеназы (номер по классификации ферментов (КФ) 1.2.12) (рис. 2). Реакция, катализируемая FDH, в общем виде представлена на схеме 1.

Схема 1



Количественно специфичность дегидрогеназ NAD⁺/NADP⁺ выражается как предпочтение к коферменту (coenzyme preference, CP), определяемое по формуле (1)⁶⁸

$$\text{CP} = (k_{\text{cat}}/K_{\text{M}})^{\text{NAD}^+}/(k_{\text{cat}}/K_{\text{M}})^{\text{NADP}^+} \quad (1)$$

где k_{cat} — каталитическая константа, K_{M} — константа Михаэлиса.

[†] В настоящем обзоре аббревиатуры ферментов даны на английском языке.

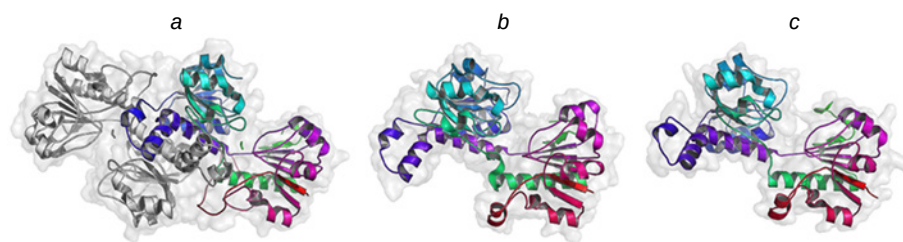
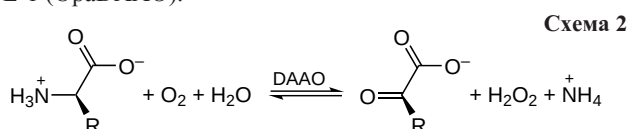


Рисунок 2. Структуры димера FDH из *Pseudomonas* sp.101 (a) и мономерных субъединиц ферментов из *Candida boidinii* (b) и *Arabidopsis thaliana* (c). Структурные параметры взяты из базы RSCB PDB (коды 2GUG, 8HTY и 3NAQ соответственно) и представлены с использованием программы PyMOL (версия 1.7.6, Schrödinger, LLC).

Оказалось, что у FDH из бактерий *Pseudomonas* sp.101 (PseFDH) величина СР составляет 2400, в то время как для того же фермента из дрожжей *Candida methylca* и *C. boidinii* (CboFDH) значение СР равно 250 000. Казалось бы, что различие в величинах СР для бактериальных и дрожжевых ферментов в 100 раз невелико. Однако в случае PseFDH были получены мутанты, имеющие каталитическую эффективность (k_{cat}/K_M) и удельную активность по отношению к NADP^+ такие же, как у PseFDH дикого типа с NAD^+ . Кроме того, у лучших мутантов дрожжевых FDH указанные выше параметры для NADP^+ были в 5–10 раз хуже.⁹⁵ При выборе исходного фермента должны учитываться также показатели, определяющие стоимость получения и условия применения. Для данного примера важна устойчивость к действию протеаз, поскольку инактивация примесями протеаз является одной из основных причин потери активности при хранении фермента. Фермент PseFDH исключительно устойчив к действию протеаз, что позволяет хранить его при +4°C. Окисление или модификация SH-групп остатков Cys также приводит к инактивации ферментов. В случае PseFDH после замены двух остатков Cys полученные мутанты не теряли активности более 10 лет при хранении в фосфатном буфере при +4°C, в то время как CboFDH и после замены двух остатков Cys необходимо хранить при –20°C в 50%-ном глицерине.⁹⁶

Следовательно, выбор исходного фермента крайне важен, и можно выделить два основных пути отбора ферментов.

1. Поиск фермента в конкретном геноме (genome mining, genome exploring). Был проведен поиск потенциальных оксидаз D-аминокислот (DAAO) (рис. 3), катализирующих реакцию окисления аминокислот (схема 2), в геноме термотолерантных дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL-1 (OpaDAAO).^{97,98}



Геном этих дрожжей был секвенирован в 2013 г., и при его аннотации нашли всего два гена потенциальных DAAO, причем с ошибками. Классическая DAAO с широким спектром субстратной специфичности была аннотирована как специфичная D-аспаратоксидаса (DASPO), а DASPO —

как DAAO. Тщательный анализ позволил выявить в геноме *O. parapolymorpha* DL-1 пять генов DAAO и один ген DASPO. Отметим, что до этого момента считали,⁹⁷ что в геномах дрожжей должно быть всего по одному гену DAAO и DASPO. Шесть генов были клонированы и экспрессированы в клетках *Escherichia coli*. Все ферменты оказались оксидазами, отличаясь по спектру субстратной специфичности и pH-профилю активности. Четыре DAAO не имели аналогов в литературе. Анализ каталитических свойств показал, что разные OpaDAAO по своей активности превосходят описанные ранее DAAO и DASPO из других источников.⁹⁸ Для двух OpaDAAO были определены трехмерные структуры. В результате была получена база с установленными взаимосвязями структура–функция, которая была использована в работах второго направления.

2. Поиск целевых ферментов в различных геномах (genome screening). В этом случае трудоемкость и общий успех работы определяются степенью консервативности первичной структуры. Например, в случае FDH поиск этих ферментов в различных геномах достаточно прост, поскольку даже между отдаленными организмами гомология составляет >50%.⁹⁶ Исключением стала FDH из патогена *Staphylococcus aureus* (SauFDH) с гомологией всего 40%.⁹⁶ Эволюционный анализ показал, что SauFDH относится к отдельной ветви эволюции. Ген *SauFDH*, кодирующий синтез FDH, был клонирован и экспрессирован. Оказалось, что удельная активность этого фермента в 2.5 раза выше, чем у других описанных формидегидрогеназ.⁹⁹

В случае DAAO уровень гомологии составляет не более 30–35%.¹⁰⁰ В связи с этим для надежной идентификации генов потенциальных DAAO в геномах экстремофильных бактерий и архей был добавлен еще один этап отбора фермента — моделирование 3D-структур и их сравнение с экспериментальными и модельными структурами известных DAAO и глицинооксидаз. В результате были найдены десять DAAO в бактериях и впервые в мире — один фермент в клетках архей. На основании анализа структуры активного центра DAAO из бактерий *Natronosporangium hydrolyticum* ACRA39 (NhyDAAO) было сделано предположение о потенциально высокой специфичности действия этого фермента к D-Phe (используется для диагностики гестационного диабета у беременных женщин), что и было подтверждено после клонирования и экспрессии NhyDAAO в клетках *E. coli*.¹⁰¹

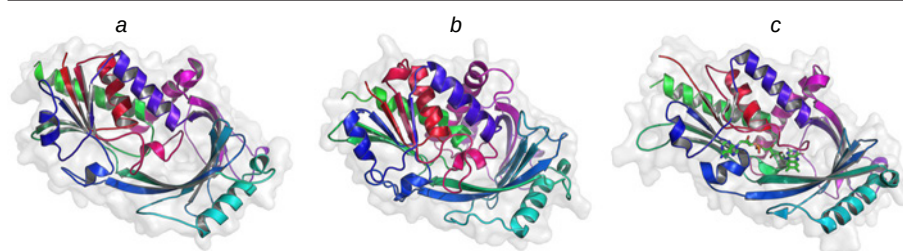


Рисунок 3. Структуры оксидазы D-аминокислот (a), D-аспаратоксидазы из *Ogataea parapolymorpha* (b) и D-аспаратоксидазы человека (c). Структурные параметры взяты из баз данных UniProt (коды W1QLN4 и W1Q8E7) и RSCB PDB (код 6RKF) соответственно.

Анализ модельной структуры активного центра DAAO из архей *Natrarchaeobius halalkaliphilus* AArch4 (NhaDAAO) показал, что данный фермент может окислять не только обычные *D*-аминокислоты, но и их *N*-замещенные аналоги. После получения рекомбинантной NhaDAAO было установлено, что она действительно проявляет такую необычную специфичность действия. Особо интересным является катализ реакций окисления моно- и триметильного производных Gly — саркозина и бетаина соответственно. Реакция окисления бетаина ферментами в литературе не описана.

3.2. Биоинженерия фермента

Для оптимизации выбранного фермента используют как методы неупорядоченного мутагенеза (НМ), так и рациональный дизайн. В середине 80-х—конце 90-х гг. XX в. первые были наиболее популярны, но в настоящее время основную роль в инженерии белков играет рациональный дизайн, поскольку намного превосходит их по эффективности и стоимости. Работы ведутся в нескольких направлениях: улучшение каталитических свойств, создание ферментов с новыми свойствами, повышение температурной и операционной стабильности.

Были проведены эксперименты по белковой инженерии на различных ферментах, таких как FDH,¹⁰² DAAO,¹⁰³ пероксидаза (PO),¹⁰⁴ пенициллинацилаза (РА),¹⁰⁵ гидролаза эфиров α -*D*-аминокислот,¹⁰⁶ фенилацетонмонооксигеназа¹⁰⁷ и др. Наиболее интересными оказались мутантные формы FDH (см.⁷⁶) и DAAO,¹⁰³ у которых после 5–7 замен были улучшены каталитические свойства, повышены термостойчивость и химическая стабильность. Имобилизованные FDH и DAAO сохраняли активность при 80 и 90°C. У пероксидазы была повышена эффективность переноса электронов внутри белковой глобулы.¹⁰⁴ Неожиданными оказались результаты по инженерии FDH из дрожжей *O. parapolymorpha* DL-1. При клонировании на N-конец фермента был добавлен остаток Gly или Ala.¹⁰⁸ Остаток Gly не влиял на свойства OpaFDH, а добавление остатка Ala привело к повышению термостабильности фермента в четыре раза.¹⁰⁸ Последние достижения и актуальные тенденции развития инженерии белков можно найти в работе¹⁰⁹.

3.3. Гибридные биокатализаторы на основе ферментов

Эффективным подходом оказалось объединение двух и более ферментов в одну полипептидную цепочку (создание гибридных (fusion) белков). Были получены два типа гибридных биокатализаторов: FDH с монооксигеназой на основе цитохрома P450 BM3 (см.¹¹⁰) или с фенилацетонмонооксигеназой.¹¹¹ В случае гибрида FDH-P450 эффективность конверсии разных субстратов была от 6 до 60 раз выше, чем при использовании смеси отдельных ферментов.¹¹⁰

Таким образом, достижения в области биоинформатики, секвенирования и структурной биологии обеспечили отбор и инженерию эффективных ферментов для многих областей науки и техники. Простое перечисление разработанных в последние годы процессов с участием биокатализаторов заняло бы несколько страниц. Для подтверждения значительной роли ферментов в развитии и прогрессе современных технологий достаточно упомянуть их использование в качестве компонентов стиральных порошков и пищевых добавок в сельском хозяйстве (см. также раздел 1). По объему и стоимости производства только эти две области составляют более половины всего рынка ферментных препаратов (см. <https://www.gminsights.com/industry-analysis/enzymes-market>), который по разным оценкам в 2022 г. превышал 20 млрд долл. в год. Другим ярким примером применения инженерии ферментов в современных технологиях является создание в кратчайшие сроки фирмой Jena Bioscience мутантной формы ДНК-полимеразы Saphir Bst2.0 Turbo, предназначенной для диагностики коронавируса SARS Cov-2 с помощью изотермической полимеразной цепной реакции (см. <https://www.jenabioscience.com/molecular-biology/isothermal-amplification-lamp/polymerases/pcr-390-saphir-bst-turbo-polymerase>). В настоящее время такие технологии широко используют для получения высокостабильной и активной FDH, а также для разработки на ее основе эффективных биокатализаторов процессов фиксации CO₂ из атмосферы.⁹⁴

4. Белковая инженерия и посттрансляционные модификации — создание ферментов с новыми свойствами

4.1. Люциферазы — ферменты, продуцирующие кванты света

Одной из природных биолюминесцентных систем (рис. 4, схемы 3 и 4) является люциферин-люциферазная система светлячков рода *Luciola* (см. рис. 4,а). Биолюминесценция (эмиссия видимого света с длиной волны в диапазоне 400–700 нм) происходит в ходе окисления органического субстрата (люциферина), катализируемого ферментом — люциферазой (КФ 1.13.12.7). В молекуле фермента два домена (большой N-домен и малый C-домен) соединены подвижной неструктурированной полипептидной петлей. Именно динамическая структура белка играет важную роль в функционировании люциферазы светлячков,¹¹² которая способна принимать три разные конформации: открытую (в отсутствие субстратов) и две закрытые каталитические конформации (аденилирования и окисления), соответствующие отдельным стадиям реакции (см. схема 3, см. также рис. 4).

При связывании субстратов — люциферина и аденозинтрифосфата (АТФ) (см. схему 3) — свободная конформация

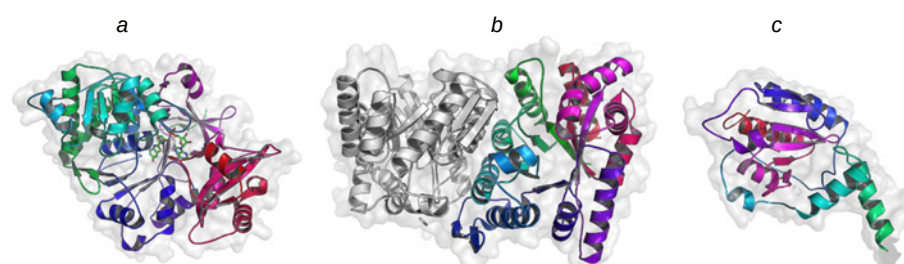


Рисунок 4. Структуры люциферазы (Luc) из светлячков *Luciola mingrelica* (a), из бактерий *Photobacterium leiognathi* (b) и из грибов *Armillaria mellea* (c). Структурные параметры взяты из баз данных RSCB PDB (коды 2D1R и 6FRI) и UniProt A0A3G9JTR4 соответственно.

Схема 3

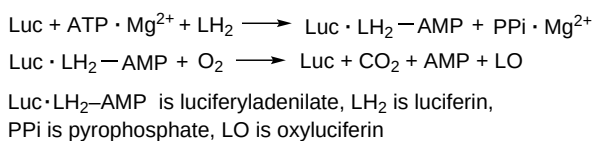
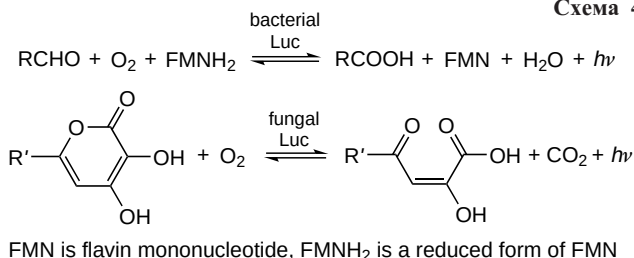


Схема 4



Luc трансформируется в аденилирующую: домены сближаются и поворачиваются на 90° по отношению к их ориентации в свободной конформации.^{113,114}

Аденилирование люциферина приводит к образованию люцифериладенилата — ангидрида карбоновой и фосфорной кислоты, который, в отличие от люциферина, высокоактивен в реакции окисления. Каталитически важные остатки С-домена (Lys529 и Thr527) входят в активный центр фермента и способствуют образованию люцифериладенилата. Когда реализуется окисляющая конформация, С-домен повернут вокруг N-домена на ~140°, и в активном центре оказывается фрагмент С-домена — остаток Lys443. Окисляющая конформация очень нестабильна и необходима лишь для катализа реакции окисления люцифериладенилата. При испускании света фермент возвращается в аденилирующую конформацию.¹¹⁴ Благодаря динамической структуре белка создается конфигурация активного центра, оптимальная для каждой стадии.

Важной функцией белковой глобулы Luc является ее влияние на спектры биолюминесценции. Продукт ферментативной реакции — оксилуциферин — в растворе при разных pH может существовать в шести различных формах^{112,113} (рис. 5). Фенольные формы I–III присутствуют в неполярной среде или при очень низких pH, их максимум флуоресценции (λ_{max}) наблюдается в электронном спектре при 450 нм. Такое голубое свечение не зафиксировано непосредственно для Luc. В случае фенолятных форм IV–VI наблюдается желто-зеленая ($\lambda_{\text{max}} = 550\text{--}570$ нм) или красная ($\lambda_{\text{max}} = \sim 620$ нм) флуоресценция, что характерно для биолюминесценции этого фермента.

Исследование стационарной и субнаносекундной время-разрешенной флуоресценции оксилуциферина и его структурных аналогов показало, что источниками биолюминес-

ценции в люциферин-люциферазной системе светляков являются различные таутомерные формы электронно-возбужденного оксилуциферина, которые образуются в активном центре люциферазы.^{112,115} Основным фактором, определяющим цвет биолюминесценции, служит микроокружение эмиттера, который локализован в активном центре фермента, где образуется только одна молекула электронно-возбужденного продукта.¹¹⁶

Именно молекула эмиттера является биолюминесцентной меткой, характеризующей состояние ее микроокружения в момент испускания света.¹¹² Суперпозиция двух или трех форм эмиттера (E¹–E³), фиксируемых в спектрах биолюминесценции, указывает на сосуществование в реакционной среде различных конформеров Luc в динамическом равновесии. Каждый из конформеров Luc содержит только одну из форм эмиттера, указанных на рис. 5, — кетон, енол или енолят в уравнении (2) соответственно.



Анализ спектров биолюминесценции позволяет качественно и количественно идентифицировать различные конформеры фермента и проследить за изменением их концентраций при варьировании внешних условий и при мутациях люциферазы. Так единичная замена (Tyr35Asn или Tyr35His) приводит к тому, что спектр биолюминесценции становится независимым от pH.^{117,118} Остаток Tyr35 граничит с петлей 233–237, положение которой важно для поддержания «закрытой» конформации активного центра люциферазы, необходимой для реализации «зеленой» биолюминесценции.

При замене объемного ароматического остатка Tyr35 на меньшие по размеру остатки Asn или His плотная упаковка вблизи положения 35 становится более устойчивой, и петля 233–237 сохраняется даже при понижении pH, поэтому «закрытая» конформация не нарушается.¹¹⁷ Мутация His433Tyr, наоборот, приводит к сдвигу λ_{max} биолюминесценции при pH 7.8 (pH-оптимум активности) с 566 до 606 нм, что объясняется изменением относительного содержания различных форм эмиттера.¹¹⁸

Остаток His433 расположен в подвижной петле, образованной аминокислотной последовательностью Tyr427–Phe435, которая соединяет N- и С-домены Luc. Эту петлю можно рассматривать как «шарнир», связывающий два домена люциферазы. Повышение температуры может также приводить к увеличению амплитуды тепловых колебаний доменов относительно друг друга и к повышению концентрации конформера, генерирующего «красное» свечение. Для люциферазы *Luciola mingrelica* и ряда ее единичных мутантов по остатку Glu457 показано, что при 42°C доля «красного» эмиттера увеличивается для нативной люциферазы до 90%, а для мутантов — до 100%.¹¹⁶

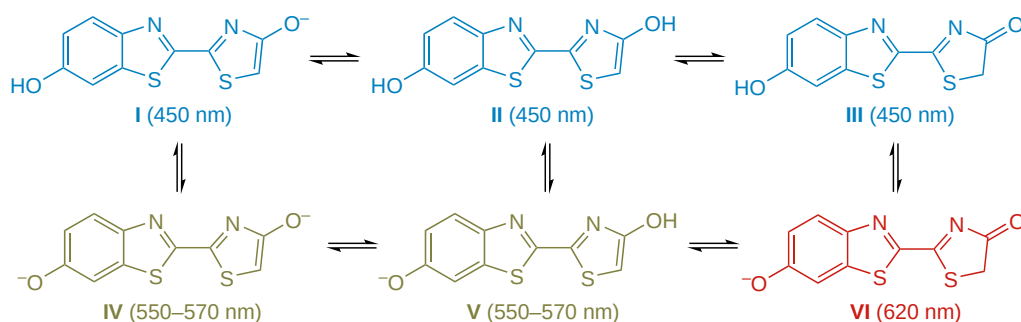


Рисунок 5. Структуры разных форм оксилуциферина: I–III — фенольные, IV–VI — фенолятные; I, IV — енолятные; II, V — енольные; III, VI — кетонные. В скобках указаны длины волн эмиссии. Рисунок создан авторами на основании данных публикации¹¹³.

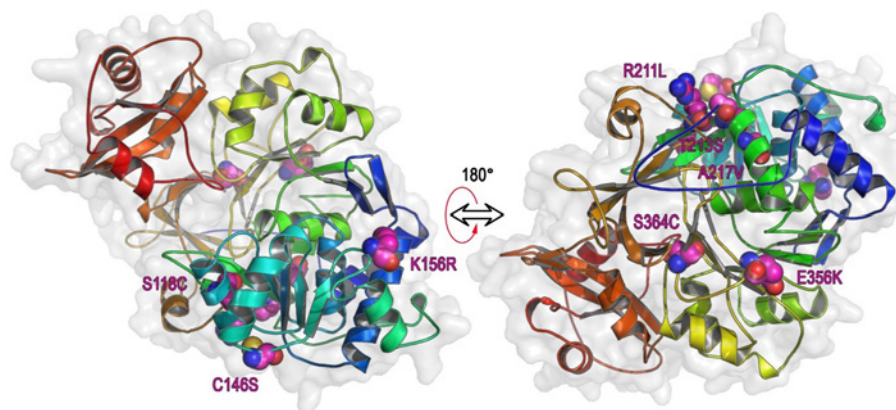


Рисунок 6. Структура люциферазы из светляков *Luciola mingrelica* (Uniprot Q26304). Аминокислотные остатки, подвергшиеся направленному мутагенезу, представлены сферами. Рисунок создан авторами на основании данных публикаций^{113,119}.

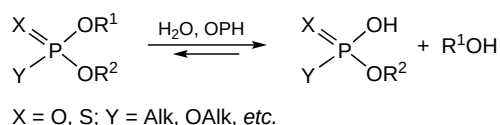
С использованием метода направленной эволюции был получен мутант люциферазы светляков *L. mingrelica* с восемью заменами (Ser118Cys, Cys146Ser, Lys156Arg, Arg211Leu, Thr213Ser, Ala217Val, Glu356Lys, Ser364Cys), термостабильность которого увеличилась в 66 раз при 42°C (рис. 6).^{113,119} Каталитические свойства мутанта также значительно улучшились по сравнению с таковыми для многих природных и других известных мутантных форм этого фермента.

Белково-инженерный дизайн Luc позволил создать сверхчувствительный количественный метод анализа АТФ и метод детекции «живых» клеток. Практические аспекты применения данного мутанта люциферазы в биолюминесцентной АТФ-метрии, которую успешно используют во многих областях науки, промышленности и медицине, детально представлены в обзоре¹²⁰.

4.2. Органофосфатгидролазы — ферменты, разрушающие нейротоксины

Органофосфатгидролаза (ОРН, КФ 3.1.8.1) (рис. 7), представленная в природе гомодимером, вызывает большой научно-практический интерес благодаря своим каталитическим характеристикам, которые проявляются в реакциях гидролиза различных фосфорорганических соединений (ФОС),^{121–124} микотоксинов^{125,126} и молекул «бактериального кворума» (схема 5).^{127,128}

Схема 5



Показана высокая эффективность использования этого фермента в составе антидотов, применяемых в экспериментах с разными животными,^{129–131} и в композиционных препаратах антимикробного действия,^{132–134} тестируемых на

клетках различных микроорганизмов. На начальном этапе исследований этого фермента наиболее подробно изучали улучшение его каталитических свойств,¹³³ а далее для обеспечения активного коммерческого использования ОРН были применены методы генетической модификации фермента, направленные на упрощение процедур выделения и очистки.

С этой целью на N- или C-конец белка генетически вводили аминокислотную последовательность, состоящую из нескольких остатков гистидина, чаще всего из шести (His₆), и обеспечивающую аффинное взаимодействие соответственно фермента His₆-ОРН или ОРН-His₆ с разными металл-хелатирующими носителями.^{135,136} Интенсивность взаимодействий между носителем и генетически модифицированной формой ОРН определяют природа металла в носителе, длина полигистидиновой (polyHis) последовательности и ее локализация на определенном конце молекулы белка.¹³⁷ С увеличением длины polyHis-последовательности взаимодействие носителя с ферментом усиливается и приводит к его затрудненному элюированию, обеспечивая успешную иммобилизацию и образование стабилизированного биокатализатора. Увеличение длины polyHis-последовательности в структуре ОРН вызывает появление олимерных форм фермента (тетра- и октамеров), одновременно существенно повышая его стабильность.¹³⁶

Крайне интересным оказалось влияние длины генетически вводимой polyHis-последовательности и места ее введения (C- или N-конец белка) на каталитические свойства модифицированного фермента, в частности на его каталитическую эффективность и субстратную специфичность действия, а также на pH среды и температурный оптимум активности.^{136,137} Было установлено, что генетическая модификация именно на N-конец ОРН с помощью polyHis-последовательности приводит к значительному улучшению каталитических характеристик фермента по отношению к субстратам с более объемными заместителями у фосфорно-

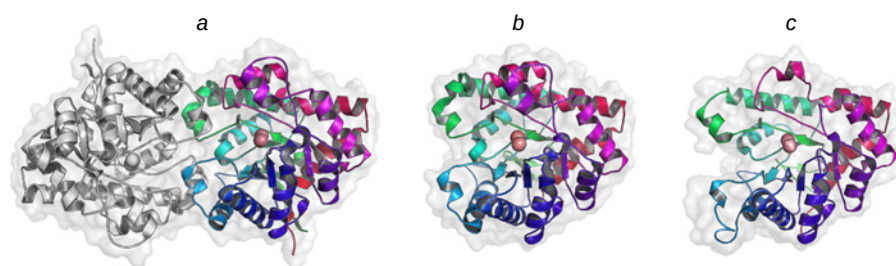


Рисунок 7. Структуры димера органофосфатгидролазы из *Brevundimonas diminuta* (a) и мономерных субъединиц ферментов из *Agrobacterium radiobacter* (b) и *Mycobacterium tuberculosis* (c). Структурные параметры взяты из базы данных RSCB PDB (коды 1QW7, 2D2G и 4IF2 соответственно). Каталитически важные ионы Co²⁺ и Zn²⁺ в активных центрах ферментов показаны в виде сфер розового цвета.

го центра в молекулах фосфорорганических пестицидов, отравляющих веществ и продуктов их гидролиза (Vx, ди-изопропилфторфосфата, эфиров метилфосфоновой кислоты и др.).^{136,137} Использование методов компьютерного моделирования позволило установить причину таких изменений в свойствах получаемых производных фермента. Она заключалась в том, что при появлении polyHis-последовательности в молекуле ОРН, участвующей в образовании димерной структуры, происходит изменение конформации, которое приводит к сильному раскрытию гидрофобных карманов, образующих центр связывания субстрата. Оказалось, что в присутствии polyHis-последовательности по внешним краям каждой из субъединиц ОРН, формирующих димер (см. рис. 7,а), конформация фермента немного «растягивается», что способствует небольшому «раскрытию» карманов, т.е. активных центров фермента, расположенных ближе к середине димерной молекулы. Создание рекомбинантных fusion-белков на основе His₆-ОРН,¹³⁶ комбинирующих свойства ОРН и других белков и ферментов за счет их биосинтетического объединения в единую молекулу через короткий аминокислотный линкер, еще больше усиливало тенденцию на расширение карманов связывания фермента с субстратами и снижение контакта между субъединицами ОРН в димере вплоть до образования устойчивых мономерных структур с измененными каталитическими свойствами.

Таким образом, генетическая модификация молекулы ОРН polyHis-последовательностями позволяет:

1) упростить процедуру приготовления высокоочищенного активного фермента и ускорить ее за счет применения супермакропористых носителей, пригодных для проточной металл-хелатирующей хроматографии;

2) совместить иммобилизацию фермента на аффинных носителях с его очисткой и получить разнообразные формы каталитически активных материалов для деградации токсичных соединений;

3) изменить физико-химические характеристики ОРН (оптимальные значения температуры и pH для проявления активности, стабильность в различных средах);

4) улучшить каталитические характеристики фермента по отношению к разным субстратам, расширив спектр субстратной специфичности His₆-ОРН;

5) создать fusion-белки с разными свойствами, обеспечивающими повышение доли ферментов с комбинированными свойствами в растворимой форме при их экспрессии в клетках *E. coli*, которые предназначены для последующего использования при детектировании и деградации ФОС в промышленности, сельском хозяйстве и экологии.

4.3. Посттрансляционные модификации ферментов

Посттрансляционные модификации (ПТМ) белков и ферментов лежат в основе регуляции межбелковых взаимодействий, определяющих процессы жизнедеятельности организмов (рис. 8). Для множества белков неизвестны иные функции, за исключением их регулируемой ПТМ способности связываться с другими биомолекулами. В настоящее время изучают типы ПТМ, определяющие конечную функцию белка, начиная от его синтеза.¹³⁸ Наибольшие проблемы возникают при исследовании рекомбинантных белков, особенно при их экспрессии в «чужих» клетках-«хозяевах». Так, результаты, полученные при изучении рекомбинантных белков эукариотов, синтезируемых в бактериях, пра-

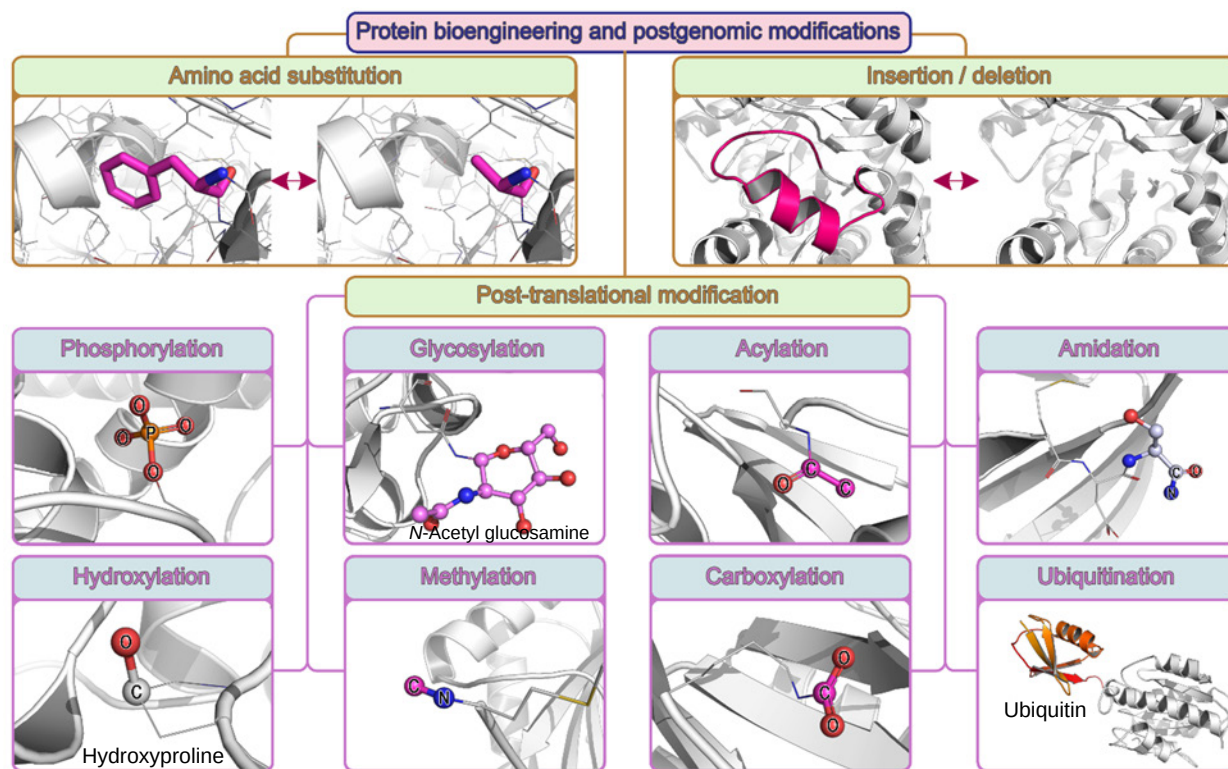
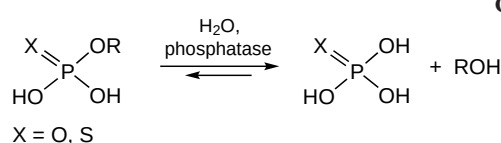


Рисунок 8. Основные подходы, применяемые в белковой инженерии, и примеры ПТМ белков: вводимая группа отмечена цветом; атомы водорода для простоты не показаны, а химические элементы окрашены в синий (азот), красный (кислород), белый или пурпурный (углерод) и оранжевый (фосфор) цвета.

ктически невозможно использовать для выяснения функционирования этих белков в организме эукариот. Посттрансляционные модификации можно разделить на три основных типа.

1. Модификации 1-го типа — ПТМ, регулирующие взаимодействия с другими биомолекулами, а также со структурными элементами клеток в целом. Известно большое число таких модификаций, но наиболее популярны¹⁰⁹ из них фосфорилирование и дефосфорилирование белков, катализируемые специальными ферментами — протеинкиназами и протеинфосфатазами (рис. 9). Введение в белки дополнительных отрицательно заряженных фосфатных групп по остаткам серина, треонина или тирозина изменяет направление их взаимодействия с другими биомолекулами. Реакции гидролиза, катализируемые фосфатазами, в общем виде представлены на схеме 6.



Имеется большое количество данных о ключевой роли фосфорилирования белков в регуляции жизнедеятельности всех организмов. Менее изучен сходный процесс, заключающийся в сульфатировании и десульфатировании белков по остаткам тирозина, который также осуществляется специальными ферментами. Развитие данного направления исследований заключается в углублении знаний о роли хорошо изученных ПТМ (неферментативное гликирование, гликозилирование, окисление, убиквитинилирование, SUMOилирование (от англ. Small Ubiquitin-like Modifier), ацетилирование) и поиске новых модификаций белков, регулирующих их взаимодействие с другими биомолекулами.

2. Модификации 2-го типа — ПТМ, влияющие на структуру белков и вызывающие изменения их функционирования. Указанные модификации приводят не только к изменению взаимодействия белков с биомолекулами, но и непосредственно влияют на их каталитическую функцию (изменяют связывание с субстратами); они затрагивают аминокислотные остатки активного центра и, как правило, вызывают инактивацию ферментов. Однако известны примеры повышения активности ферментов при модификации каталитически важных аминокислотных остатков.^{139–141}

Модификация аллостерических центров может вызывать как активацию, так и ингибирование ферментов. Обратимая модификация аминокислотных остатков активного и регуляторных центров способна стать существенным элементом регуляции каталитической активности фермента и определенного метаболического пути в целом. В этой области перспективными являются направления, связанные с поиском новых способов защиты ферментов от необратимой инактивации, что особенно важно при их использова-

нии в биотехнологических процессах. Так, для защиты от необратимого окисления наиболее уязвимых SH-групп остатков Cys, участвующих в катализе, используют способы, которые существуют в природных объектах: например, вводят в фермент дополнительные остатки Cys. Изучение роли ПТМ в регуляции свойств белков позволяет целенаправленно проводить сайт-специфический мутагенез, создавая ферменты с нужными свойствами. Например, замена остатков Cys на сериновые может вызывать такие изменения функции фермента, которые происходят при окислении SH-групп до фрагмента сульфеновой кислоты (S–OH).¹⁴²

3. Модификации 3-го типа — ПТМ аминокислотных остатков активного центра, вызывающие появление нового вида каталитической активности фермента. Именно этот тип ПТМ наиболее интересен, поскольку таких примеров немного. Кроме того, эти модификации тесно связаны с эффектом «белков подработки» («moonlighting proteins»). Для таких белков характерно наличие нескольких функций в дополнении к основной. Ферменты, относящиеся к «moonlighting proteins», наряду с проявлением главной каталитической активности обычно способны взаимодействовать с другими биологическими молекулами, участвуя в разнообразных процессах. Например, они могут связываться с нуклеиновыми кислотами, регулируя их транскрипцию или трансляцию, с разными сигнальными белками, индуцируя апоптоз и т.д. Более того, «moonlighting proteins», сохраняя главную каталитическую активность, могут осуществлять и другие реакции. Дополнительные реакции обычно не очень сложные, тесно связаны с основным каталитическим действием и обусловлены способностью фермента связывать аналоги субстратов и производить с ними необходимые превращения. Существование таких «moonlighting proteins» с разнообразными функциями, включая несколько видов каталитической активности, в определенной степени ставят под сомнение известную гипотезу молекулярной биологии «один ген — один белок». Следует отметить, что в большинстве случаев «moonlighting proteins» полностью сохраняют свою основную функцию, т.е. катализируют реакцию, для которой предназначен данный фермент. Однако одновременно такие белки участвуют еще в нескольких процессах. Посттрансляционные модификации могут усиливать способность «moonlighting proteins» к осуществлению дополнительных функций. Так, в некоторых случаях после модификации каталитически важных аминокислотных остатков активного центра фермент начинает катализировать совершенно новую реакцию, в отношении которой он ранее был индифферентен. При этом, естественно, полностью исчезает основная каталитическая активность. Следовательно, благодаря ПТМ гипотеза «один ген — один фермент» трансформируется в выражение «один ген — два фермента». К сожалению, такие примеры с убедительно доказанными механизмами в литературе практически отсутствуют.

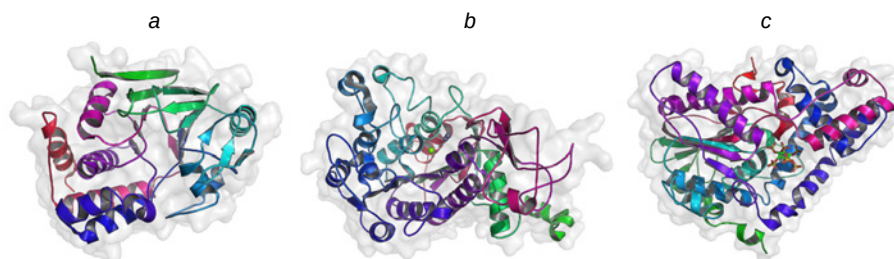


Рисунок 9. Структуры протеинфосфатазы человека (a), щелочной фосфатазы человека (b) и фитазы из *Aspergillus niger* (c). Структурные параметры взяты из базы данных RSCB PDB (коды 6DNO, 1ZED и 3K4Q соответственно). Каталитически важные ионы Mg^{2+} и Zn^{2+} в активных центрах ферментов показаны в виде сфер.

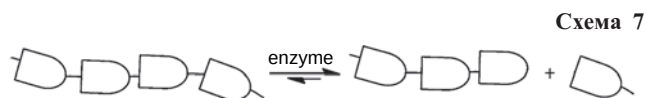
Хорошо изученным ферментом подобного рода является глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPD, КФ 1.2.1.12), которая окисляет глицеральдегид-3-фосфат до 1,3-дифосфоглицерата, восстанавливая NAD до NADH. Модификация каталитически важного Cys-остатка GAPD полностью ингибирует дегидрогеназную реакцию. Однако GAPD можно легко превратить в 1,3-дифосфоглицератфосфатазу при окислении остатка Cys в сульфеновую кислоту под действием пероксида водорода, других активных форм кислорода и даже оксида азота(II).¹⁴³ Появление нового вида активности у фермента, предназначенного для осуществления дегидрогеназной реакции, имеет значение для регуляции гликолиза и энергетических процессов в клетке. Благодаря расщеплению 1,3-дифосфоглицерата происходит разобщение стадий окисления и фосфорилирования в гликолизе, необходимое для эффективного синтеза АТФ в митохондриях в аэробных условиях.

Окисление остатков Cys может также приводить к изменению функции апуриновой/апириимидиновой эндонуклеазы-1 (APE1).^{144,145} При окислении SH-групп этого фермента до фрагментов сульфеновой кислоты происходит снижение эндонуклеазной активности, но увеличивается сродство к G-квадруплексу. В результате окисления изменяется функция APE1, и она начинает участвовать в модуляции процессов транскрипции.

Приведенные выше данные показывают, что ПТМ одного аминокислотного остатка приводит к превращению фермента в белок с совершенно иной каталитической активностью, подтверждая возможность существования модели «один ген — два фермента». Но конкретных примеров, иллюстрирующих изменение функции ферментов при их ПТМ, описано немного. Как правило, их обнаруживают случайно и не всегда уделяют им должное внимание. Такие «побочные» виды каталитической активности способны играть важную роль в целенаправленной регуляции метаболизма и могут быть использованы для создания ферментов с новыми свойствами с помощью методов генной инженерии.

4.4. Генно-инженерные полисахаридгидролазы

Зерна злаковых культур (пшеницы, ржи, овса, ячменя) широко используют в производстве кормов для животных. В составе кормов присутствует 13–15% некрахмальных полисахаридов (НПС) — целлюлозы, β -гликанов, ксиланов, — снижающих их усвояемость, затрудняя доступ пищеварительных ферментов к питательным веществам (крахмалу и белкам). Моногастричные животные и птица не имеют собственных ферментов, способных эффективно расщеплять НПС, поэтому в кормопроизводстве в качестве добавок применяют ферментные препараты (ФП), в состав которых входят полисахаридгидролазы (целлюлазы, β -гликаназы и ксиланазы) (рис. 10). За счет ферментатив-



ного расщепления НПС (на схеме 7 показаны в виде цепочки из моносахаридов) повышается усвояемость питательных веществ.¹⁴⁶

Для экономически оправданного производства ферментов важно, чтобы клетки обладали высокой продуктивностью. С этой целью либо проводят мутагенез и селекцию продуцентов ферментов, либо используют методы генетической инженерии для модификации штаммов-продуцентов, секретирующих целевые ферменты или комплексы нужных ферментов. При такой генетической модификации продуцентов можно целенаправленно изменять свойства самих белков, например увеличивать их операционную стабильность и каталитическую активность по отношению к ряду субстратов.¹¹⁷ Так, с помощью нескольких последовательных стадий индуцированного мутагенеза из дикого штамма был получен высокопродуктивный штамм *Penicillium verruculosum* B221-151, из которого далее также путем мутагенеза создали штамм *P. verruculosum* B1-537 (Δ niaD) с высокой секреторной способностью внеклеточного белка (до 50–60 г · л⁻¹). Такой штамм был ауксотрофом с дефектом в гене *niaD*, кодирующим синтез нитратредуктазы, что использовали как селекционный признак при скрининге рекомбинантных штаммов.¹⁴⁷

Штамм *P. verruculosum* B1-537 продуцировал комплекс внеклеточных целлюлаз, которые по своей активности превосходили аналоги, традиционно применяемые для биоконверсии возобновляемого растительного сырья. На основе этого штамма были созданы рекомбинантные продуценты НПС-активных ферментов,¹⁴⁸ среди которых были выбраны гетерологичная эндоглюканаза I из *Trichoderma reesei* (EGI), гомологичная EGII и гетерологичная эндоксиланаза E из *P. canescens* (XylE).

В результате были получены клетки, продуцирующие одновременно EGI и EGII, EGII и XylE, а также штамм-продуцент XylE, с использованием которых завод «Агрофермент» (<https://agroferment.ru>) в настоящее время производит ряд ФП в качестве добавок, улучшающих усвояемость кормов (табл. 3, 4). Такие ФП имели удельную эндоглюканазную (оценка по КМЦ) и ксиланазную активности, которые превышали в 1.5–3.7 и 1.7–3.3 соответственно аналогичные параметры для контрольного ФП B1-537, полученного на основе *P. verruculosum* B1-537 (*AniaD*) с помощью реципиентного штамма. При этом общая целлюлогидролазная (СВН) активность кормовых ФП (оценка по МКЦ) уменьшилась в 1.3–1.8 раза. Контрольный препарат B1-537 включал значительное количество экзодеполимераз СВНИ и СВНИИ (58% от общего содержания белка), что важно для деструкции целлюлозы до растворимых сахаров, но принципиально для кормовой добавки. В кормовых ФП

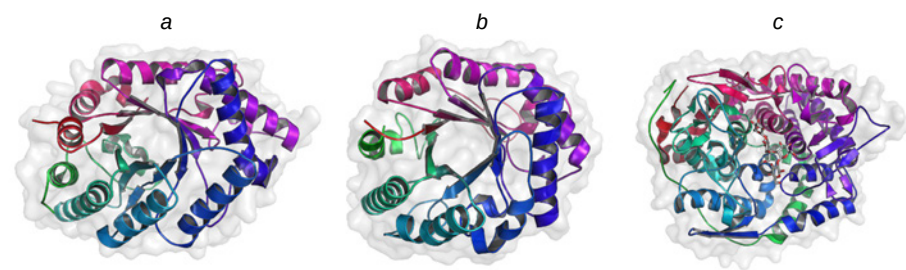


Рисунок 10. Структуры ксиланазы из *Penicillium canescens* (a), эндоглюканазы из *P. verruculosum* (b) и β -гликаназы из *Talaromyces funiculosus* (c). Структурные параметры взяты из базы данных RSCB PDB (коды 4F8X, 5I6S и 6IMW соответственно).

Таблица 3. Удельная активность кормовых ферментных препаратов на различных субстратах.¹⁴⁶

Ферментный препарат	Активность, ед. на 1 мг белка ^a			
	КМЦ	β-глюкан	ксилан	МКЦ
Контрольный препарат, получен с помощью штамма B1-537	13±1	15±1	20±2	0.96±0.08
«Агроцелл Плюс» (EGI – EGII)	48±4	52±5	9.2±0.8	0.76±0.07
«Агроксил Премиум» (EGII– XylE)	19±2	22±1	34±3	0.53±0.04
«Агроксил Плюс» (XylE)	5.2±0.4	7.1±0.4	66±6	0.66±0.06

Примечание. КМЦ — карбоксиметилцеллюлоза, МКЦ — микрокристаллическая целлюлоза. ^a Активности ФП приведены в международных единицах: за 1 единицу активности принимают начальную скорость гидролиза субстрата, которая равна 1 мкмоль восстанавливающих сахаров (в глюкозном эквиваленте), образующихся за 1 мин при 50°C и pH 5.0 в 0.05 М буфере ацетата натрия; при этом восстанавливающие сахара определяют методом Шомоди–Нельсона.

уровень СВН снижался в ~2.5 раза, а содержание эндополимераз, разрушающих НПС, существенно увеличивалось.

В целом, данные по составу ФП совпадали с изменением их специфической активности: увеличение содержания EG и XylE приводило к повышению удельной КМЦазной и ксиланазной активности соответственно, а уменьшение содержания СВН — к снижению удельной активности по МКЦ.

Фитаты (соли *D*-мио-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексакисфосфорной кислоты) являются «запасным» соединением фосфора в семенах высших растений. Содержание фитинового фосфора составляет 60–88% от общего количества фосфора в зерне.^{146,147} Из-за очень низкой фитазной активности в пищеварительной системе эта форма фосфора является недоступной для моногастричных животных, у которых 60–70% фосфора из кормов растительного происхождения не усваивается. Кроме того, фитиновая кислота связывается

с ионами Ca²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, а также с белками, крахмалом и липидами, образуя малорастворимые соединения, что значительно снижает питательную ценность кормов. Фитаза (см. рис. 9), которая гидролизует фитаты до неорганического фосфата и мио-инозитола, широко применяется в качестве кормовой добавки.¹⁴⁶

На основе системы экспрессии *P. verruculosum* был получен высокоактивный рекомбинантный продуцент гетерологичной фитазы А из *Aspergillus niger* (фитаза-3). С использованием этого продуцента завод «Агрофермент» в настоящее время производит ферментные препараты «Агрофит» с содержанием фитазы, составляющим до 50% от общего количества белка, и «Агрофит Про», который представляет собой смесь фитазы и НПС-активных ферментов.

Таким образом, на платформе системы экспрессии генов микроскопического гриба *P. verruculosum* созданы новые высокопродуктивные рекомбинантные промышленные штаммы-продуценты, с помощью которых в России в промышленных масштабах производят кормовые ФП нового поколения.^{148,149}

5. Биокатализ в медицине

5.1. Биокаталитический синтез и бактериальная резистентность к антибиотикам

Принципиально значимыми представляются исследования ферментов синтеза β-лактамов (пенициллиназа, PA) и их гидролиза (β-лактамаз, BL). Синтезируемые бактериями BL ответственны за резистентность патогенов к антимикробным средствам этого класса (рис. 11). Реакции гидролиза, которые катализируются ферментами, действующими на β-лактамы, в общем виде представлены на схеме 8.

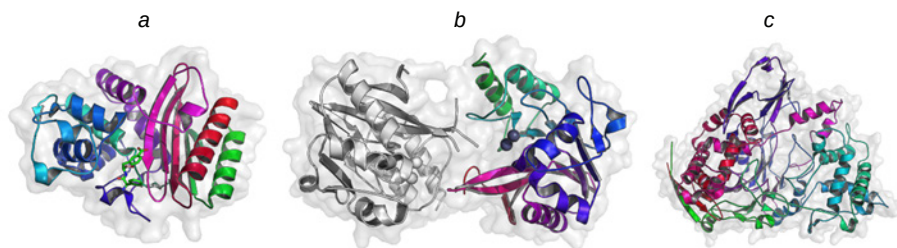
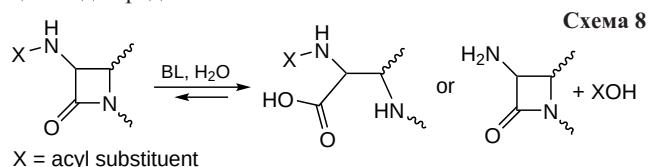


Рисунок 11. Структуры β-лактамазы TEM-1 из *Escherichia coli* (a), димерной β-лактамазы NDM-1 из *Klebsiella pneumoniae* (b) и PA из *Alcaligenes faecalis* (c). Структурные параметры взяты из базы данных RSCB PDB (коды 4OQG, 4RL0 и 3K3W соответственно). Каталитически важные ионы Zn²⁺ в активном центре NDM-1 показаны в виде сфер.

Таблица 4. Компонентный состав кормовых ферментных препаратов.¹⁴⁶

Ферментный препарат	Доля ферментов, % от общего содержания белка				
	СВН1–СВНII	EGI	EGII	XylE	другие белки
Контрольный препарат, получен с помощью штамма B1-537	58±2	—	2.1±0.1	—	40±2
«Агроцелл Плюс» (EGI – EGII)	23±1	32±2	18±1	—	28±1
«Агроксил Премиум» (EGII– XylE)	22±1	—	28±2	32±2	18±1
«Агроксил Плюс» (XylE)	25±1	—	2.0±0.1	40±2	33±2

Примечание. СВН – целлобиогидролаза.

За счет промышленного применения РА стали доступными наиболее широко используемые полусинтетические производные пенициллина и цефалоспорины, в то время как BL помогают патогенным микроорганизмам подавлять действие этих лекарственных препаратов. Наиболее значимые достижения в изучении РА связаны с установлением особенностей каталитического механизма, с определением кинетической и термодинамической характеристик ферментативных реакций и с анализом факторов, которые обуславливают эффективность переноса ацильного фрагмента. Детальное изучение кинетики такого переноса в водной среде, катализируемого РА, позволило авторам работы¹⁵⁰ предложить методику исследования и кинетическую схему количественного описания экспериментальных данных. Этот подход стал основой для сравнения активностей ферментов из разных источников и их генетических модификаций.

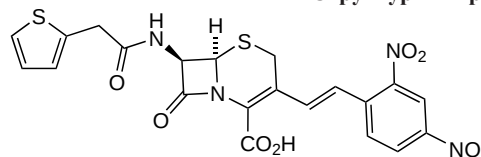
Сопоставление различных ферментных препаратов по скорости превращения выбранного субстрата некорректно, если неизвестна концентрация активных центров ферментов. Для РА (КФ 3.5.1.11) был разработан метод титрования активных центров, позволяющий сравнивать ферменты из различных источников и их мутанты, оценивать эффективность процесса иммобилизации,¹⁵¹ характеризовать субстратную специфичность РА по отношению к субстратам различных классов.¹⁵² Для этой цели оказался пригодным широко известный в энзимологии фенилметансульфонилфторид, используемый для инактивации протеаз при выделении и очистке белков. Пенициллинацилазы способны чрезвычайно эффективно связывать это соединение с образованием фермент-ингибиторного комплекса, что приводит в результате к ковалентной модификации ключевого каталитического остатка Ser и инактивации фермента. Метод титрования активных центров РА активно применяют в различных исследованиях (см., например, работу¹⁵³).

Основные процессы, связанные с развитием бактериальной резистентности к антибиотикам, определяются действием бактериальных гидролаз — пенициллинсвязывающих белков (PBP) и BL. Первые отвечают за синтез олигопептидов бактериальной клеточной стенки, их рост и деление и являются основной мишенью β -лактамов антибиотиков — ковалентных ингибиторов этих ферментов. Вторые появились у бактерий в процессе эволюции и были предназначены для инактивации антибиотиков путем гидролиза C–N-связи β -лактамного цикла.^{154, 155} Ферменты PBP являются сериновыми гидролазами, а BL могут быть как сериновыми гидролазами, так и металло-ферментами.^{156, 157}

В случае сериновых гидролаз на первой стадии происходит ацилирование боковой цепи аминокислотного остатка Ser, в то время как в металло-BL аналогичный процесс включает участие каталитического гидроксид-иона вместо остатка Ser.^{158, 159} В пенициллинсвязывающих белках стадия дезацилирования медленная, что объясняет формирование долгоживущего ковалентного комплекса фермента с ингибитором.¹⁶⁰ Напротив, сериновые BL характеризуются большой скоростью дезацилирования, с чем и связана быстрая деградация молекул антибиотика. В металло-BL стадия дезацилирования отсутствует, в результате чего дополнительно увеличивается эффективность их инактивации. Резистентность возникает в результате мутаций в генах, кодирующих структуру PBP, что приводит к ухудшению связывания антибиотика или уменьшению скорости ацилирования, или увеличению скорости дезацилирования.

Цефалоспориновые антибиотики относятся к группе β -лактамов. На основе цефалоспорины синтезирован нитроцефин — хромогенный субстрат, с помощью которого можно следить за кинетикой превращения.

Структура нитроцефина



При изучении гидролиза нитроцефина в активном центре металло-BL L1 было выделено три элементарных стадии реакции и отмечено накопление интермедиата. Расчеты методом КМ/ММ показали, что на первой стадии происходит нуклеофильная атака гидроксид-иона на карбонильный атом углерода субстрата, что и определяет первую, большую наблюдаемую константу скорости.¹⁶¹ Далее с невысоким энергетическим барьером разрывается C–N-связь четырехчленного цикла нитроцефина, сопровождающаяся образованием стабильного интермедиата. Лимитирующей является последняя, третья стадия реакции, на которой происходит перенос протона с карбоксильной группы каталитической аспарагиновой кислоты на атом азота антибиотика. Эти исследования позволили детализировать последовательность элементарных стадий с атомарным разрешением и применить полученные данные для анализа реакционной способности родственных соединений.¹⁶²

Было проведено репозиционирование терапевтического средства унитиола, связывающего ионы тяжелых металлов, в качестве ингибитора металло-BL NDM-1.¹⁶³ Детальное сравнение структур комплексов фермент–ингибитор и фермент–субстрат, полученных методами КМ/ММ, показало, что эффективное связывание унитиола обусловлено распознаванием активным центром фермента сульфогруппы и консервативной карбоксигруппы антибиотика и связыванием тиолята катионами цинка вместо каталитического гидроксид-аниона. Таким образом, установление механизмов ферментативных реакций и определение их элементарных стадий позволяет прогнозировать возможные структуры комплексов фермент–ингибитор и находить новые ингибиторы для ключевых ферментов патогенов.

5.2. Ингибиторы холинэстераз — борьба с болезнью Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера (БА) — одно из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний в пожилом возрасте, которое характеризуется прогрессирующей потерей памяти и других когнитивных функций и в итоге приводит к полной инвалидности и смерти. Отсутствие эффективной терапии БА в значительной степени связано со сложным мультифакторным характером патогенеза этого заболевания.¹⁶⁴ Существует «холинергическая гипотеза» БА, согласно которой дефицит ацетилхолина коррелирует с когнитивными нарушениями. На этом основано лечение таких пациентов ингибиторами ацетилхолинэстеразы (AChE) и бутирилхолинэстеразы (BChE) — ферментов, регулирующих уровень ацетилхолина в синаптическом пространстве.

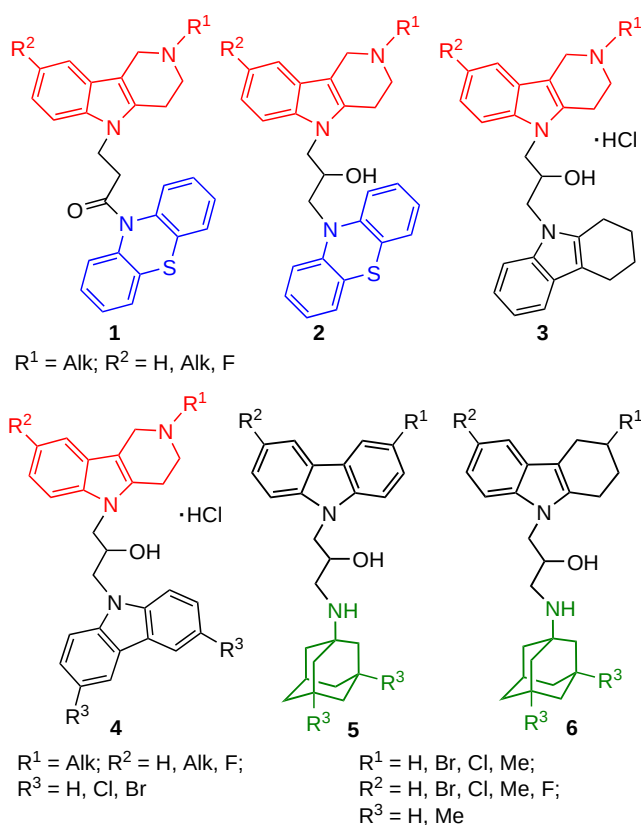
По мере прогрессирования БА активность AChE снижается, в то время как активность BChE увеличивается и возрастает ее роль как терапевтической мишени. Известно, что селективные ингибиторы BChE повышают уровень ацетилхолина в мозге, не оказывая побочных холинергических эф-

фектов, характерных для ингибиторов AChE.¹⁶⁵ Важную роль сыграло открытие проагрегантных свойств AChE в отношении β-амилоида посредством участия периферического анионного сайта.¹⁶⁴ Поскольку BChE также связана с различными стадиями амилоидогенеза,¹⁶⁶ то ингибиторы данного фермента представляют интерес и с точки зрения антиамилоидной стратегии.

В настоящее время одним из наиболее перспективных подходов к фармакотерапии БА является направленное конструирование препаратов, способных действовать одновременно на несколько потенциальных биомишеней патогенеза этого заболевания, включая новые аспекты ингибирования ацетил- и бутирилхолинэстераз.^{167,168}

Удачным примером реализации такого подхода стал синтез оригинальных мультилигандных соединений **1–6**. Такие структуры представляют собой конъюгаты фармакологически значимых скаффолдов, которые способны как ингибировать обе холинэстеразы, так и селективно подавлять функции BChE. Важно, что эти соединения способны действовать и на ряд других важных биологических мишеней, что обеспечивает их высокие нейропротекторные свойства.^{168,169} Так, конъюгаты **1–4** проявили высокую ингибирующую активность в отношении BChE с концентрацией полумаксимального ингибирования (IC_{50}) в диапазоне 1–6 мкМ и высокую селективность по сравнению с AChE и анти-мишенью — карбоксилэстеразой.^{170,171} Эти результаты позволяют ожидать от таких соединений когнитивно-стимулирующего действия без холинергических побочных эффектов и неблагоприятных взаимодействий с другими лекарствами. Конъюгаты **5** и **6**, сочетающих фрагменты карбазола и аминоксантаманов, эффективно и селективно ингибируют BChE с $IC_{50} = 3–15$ мкМ.¹⁷²

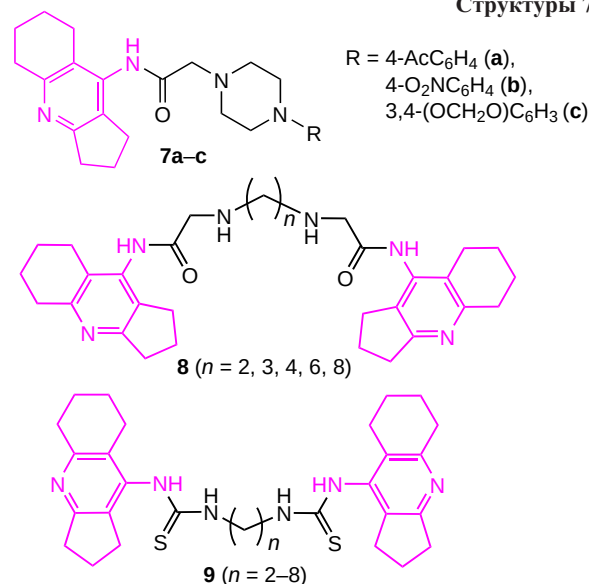
Структуры 1–6



Создание мультитаргетных структур можно также осуществлять путем направленной модификации известных антихолинэстеразных препаратов. В этом случае привлекательным подходом является улучшение фармакологического профиля известных лекарств, таких как такрин или его аналог амиридин, объединяя их через спейсер с другими активными фармакофорами.^{167,173–175} В качестве второго фармакофора может быть использован тот же антихолинэстеразный препарат, в результате получают гомодимеры.¹⁷⁶

Соединения-лидеры **7a–c**, выявленные среди конъюгатов амиридина с пиперазином, эффективно ингибируют AChE со значением IC_{50} в микромолярном диапазоне по смешанному механизму. По результатам докинга такие конъюгаты являются бифункциональными агентами, ингибирующими гидролиз нейромедиатора ацетилхолина и блокирующими AChE-индуцируемый амилоидогенез.¹⁷⁴ Гомодимеры **8** и **9** с двумя фрагментами амиридина также эффективно ингибируют холинэстеразы, преимущественно BChE, превышая активность исходного препарата.¹⁷⁶ Удлинение спейсера между фармакофорами приводит к повышению анти-AChE-активности и способности ингибировать AChE-индуцируемый амилоидогенез.

Структуры 7–9



Таким образом, выявленная недавно роль холинэстераз в патогенезе БА позволяет по-новому взглянуть не только на развитие этого заболевания, но и наметить новые подходы к созданию эффективных нейропротекторных препаратов на основе оригинальных модуляторов активности AChE и BChE.

5.3. Биокаталитические процессы репарации ДНК

Сохранение целостности структуры ДНК определяет стабильность клеточного генома. Однако ДНК достаточно легко повреждается под действием различных факторов, наиболее распространенным из которых является окислительный стресс. Ключевую роль в сохранении целостности генома выполняют механизмы репарации ДНК, которые исправляют повреждения. Мутации генов, кодирующих белки репарации ДНК, приводят к возникновению различных патологий, в том числе к онкологическим и нейродегенеративным заболеваниям.¹⁷⁷

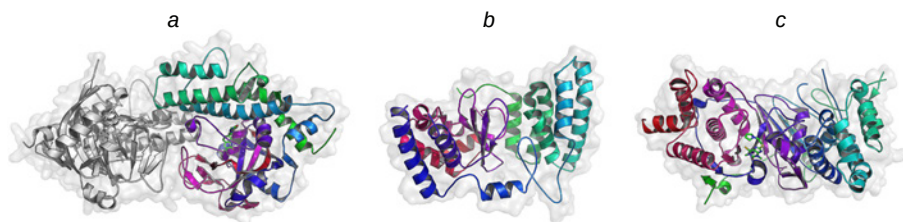


Рисунок 12. Структуры димера поли-(ADP-рибоза)полимеразы 1 человека (PARP1) (a), белкового фактора PAR-илирования гистонов 1 (HPF1) (b) и поли(ADP-рибоза)гликогидролазы человека (PARG) (c). Структурные параметры взяты из базы данных RSCB PDB (коды 7ONT, 6M3G и 6O9X соответственно).

Системы репарации функционируют как надмолекулярные ансамбли белков, в которых одни ферменты выполняют основную каталитическую функцию, а другие ферменты и белковые факторы регулируют их активность. Поли(ADP-рибоза)полимераза 1 (PARP1) — один из ключевых ферментов, регулирующих репарацию ДНК в клетках высших эукариот (рис. 12) путем поли(ADP-рибозил)ирования белков, еще одной важной ПТМ.

В ответ на повреждения ДНК (одно- и двуцепочечные разрывы цепей), вызываемые генотоксическим стрессом, PARP1 катализирует синтез поли(ADP-рибозы) (PAR)¹⁷⁸ — отрицательно заряженного разветвленного полимера, используя в качестве субстрата никотинамидадениндинуклеотид (NAD^+) (рис. 13).

Макромолекула PAR ковалентно присоединяется к самому ферменту, в результате чего PARP1 приобретает отрица-

тельный заряд и может диссоциировать из комплекса с повреждением ДНК, тем самым иницируя процесс его репарации. Реакция образования PAR обратима: полимер подвергается расщеплению с помощью фермента поли(ADP-рибоза)гликогидролазы (PARG), что обеспечивает регуляцию уровня PAR в клетке. Остаток ADP-рибозы, присоединенный непосредственно к белку-мишени, устойчив к действию PARG и удаляется другими ферментами. Фермент PARP1 — член большого семейства, включающего 17 белков, которые тоже используют в качестве субстрата NAD^+ . Однако катализировать синтез PAR в клеточном ядре в ответ на повреждение ДНК способны в основном PARP1 и открытый впоследствии аналогичный фермент PARP2. Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) было подтверждено, что PARP1 и PARP2 взаимодействуют с повреждениями в ДНК и катализуют синтез PAR.¹⁷⁹

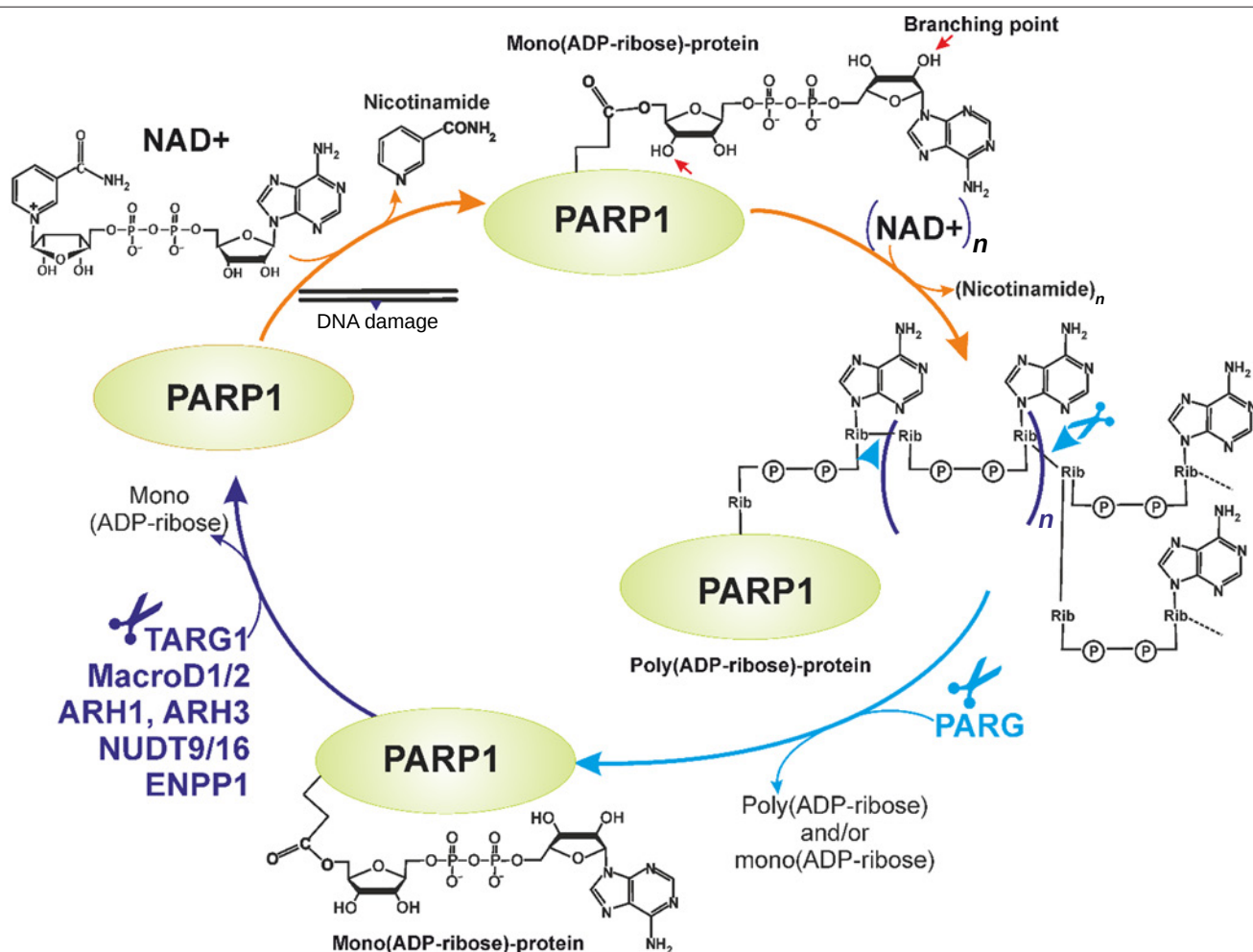


Рисунок 13. Схема синтеза разветвленного полимера ADP-рибозы, катализируемого PARP1 с использованием NAD^+ в качестве субстрата, при повреждениях ДНК. Рисунок создан авторами на основании данных публикации¹⁷⁸.

В репарацию ДНК могут быть вовлечены РНК-связывающие белки.^{180,181} Поли(ADP-рибоза) моделирует РНК, поэтому можно ожидать взаимодействия с ней РНК-связывающих белков, в результате чего такие белки способны входить в комплексы репарации ДНК.¹⁸² Среди РНК-связывающих ядерных белков особое внимание привлекают белки с неструктурированными доменами, которые важны для взаимодействия с PAR. Один из таких белков — FUS-белок (от англ. Fused in Sarcoma), мутации в гене которого приводят к возникновению серьезного нейродегенеративного заболевания — бокового амиотрофического склероза. При генотоксическом стрессе этот белок взаимодействует с PAR (см.¹⁸³) и концентрируется на повреждениях ДНК.¹⁸⁴ При связывании FUS-белка с поли(ADP-рибозой), синтезируемой PARP1, образуются немембранные компартменты, которые можно обнаружить с помощью АСМ.¹⁸⁵ За счет формирования компартментов достигается разделение поврежденной и массива неповрежденной ДНК, а также происходит концентрирование белков репарации на повреждениях.^{181,185}

В 2016 г. был обнаружен¹⁸⁶ новый кофермент PARP1/2 — фактор PAR-илирования гистонов 1 (histone PARylation factor 1, HPF1). Этот белок регулирует активность и специфичность PARP1/2 и образует с каждым из этих ферментов совместный активный центр.¹⁸⁷ Роль белкового взаимодействия заключается в переключении специфичности PAR-илирования с остатков аспартата, глутамата и других аминокислот на остатки Ser.¹⁸⁸ Структурный и мутационный анализ комплекса HPF1 с PARP2 показал, что при формировании общего активного центра происходит внедрение каталитического остатка Glu284 кофермента HPF1 недалеко от остатков глутамата белков PARP1 и PARP2, участвующих в катализе, и от молекулы NAD⁺. В результате формируется активный центр, способный катализировать эффективный перенос ADP-рибозы на остаток Ser.¹⁸⁷

В исследованиях механизма действия HPF1 в присутствии ДНК, свободной либо связанной с нуклеосомой,^{189,190} показано, что этот кофермент стимулирует стадию инициации PAR-илирования. Он многократно увеличивает изначально низкую активность PARP2 в присутствии специфического повреждения ДНК и гистонов-акцепторов PAR. Таким образом, PARP2 выполняет специфическую роль в ответе на повреждения ДНК в составе хроматина.¹⁹¹ Этот вывод согласуется с недавно обнаруженными «волнами» синтеза PAR и PAR-илирования *in vivo*. Первая волна синтеза PAR в клетках ассоциирована с обширной, но короткоживущей аутомодификацией PARP1, вторая представлена более стабильной модификацией хроматина.¹⁹²

Ферменты PARP1/2 — важные фармакологические мишени при разработке новых методов лечения заболеваний человека. Ингибирование активности этих ферментов задерживает их в комплексах с разрывами ДНК, что препятствует процессам репарации таких повреждений и приводит к гибели раковых клеток. Получение эффективных и селективных ингибиторов PARP1/2 — одно из интенсивно развивающихся направлений современной медицинской химии.¹⁹³ Все используемые в настоящее время в медицине ингибиторы PARP являются аналогами NAD⁺ и взаимодействуют с NAD⁺-связывающим участком активного центра фермента, что объясняет их высокую токсичность и низкую специфичность. Дальнейшее исследование механизма функционирования PARP в клеточных процессах необходимо для поиска иных способов воздействия на эту мишень. Наиболее перспективным из них является воздействие на

специфические контакты PARP с белками-партнерами, например HPF1, что может быть положено в основу нового подхода к созданию противоопухолевых препаратов.¹⁹⁴

Помимо детектируемых белками PARP одно- и двуцепочечных разрывов, в ДНК могут содержаться в заметных количествах повреждения самой разной химической природы. Так, расщепление *N*-гликозидной связи дезоксирибонуклеозидов приводит к возникновению апурин-апириимидиновых (АП) сайтов. Эти сайты образуются также в качестве интермедиатов при эксцизионной репарации оснований (ЭРО) ДНК после действия ДНК-гликозилаз, удаляющих из ДНК поврежденные основания. Апурин-апириимидиновые сайты представляют собой равновесные полуацетальные и альдегидные формы (рис. 14, структуры **10**, **11**). Они нестабильны и подвержены элиминированию 3'-фосфата с образованием α,β -ненасыщенного альдегида **12** (PUA) на 3'-конце ДНК. Такой же продукт и 2'-дезоксирibo-5'-фосфат **13** (dRP) образуются как интермедиаты в ходе ЭРО. Ввиду невозможности образовывать канонические пары оснований АП-сайты цитотоксичны и высокочувствительны.

Репликативные ДНК-полимеразы при достижении АП-сайтов либо высвобождают ДНК, либо катализируют включение dAMP напротив участка повреждения. Существуют специализированные (транслезионные) ДНК-полимеразы, которые могут эффективно включать dNMP в такие положения, однако вероятность мутации все равно остается очень высокой. В связи с этим АП-сайты в клетках должны быстро подвергаться репарации. В последнее время стало понятно, что из-за высокой реактивности АП-сайтов в живой клетке находится множество их производных. Под воздействием различных окислителей, ксенобиотиков и ионизирующего излучения возникают АП-сайты, окисленные по положениям C1' (2'-дезоксирибонуклеотид, DRL, **14**), C2' (**15**), C4' (**16**, **17**) и C5' (**18**, 1,4-диоксобутан **19**).¹⁹⁵ Апириимидиновые сайты легко вступают в реакции с нуклеофилами, образуя широкий спектр аддуктов с низкомолекулярными соединениями и белками.^{196,197} Методы секвенирования и масс-спектрометрического анализа подтверждают, что по числу модифицированных АП-сайтов превосходят их альдегидные формы.

Начиная с 1990-х гг. стали появляться сообщения о том, что альдегидные АП-сайты, PUA и dRP эффективно образуют довольно долгоживущие азометиновые конъюгаты **20** с аминокислотными группами самых разных ДНК-связывающих белков — ферментов и структурных белков репарации, гистонов, ДНК-лигаз, интеграз, топоизомераз и т.п. Еще легче в такие реакции вступают окисленные АП-сайты.¹⁹⁸ В настоящее время в этом плане наиболее изучен DRL (**14**), который захватывает PARP1, Ku-антиген, ДНК-полимеразы β и λ , ДНК-гликозилазы Nth, OGG1, NEIL1 и NEIL3 как *in vitro*, так и в клетках, обработанных окисляющими агентами. Белки также могут образовывать аддукты с АП-сайтами через свои тиогруппы (см. структуру **21**).

В 2020 г. был открыт¹⁹⁹ особый путь защиты АП-сайтов от спонтанной деградаци, главная роль в котором принадлежит белку HMCES, образующему с АП-сайтами тиазolidиновый конъюгат **22** в результате реакции бокового заместителя и аминокислотной группы N-концевого остатка Cys1. Далее такой конъюгат удаляется по стандартному пути репарации ДНК-белковых сшивков с гидролизом белковой части протеазой SPRTN. Апурин-апириимидиновые сайты являются одним из главных источников ДНК-белковых сшивков в клетке. Предложен метод получения стабильных конъюгатов АП-сайтов с белками — оснований Шиффа **20**, который за-

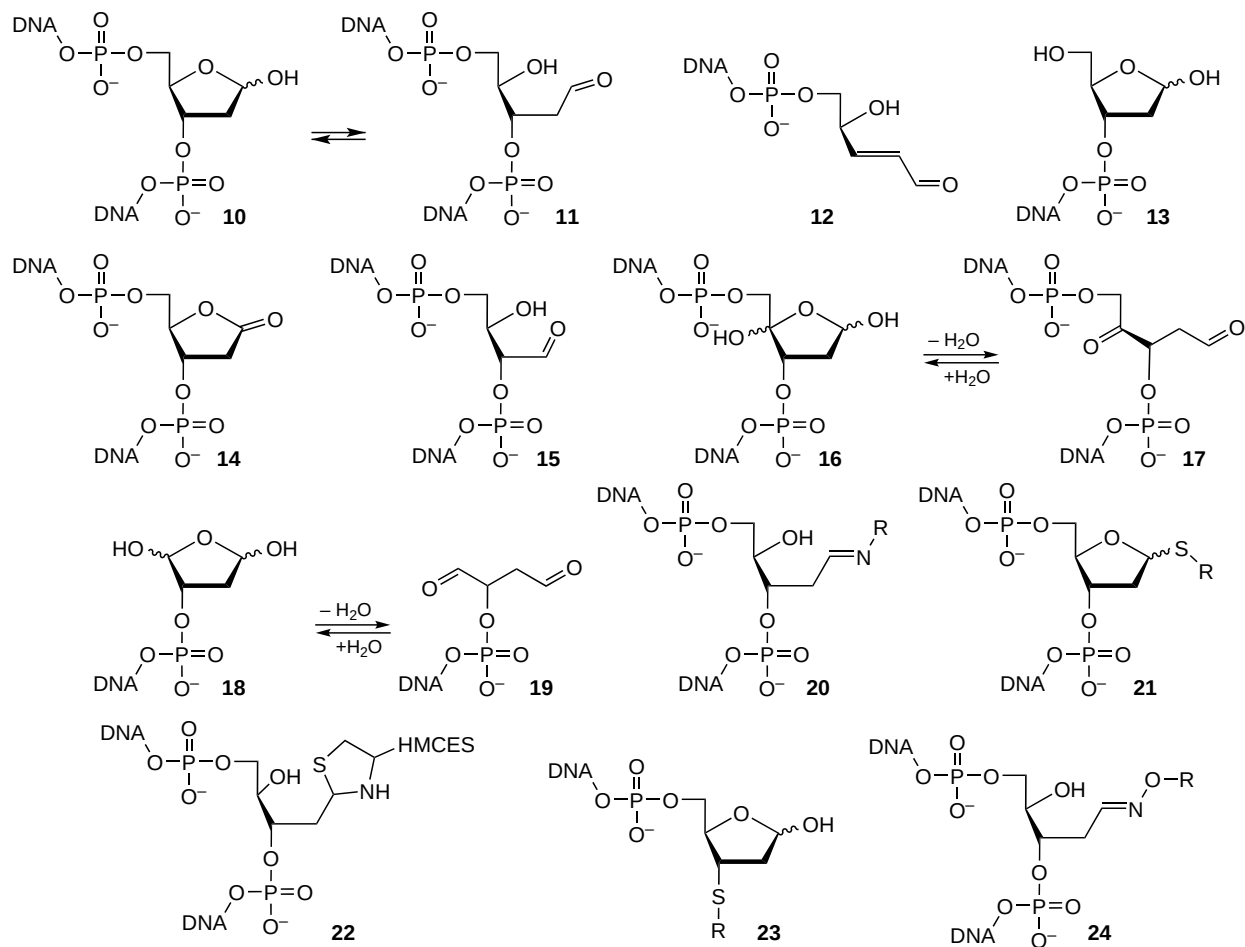


Рисунок 14. Структуры модифицированных АП-сайтов и их конъюгатов.

ключается в восстановлении NaBH_4 ковалентных интермедиатов реакций ДНК-гликозилаз. Было исследовано взаимодействие большого числа ДНК-полимераз эукариот, бактерий, архей и вирусов с ДНК-белковыми сшивками.^{200–202}

Репарация ДНК-белковых сшивок тесно связана с процессом репликации и в клетках человека начинается с протеолитической деградации белковой части конъюгата с участием протеасомы и специфично действующих протеаз SPRTN, FAM111A и DD11.²⁰³ До последнего времени оставалось неясным, как завершается репарация остаточных ДНК-пептидных конъюгатов. Разработанные авторами работ^{203–205} методы получения стабильных АП-сайт/пептидных сшивок позволили ответить на этот вопрос. Оказалось, что такие конъюгаты расщепляются АП-эндонуклеазами, причем ферменты Nfo и Arp1p с одинаковой эффективностью реагируют с любыми АП-сайт/пептидными аддуктами, в то время как APE1 человека отдает предпочтение образованию конъюгатов с участием ϵ -аминогруппы Lys, а не α -аминогруппы пептида.¹⁷⁷ Примечательно, что конъюгаты первого типа представляют собой значительно более сильное препятствие для ДНК-полимераз, чем АП-сайты и конъюгаты второго типа.^{206,207}

Наконец, АП-сайты и PUA образуют ковалентные аддукты с низкомолекулярными соединениями — метаболитами и ксенобиотиками, например с глутатионом (см. структуру 23) и алкоксиаминами (см. структуру 24). Последние особенно перспективны как терапевтические соединения, поскольку их конъюгаты 24 устойчивы к действию всех фер-

ментов ЭРО, репарирующих АП-сайты.²⁰⁸ Простейший представитель этой группы соединений метоксиамин показал многообещающие результаты в клинических испытаниях как сенсibilизатор опухолей при терапии темозоломидом.

Таким образом, в последние годы достигнуты значительные успехи в понимании роли АП-сайтов в спектре повреждений ДНК, которые порождают множество модификаций, репарируемых разными путями, и по-разному взаимодействуют с репликативным аппаратом клетки.

5.4. Гемсодержащие пероксидазы: двойственная роль в организме человека

В организме человека присутствуют ферменты семейства гемсодержащих пероксидаз млекопитающих, основными из которых являются миелопероксидаза (МРО, КФ 1.11.2.2), пероксидаза эозинофилов (ЕРО, КФ 1.11.1.7), лактопероксидаза (ЛРО, КФ 1.11.1.7) и тиреоидная пероксидаза (ТРО, КФ 1.11.1.8) (рис. 15). Эти ферменты объединены в одну группу благодаря наличию гема в активном центре и способностью окислять многие субстраты в физиологических условиях.^{209,210} Фермент ТРО экспрессируется в щитовидной железе и играет ключевую роль в синтезе гормонов тироксина и трийодтиронина; ЛРО секретируется эпителиальными клетками и обнаружена в различных экзокринных выделениях человека (молоке, слюне, слезной жидкости и др.), где выполняет бактерицидную функцию; ЕРО локализована в матриксе специфических гранул эозинофилов, а

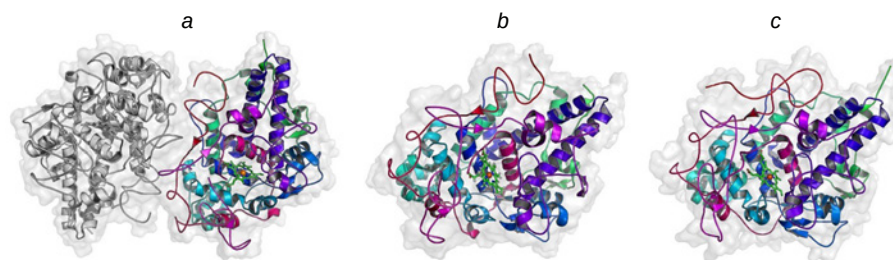


Рисунок 15. Структуры димера МРО человека (a) и мономерных субъединиц ЕРО человека (b) и ЛРО быка (c). Структурные параметры взяты из базы данных RSCB PDB (коды 5WDJ, 8OGI и 3I6N соответственно). Каталитически важные ионы Fe^{2+} и Fe^{3+} в активных центрах ферментов показаны в виде сфер.

МРО содержится в азурофильных гранулах нейтрофилов, а также в лизосомах моноцитов.

Упрощенная схема функционирования гемсодержащих пероксидаз млекопитающих представлена на рис. 16. Утилизируя молекулу H_2O_2 , эти ферменты отдают ей 2 электрона и из нативной ферри-формы (Por-Fe^{3+} , где Por — порфирин) превращаются в соединение I ($\text{Por}^{++}\text{-Fe}^{4+}=\text{O}$). Гем соединения I, благодаря оксоферрильной форме железа и π -катион-радикалу порфирина, обладает двумя окислительными эквивалентами. Это позволяет соединению I осуществлять последовательное одноэлектронное окисление субстратов через образование соединения II ($\text{Por-Fe}^{4+}=\text{O}$) с возвращением в исходное состояние (Por-Fe^{3+}) и замыканием пероксидазного цикла (см. рис. 16, реакции 1–3). В качестве субстратов пероксидазного цикла (обозначены АН на рис. 16) выступают доноры электрона, такие как аскорбат, нитрит, Туг, Тгр и множество ксенобиотиков ароматической природы.

В отличие от обычных пероксидаз соединение I в составе гемсодержащих пероксидаз млекопитающих обладает уникальной способностью осуществлять двухэлектронное окисление галогенидов (Cl^- , Br^- , I^-) и псевдогалогенидов (SCN^-) до соответствующих гипогалоидных кислот, замыкая тем самым цикл галогенирования (см. рис. 16, реакции 1 и 4), который описывается суммарным уравнением (3)

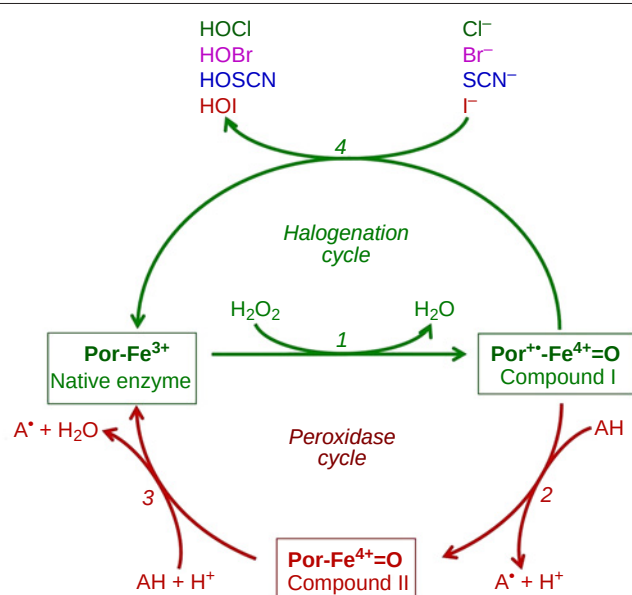
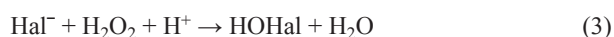


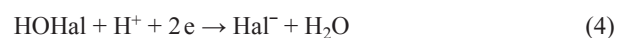
Рисунок 16. Схема пероксидазного и галогенирующего циклов ферментов семейства гемсодержащих пероксидаз млекопитающих. Рисунок создан авторами на основании данных публикации²¹⁰.

По способности окисляться (псевдо)галогениды располагаются в следующей последовательности: $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$. Однако при физиологических значениях pH и типичных концентрациях этих анионов в плазме крови МРО преимущественно катализирует образование HOCl .²¹¹ Соединение I в составе ЕРО окисляет Cl^- только при низких значениях pH, а при pH 7.0 оно гораздо быстрее окисляет Br^- , I^- и SCN^- , чем аналогичное соединение в составе МРО. В то же время при нейтральных pH фермент ЛРО медленно окисляет Br^- , но очень быстро — I^- и SCN^- . Все четыре фермента способны окислить I^- до иодноватистой кислоты (HOI). Поскольку концентрация I^- в крови и тканях (за исключением щитовидной железы) меньше 1 мкМ, то окислением этого аниона в организме в естественных условиях можно пренебречь.

Из представленного выше материала можно сделать следующие выводы:

- 1) концентрация Cl^- в крови более чем в 1000 раз превосходит концентрации других (псевдо)галогенидов;
- 2) в крови человека на долю нейтрофилов и моноцитов, в которых содержится МРО, приходится до 80% всех лейкоцитов;
- 3) при физиологических условиях только соединение I в составе МРО способно быстро окислить Cl^- до HOCl .

Следовательно, именно МРО выполняет роль главного источника галогенсодержащих реактантов в крови человека, основным представителем которых, вероятнее всего, должна быть хлорноватистая кислота (HOCl). Гипогалоидные кислоты обладают выраженными окислительными свойствами в соответствии с уравнением (4), причем окислителем является атом галогена.



Именно по этой причине гипогалоидные кислоты и их реакционноспособные производные принято называть активными формами галогенов (АФГ).^{209–212}

Миелопероксидаза играет важную роль в защите организма от патогенов. Нейтрофилы фагоцитируют чужеродные микроорганизмы, при этом происходит дегрануляция, в результате которой азурофильные и другие цитоплазматические гранулы нейтрофилов сливаются с мембраной фагосомы. Этот фермент вместе с другими бактерицидными белками оказывается в фагосоме с патогеном и катализирует образование АФГ, что приводит к его гибели. МРО-Зависимая антимикробная система нейтрофилов является самой эффективной из всех бактерицидных систем фагоцитов. Другой МРО-зависимый бактерицидный механизм действия нейтрофилов, получивший название нетоз, заключается в формировании и высвобождении во внеклеточное пространство сетеподобных структур, состоящих из деконденсированной ДНК с встроенными бактерицидными белками, включая МРО. Такие структуры называют нейтрофильными внеклеточными ловушками. Попадая в ловушки, бакте-

рии погибают, подвергаясь воздействию антимикробных агентов, в том числе и АФГ, которые образуются при функционировании МРО.²¹³ Именно таким способом АФГ защищают организм от патогенов.

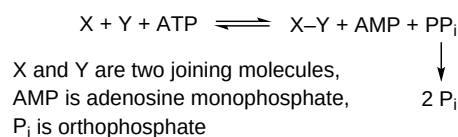
Однако неконтролируемое аномально высокое высвобождение МРО из лейкоцитов в результате их активации, дегрануляции, некроза, некроза и(или) повышение активности данного фермента может приводить к чрезмерному продуцированию АФГ. В силу высокой реакционной способности и неспецифичности действия АФГ могут повреждать биомолекулы, клетки и ткани организма-«хозяина», что вызывает появление галогенирующего стресса.^{209,210,214,215} Последний характеризуется дисбалансом между усиленным образованием АФГ и сниженной способностью организма удалять или нейтрализовать их избыточное количество.^{209,210,214,215} Накопилось много экспериментальных доказательств того, что галогенирующий стресс является причиной возникновения или, как минимум, сопровождает развитие ряда воспалительных заболеваний, среди которых сердечно-сосудистые, нейродегенеративные, аутоиммунные, онкологические, эндокринные.^{209–211,214,215} Показано, что в крови больных указанными заболеваниями обнаруживаются не только повышенная концентрация (активность) МРО, но и многочисленные маркеры галогенирующего стресса: модифицированный НОС1 белок, 3-хлор- и 3-бром-тирозины, 2-хлоральдегиды, хлоргидрины ненасыщенных фосфолипидов, 5-хлорурацил, 5-хлорцитидин, 8-хлоргуанозин и др.^{209–211}

Таким образом, гемсодержащие пероксидазы выполняют в организме важную бактерицидную функцию, защищая его от патогенов, но одновременно способны повреждать клетки и ткани организма-«хозяина», провоцируя развитие воспалительных заболеваний. Для снижения повреждающего действия гемсодержащих пероксидаз и в то же время для сохранения их бактерицидной функции целесообразно разрабатывать стратегии, направленные на регуляцию активности таких ферментов и выяснение механизмов их появления в крови.²¹¹ Для этого необходимы разработка чувствительных методов нового поколения, основанных на обнаружении пероксидаз,^{211,216} АФГ,²¹⁷ биомаркеров галогенирующего стресса, а также поиск специфических ингибиторов,²¹⁸ позволяющих адекватно поддерживать бактерицидную активность ферментов при одновременном сдерживании развития воспалительных процессов.²¹¹

5.5. Мембранные и растворимые гидролазы (синтетазы) пирофосфата — ключевые ферменты энергетического обмена

Пирофосфат ($P_2O_7^{4-}$) — макроэргический анион, образующийся в больших количествах как побочный продукт биосинтеза белков, нуклеиновых кислот (НК), полисахаридов и

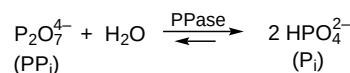
Схема 9



многих других соединений. Число таких реакций исчисляется сотнями, и они обычно протекают по общей схеме 9.

Для эффективного протекания этих реакций требуется энергия, источником которой является АТФ. Величина свободной энергии Гиббса (ΔG^0) для гидролиза АТФ до АМР и пирофосфата (пирофосфоролиза) составляет $-46 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$, еще $\sim 20 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ выделяется при гидролизе PP_i до фосфата. В сумме это значение на $35 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ меньше величины ΔG^0 для расщепления АТФ по терминальной фосфоэфирной связи с образованием АДФ и фосфата, которая составляет $31 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$. По этой причине в результате двухстадийного гидролиза АТФ достигается более полное протекание реакций биосинтеза и появляется возможность его регулирования изменением стационарной концентрации PP_i . По закону действующих масс ее уменьшение будет стимулировать биосинтез и, наоборот, ее увеличение будет подавлять процесс. Стационарная концентрация PP_i зависит от активности пирофосфатазы ($PPase$, КФ 3.6.1.1), превращающей PP_i в ортофосфат (схема 10).

Схема 10



В большинстве организмов гидролиз PP_i под действием $PPase$ является единственным путем его возврата в метаболизм (рис. 17), поскольку в них отсутствуют другие ферменты, использующие PP_i как субстрат. Растворимые $PPase$ делятся на два негомологичных семейства (I и II) с очень разными пространственными структурами. Семейство I представлено во всех живых объектах, семейство II обнаружено только у прокариот. За крайне редким исключением, $PPase$ семейства I — однодоменные белки (см. рис. 17,а) с гомодимерной (у эукариот) или гомогексамерной (у прокариот) структурой. Важная особенность семейства II — двухдоменная структура с активным центром, располагающимся между доменами (см. рис. 17,б).²¹⁹

Некоторые $PPase$ семейства II имеют в составе единого полипептида регуляторную часть, образованную двумя CBS-доменами и одним DRTGG-доменом (названия доменов взяты из базы данных PHAM). CBS-Домены, найденные и во многих других белках,^{220,221} прочно связывают адениновые нуклеотиды, причем АМР и АДФ ингибируют, а АТФ и диаденозинполифосфаты активируют пирофосфатазу.²²² Для активного центра $PPase$ семейства I цитозоля дрожжей и *E. coli* определены все стадии каталитического

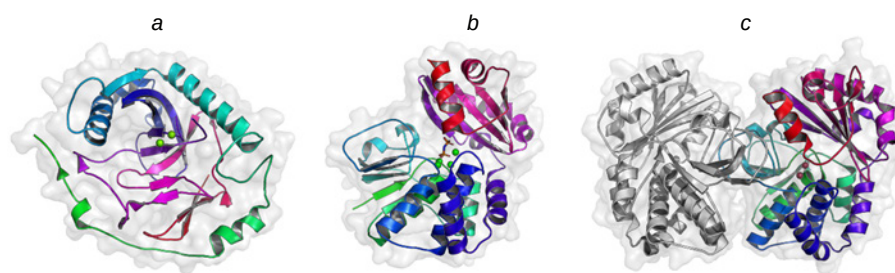


Рисунок 17. Структуры субъединицы $PPase$ семейств I человека (а) и II *Bacillus subtilis* (б), а также димерного фермента из *Staphylococcus aureus* (с). Структурные параметры взяты из базы данных RSCB PDB (коды 7BTN, 2HAW и 4RPA соответственно). Каталитически важные ионы Mg^{2+} и Mn^{2+} в активных центрах ферментов показаны в виде сфер.

цикла в обоих направлениях и установлены функции 13 аминокислотных остатков.²²³ Ключевую роль в катализе играют 3–4 иона Mg^{2+} , активирующие как субстрат, так и нуклеофильную молекулу воды путем понижения ее pK_a до ~ 7 .²²⁴

В ряде работ последних лет показано,^{225,226} что в раковых клетках активность PPase значительно увеличена. При некоторых заболеваниях, например хондрокальцинозе, желателен повысить активность PPase, чтобы уменьшить концентрацию PP_i и предотвратить кристаллизацию его кальциевой соли.²²⁷ Для этой цели разработаны способы доставки в ткани PPase, иммобилизованной на нанодиазлах,²²⁸ или в виде конъюгата с транспортным белком.²²⁹ Пирофосфатаза семейства I присутствует также в матриксе митохондрий, а мутации в ее гене *ppa2* приводят к серьезным дисфункциям митохондрий у дрожжей и вызывают летальные патологии у человека.²³⁰ Пирофосфатаза семейства II, имеющая нуклеотид-связывающие CBS-домены, представляет собой хорошую модель для выяснения механизма регуляции CBS-белков. Установлено, что для CBS-PPase характерен множественный положительный кооперативный эффект, который проявляется при катализе превращения субстрата в активных центрах (кинетическая кооперативность) и при связывании адениновых нуклеотидов с регуляторными центрами.²³¹

Еще одно семейство объединяет интегральные мембранные пирофосфатазы (mPPase; КФ 7.1.3.1), присутствующие в мембранах растений, некоторых прокариот и простейших. Они связывают гидролиз PP_i с транспортом ионов H^+ и Na^+ через мембрану.^{231,232} На основании транспортной специфичности в физиологических условиях семейство mPPase разделяют на H^+ -транспортирующие (H^+ -mPPase), Na^+ -транспортирующие (Na^+ -mPPase) и Na^+ , H^+ -транспортирующие (Na^+ , H^+ -mPPase).²³² Все известные K^+ -независимые mPPase переносят только H^+ , тогда как K^+ -зависимые — H^+ или H^+ и Na^+ . Все Na^+ -транспортирующие mPPase активны только в присутствии Na^+ .²³² Структурно эти фер-

менты не похожи ни на одно другое семейство белков и представляют собой интегральные α -спиральные белки, которые пронизывают мембрану насквозь и существуют в виде прочного гомодимера с молекулярной массой ~ 140 кДа^{233–235} (рис. 18). Каждая субъединица димера (см. рис. 18,а) образует необычную воронкообразную структуру с большой гидрофильной полостью в цитоплазматической части и гидрофильным каналом в мембранной части.

Полость представляет собой гидролитический центр и содержит много белковых лигандов для связывания пирофосфата и пяти ионов Mg^{2+} , а также два остатка Asp, которые удерживают нуклеофильную молекулу воды. Вертикальный ионный канал с «воротами» соединяет гидролитический центр с противоположной стороной мембраны. Структуры H^+ -mPPase и Na^+ -mPPase очень похожи,^{234,235} главное различие состоит в положении остатка Glu, который в Na^+ -mPPase создает центр связывания Na^+ в транспортном канале.^{235–237} Одним из главных достижений в изучении mPPase стало открытие механизма прямого сопряжения гидролиза и транспорта, а также определение роли димерной структуры в этом механизме.^{235,236,238,239} Фермент mPPase является первой «протонной помпой», работающей по принципу прямого сопряжения²⁴⁰ (см. рис. 18,б,с), и присутствует в ряде патогенных организмов: Na^+ , H^+ - и Na^+ -mPPase в бактериях (например, *Bacteroides fragilis* и *Clostridium tetani*), а H^+ -mPPase в простейших (например, *Plasmodium falciparum* и *Trypanosoma cruzi*). Для борьбы с такими микроорганизмами достаточно подавить активность mPPase, поэтому конструирование специфических ингибиторов данного фермента представляет собой актуальную задачу.

Аналоги пирофосфата эффективно ингибируют mPPase, но они токсичны, по этой причине более перспективны ингибиторы, действующие не на активный центр. Работы в данном направлении только начались. В 2021 г. были получены²⁴¹ производные изоксазола и пиразоло[1,5-а]пиримидина с константами ингибирования mPPase в микромоляр-

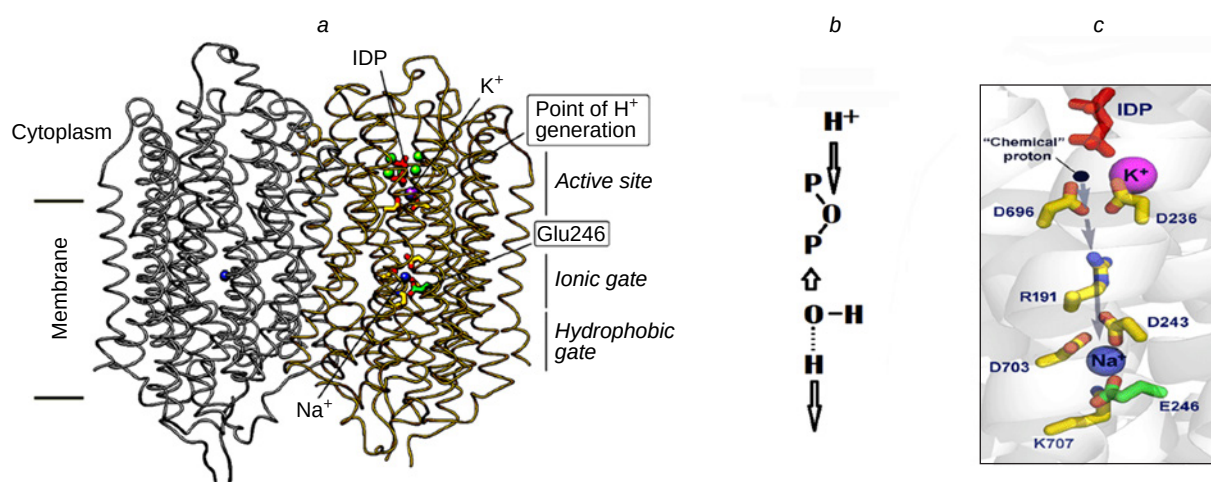


Рисунок 18. Структура mPPase и механизм транспорта катионов этим ферментом: димерная Na^+ -mPPаза *Thermotoga maritima* со связанной молекулой аналога пирофосфата (имидодифосфата) (показан красным цветом) и ионами металлов (Mg^{2+} обозначен зеленым цветом, K^+ — фиолетовым, Na^+ — синим) в правой субъединице (код PDB 6QXA), представлены два остатка Asp, координирующие нуклеофильную молекулу воды, и три остатка, образующие «ионные ворота» (а); схематичное изображение «прямого» сопряжения в транспорте протона — молекула воды атакует пирофосфат и отдает протон для прохождения через мембрану, а другой протон поглощается из цитозоля для протонирования уходящей группы (фосфата) (б); и «бильярдный» механизм транспорта катиона Na^+ (протон, образовавшийся из молекулы воды, выталкивает ион Na^+ в транспортный канал) (с). Рисунки а и с приведены из публикации²³⁶ в соответствии с лицензией Creative Commons CC BY.

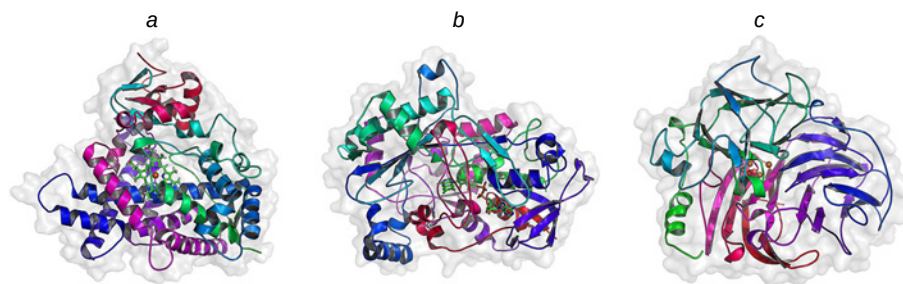


Рисунок 19. Структуры цитохрома P450 человека (a), FAD-зависимой оксидоредуктазы из *Pleurotus eryngii* (b) и лакказы из *Trametes versicolor* (c). Структурные параметры взяты из базы данных RSCB PDB (коды 6DWN, 5OC1 и 1KYA соответственно). Каталитически важные ионы Fe^{2+} , Fe^{3+} и Cu^{2+} в активных центрах ферментов показаны в виде сфер.

ном диапазоне, которые подавляли рост *Plasmodium falciparum*. Селективность таких ингибиторов обеспечивается тем, что в организме млекопитающих отсутствует собственная mPPase.

5.6. Ферменты в детоксикационном биокатализе

В настоящее время известно большое количество токсинов природного и синтетического происхождения, негативное воздействие которых на человека и животных может быть снижено за счет применения ферментов, катализирующих реакции детоксификации ядовитых веществ. Наиболее часто в таких процессах исследуют оксидоредуктазы, гидролазы и трансферазы^{121,125,130,242} (рис. 19). Реакции, катализируемые типичными оксидоредуктазами и приводящие к окислению токсинов (RH), представлены на схеме 11.^{121,125}

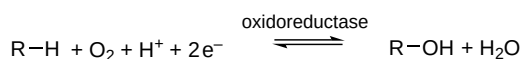


Схема 11

Реакции, протекающие при деструкции токсинов и катализируемые протеолитическими ферментами (рис. 20), могут включать расщепление амидной связи^{130,242,243} (схема 12).

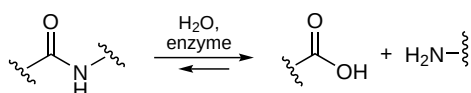


Схема 12

Известно, что по отношению к ферментам, применяемым для детоксификации, токсины могут выполнять функции субстратов или ингибиторов.^{121,122} Холинэстеразы (рис. 21) давно и активно исследуют в качестве ферментных антидотов, действие которых основано на их неспецифичном ингибировании различными токсичными веществами. Однако максимальный интерес представляют именно те ферменты, которые обеспечивают эффективный биокатализ, а не выполняют роль однократных «биоловешек». Типичная реакция, катализируемая холинэстеразами, приведена на схеме 13.

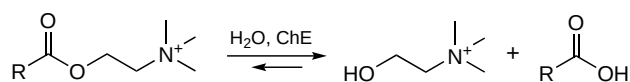


Схема 13

На сегодняшний день перечень токсинов, подвергающихся ферментативной детоксификации, довольно широк, и их химическая природа весьма разнообразна. Среди них следует упомянуть фосфорорганические отравляющие вещества (Vx, зоман, *O*-этил-*N*-[1-(диэтиламино)этилендифосфорамидофторидат],^{244,245} микотоксины (охратоксин A,²⁴³ стеригматоцистин,²⁴⁶ фумонизин,²⁴⁷ зеараленон²⁴⁸), токсичные прионы,²⁴² лекарственные препараты (доксорубицин,²⁴⁹ карбамазепин,²⁵⁰ парацетамол,²⁵¹ триклозан,²⁵² каннабигерол²⁵³), пестициды (метилпаратион,²⁵⁴ диурон,²⁵⁵ трансфлутрин²⁵⁶). Проведение детоксификации часто требуется *in situ* (для очистки водных источников, стоков, почв), а также *in vitro* (в производственных условиях при решении разных технологических задач по удалению токсинов из сельскохозяйственного сырья, кормов, воздуха и воды, применяемой для медицинских и пить-

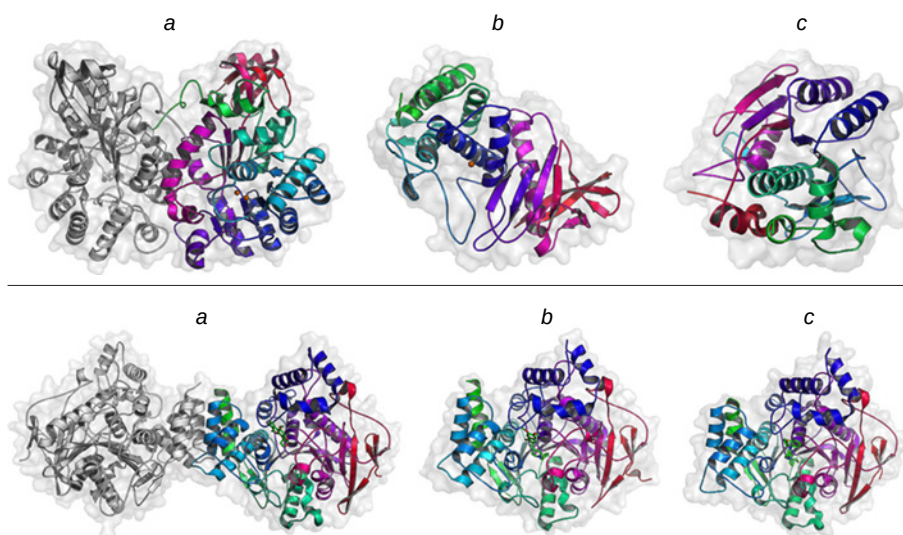


Рисунок 20. Структуры димерной охратоксиназы из *Aspergillus niger* (a) и мономеров — Zn-зависимой нейтральной протеазы из *Bacillus cereus* (b) и субтилиина из *Bacillus licheniformis* (c). Структурные параметры взяты из базы данных RSCB PDB (коды 4C5Y, 1NPC и 3UNX соответственно). Каталитически важные ионы Zn^{2+} в активных центрах ферментов показаны в виде сфер.

Рисунок 21. Структуры димера AChE из *Tetronarce californica* (a) и мономерных субъединиц AChE (b) и BChE человека (c). Структурные параметры взяты из базы данных RSCB PDB (коды 2XI4, 7E3H и 6EQP соответственно).

евых целей) и *in vivo* (в качестве антитов для человека и животных).

В зависимости от места и цели применения ферменты представлены в различных формах, в виде стабилизированных или иммобилизованных препаратов, причем в качестве носителей могут быть использованы различные материалы (тканевые, композитные, гелевые и др.).^{128,130,132,136,252,257} При выборе стабилизирующих агентов и носителей для ферментов значительную роль играют методы молекулярного моделирования. Они позволяют *in silico* оценить негативный или позитивный эффект от иммобилизации, природу взаимодействий белковых молекул с носителями и стабилизаторами, а также прогнозировать свойства образующихся биокатализаторов.^{129,130,136,252}

В последнее время в объектах окружающей среды часто выявляют частицы микропластиков,²⁵⁸ на которых адсорбированы различные токсины (лекарственные препараты, микотоксины, токсины микроводорослей, прионы и др.) совместно с другими гидрофобными поллютантами.^{242,257–259} Соответственно, требуются ферменты, способные одновременно катализировать комплексную деградацию самих токсинов и микропластиков, выполняющих роль носителей.²⁵⁸ При этом привлекают внимание системы, в которых используют сочетание активных и эффективных металл-содержащих химических катализаторов и биокатализаторов.^{130,133,248,258}

Особый интерес вызывают ферменты, способные к детоксификации не только близких по химическому строению соединений (например, разных фосфорорганических отравляющих веществ и пестицидов),^{121,130,260,261} но и смесей токсичных соединений, которые относятся к разным химическим классам (например, фосфорорганические соединения и микотоксины, анестетики и пестициды).^{126,129,136,244,250,253} Применение комплексных ФП, создаваемых для биокаталитической детоксификации различных соединений, в ряде случаев оказывается более успешным с точки зрения обеспечения глубины деструкции не только самих токсинов, но и продуктов их трансформации.^{244,256} Разработка и получение рекомбинантных форм ферментов,^{126,244,245,247,248,251,253,254,256} в том числе для введения в такие комплексы, является основой для формирования технологий, необходимых для масштабирования производства биокатализаторов и расширения областей практического применения ферментативных детоксификационных процессов.

Нейтрализация действия токсинов пептидной и белковой природы представляет собой особо важную задачу, поскольку именно такие яды (токсины животных, микроводорослей, бактерий, вирусов) широко распространены в природе.²⁴² Число токсичных соединений в этой химической группе увеличивается за счет рекомбинантных белков, которые активно создают для биомедицины, но такие белки могут содержать прионные аминокислотные последовательности и быть токсичными.²⁴² Подходы к детоксификации наркотиков с использованием ферментов, включая рационально сконструированные белки, и каталитических антител могут составить основу для перспективных разработок в этой области. Но пока на первом плане в таких исследованиях остаются рекомбинантные трансферазы и оксидоредуктазы человека.^{242,253}

5.7. Терапевтические ферментативные нанореакторы

Ферментативные нанореакторы (Е-пР) — компартменты с ферментами, в которых протекают одиночные или каскадные реакции биосинтеза и деградации субстратов,^{262–269} представляют собой первый шаг к созданию сложных архитектур (органелл, клеток и т.д.^{263,264}). Под нанореакторами обычно подразумевают роботизированные наноустройства и нанофабрики, выполняющие механические задачи и функции.²⁶⁵ Такие терапевтические наносистемы сконструированы для реализации процессов детоксификации эндогенных токсинов (например, активных форм кислорода (АФК) и мочевины) и экзогенных ядов (например, алкоголя), для коррекции генетических и метаболических дефектов, а в последнее время — для разложения ФОС в условиях *in vivo*. Терапия при оказании медицинской помощи в случае поражения ФОС все еще является несовершенной.²⁶⁶ Значительно улучшают состояние пациентов при отравлениях «биоловушки», разлагающие ФОС (рис. 22).^{267,268}

Альтернативной терапией является инкапсулирование «биоловушек» в наночастицы (НЧ, англ. nanoparticles (NP)).²⁶⁹ Инкапсулирование фермента в наноносители (липосомы, полимерные везикулы, силикатные НЧ, металл-органические каркасы и т.д.) обеспечивает повышение его стабильности и пролонгирования действия, а также способствует уклонению организма от иммунного ответа (рис. 23).

Декорирование оболочки нанореакторов обуславливает адресность доставки и преодоление биологических барьеров.

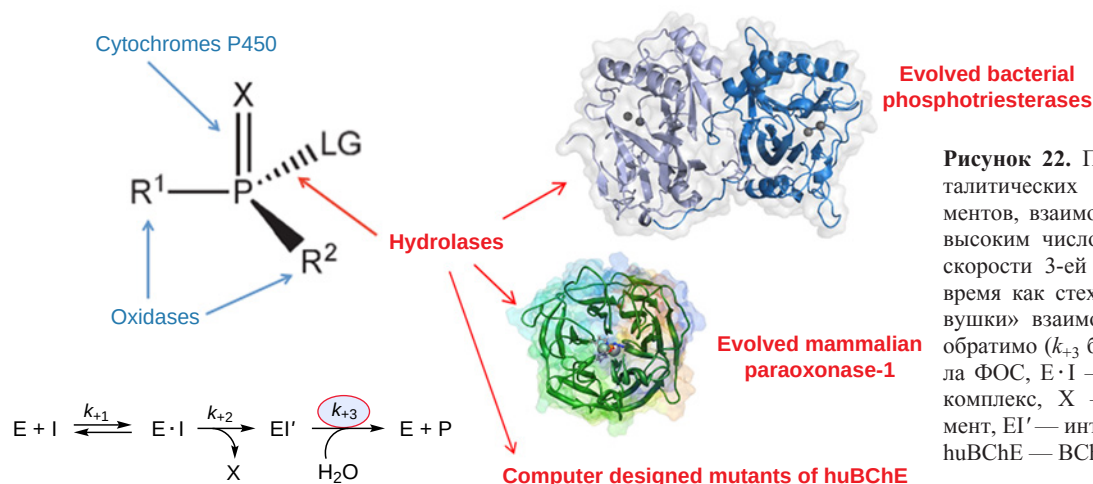


Рисунок 22. Принцип действия каталитических «биоловушек» — ферментов, взаимодействующих с ФОС с высоким числом оборотов (константа скорости 3-ей стадии (k_{+3}) $\gg 0$), в то время как стехиометрические «биоловушки» взаимодействуют с ФОС необратимо (k_{+3} близко к 0). I — молекула ФОС, $E \cdot I$ — фермент-субстратный комплекс, X — отщепляемый фрагмент, $E' \cdot I'$ — интермедиат, P — продукт, huBChE — BChE человека.

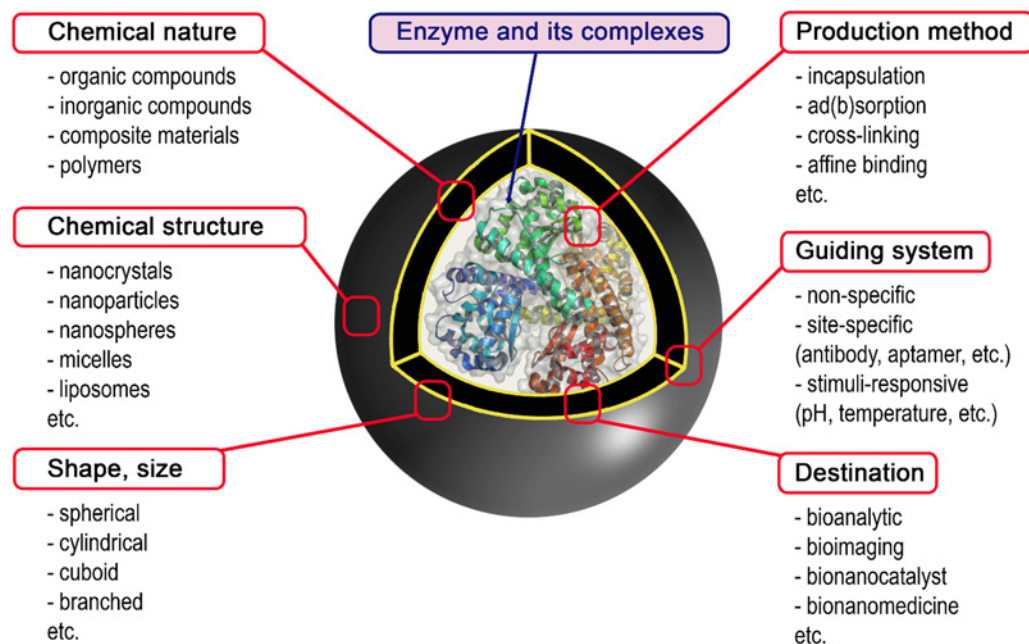


Рисунок 23. Современные комплексные подходы, используемые при разработке и создании инновационных ферментативных нанопрепаратов.

ров. Герметично упакованные E-nR — это стабильные биодоступные НЧ с размером ≤ 100 нм (хотя бы по одному из параметров), окруженные проницаемой для реагентов мембраной и содержащие один или несколько типов ферментов и кофакторов. Важной характеристикой E-nR является концентрация фермента ($[E]$) внутри нанореактора.²⁷⁰ Если молекулярная масса фермента составляет 340 кДа, то инкапсулируется до 300 молекул, что обеспечивает концентрацию ~ 0.001 М внутри E-nR. Теоретические положения по описанию E-nR еще не до конца сформулированы.²⁷¹

Для получения положительного эффекта от применения E-nR необходимы отбор природных или полученных с помощью генной инженерии ферментов с высокой активностью, а также оптимизация условий проведения быстрой и безопасной детоксификации ФОС в условиях *in vivo*.²⁷² Так, для создания E-nR использовали мутант фосфотриэстеразы, полученный путем направленной эволюции из гипертермофильных архей *Saccharolobus solfataricus*,²⁷³ который с высокой эффективностью разлагал диэтил-*n*-нитрофенилфосфат (параоксон, POX): $k_{cat}/K_M = 1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Эксперименты *in vivo* на мышинной модели отравления POX показали высокую результативность применения E-nR при профилактическом и пост-экспозиционном лечении. В то время как полудетальная доза (LD_{50}) при подкожном введении POX составляет $1.25 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$, его внутривенное введение в составе E-nR обеспечило увеличение этого показателя в 16 раз (в профилактических целях) и до 10 раз (при лечении). У выживших животных не проявилось нарушения нервно-мышечных и поведенческих функций. Нанореактор и неинкапсулированный фермент продемонстрировали одинаковые фармакокинетические характеристики — период полувыведения составлял 25 ± 2.2 и 22 ± 3.2 мин соответственно.

Изучение биораспределения POX в организме позволило предположить экспонирование фермента на поверхности E-nR.²⁷³ Анализ плазмы животных, отобранной через месяц после инъекции E-nR, выявил наличие антител к вводимому ферменту. Иммунная реакция не была ятрогенной. После второй инъекции E-nR, сделанной через месяц, авторы не наблюдали у животных выраженных патогенных призна-

ков, однако не исключали цитокинового ответа. Применение E-nR для детоксификации ФОС при терапевтических исследованиях с использованием мышинной модели отравления POX впервые продемонстрировало их эффективность и безопасность.²⁷³ Последующие этапы развития таких исследований связаны с оптимизацией нанореакторов для улучшения их стабильности, эффективности капсулирования, пролонгирования пребывания в кровотоке и предотвращения иммунного ответа.

5.8. Ферменты и наноматериалы в терапии и доставке лекарств

Для решения проблем доставки и пролонгирования действия как ферментов, так и низкомолекулярных соединений могут быть использованы неорганические НЧ, которые находят применение в качестве агентов для доставки действующего вещества^{274–276} в медицине, экологии и сельском хозяйстве (см. рис. 23).

Наночастицы золота (Au-NP) химически инертны и нетоксичны,²⁷⁷ они могут быть синтезированы с любым диаметром — от < 2 нм до 150 нм.²⁷⁸ Присоединение лигандов к Au-NP обычно происходит благодаря высокому сродству тиольных (сульфанильных) групп к этому металлу.²⁷⁷ В качестве лигандов для комплексов золота могут выступать флуоресцентные молекулы, подходящие для биовизуализации.²⁷⁹ Наночастицы золота используют в фототермической терапии рака, а также для доставки лекарств в организме.²⁸⁰

Наночастицы серебра (Ag-NP) сами обладают противоопухолевым действием и вносят непосредственный вклад в лечение при доставке соответствующих препаратов.²⁸¹ Однако синтез таких НЧ трудоемок, они токсичны, поэтому Ag-NP крайне ограничено используют для доставки лекарств. В сельском хозяйстве их применяют как носители для пестицидов и удобрений, а также в качестве антимикробных, противогрибковых и противовирусных средств.²⁸¹

Наночастицы кремнезема (SiO_2 -NP) химически стабильны, биосовместимы, нетоксичны и имеют большую удельную площадь поверхности.²⁸² Диаметр НЧ и размер их пор

можно регулировать, что позволяет внедрять в них разные молекулы. Синтез SiO_2 -NP обычно проводят в присутствии поверхностно-активных веществ (ПАВ), которые стабилизируют и определяют формирование структуры НЧ.^{282,283} Эти наночастицы можно использовать для доставки противораковых средств,²⁸⁴ в частности фермента Сге-рекомбиназы, который обеспечивает сайт-специфическую рекомбинацию генов,²⁸⁵ и антиглаукомных²⁸⁶ препаратов в ткани. Просты в синтезе, стабильны и биосовместимы TiO_2 -NP, которые могут обеспечить высвобождение включенных препаратов под воздействием УФ-излучения или ультразвука.²⁸⁷ Для визуализации опухолей и доставки в них лекарств используют также наночастицы ZnO .²⁸⁸ Однако TiO_2 -NP и ZnO -NP цитотоксичны, что ограничивает их широкое применение в медицинских целях.^{287,288}

Магнитные наночастицы Fe_2O_3 или Fe_3O_4 могут агрегировать, окисляться и проявлять токсичность по отношению к клеткам.²⁸⁹ Уменьшить токсичность и повысить коллоидную стабильность НЧ позволяет покрытие их поверхности полимерами.²⁹⁰ В этом плане являются универсальными НЧ фосфата кальция (СаР-NP), которые могут быть использованы как носители высоко- и низкомолекулярных соединений за счет взаимодействия ионов Ca^{2+} с присутствующими в молекулах функциональными группами, например с фосфатными группами ДНК или РНК (см.²⁹¹) или с карбоксильными группами кислот.^{292–294} Такая особенность СаР-NP делает их биосовместимыми и биоразлагаемыми носителями, перспективными для использования в медицине.²⁹⁵ Наночастицы СаР получают осаждением из растворов при смешении солей кальция и фосфат-иона.^{292–294}

Сегодня СаР-NP исследуют в качестве подложек для офтальмологических лекарств при местном применении.^{292–294,296–298} Внедрение антиглаукомного бета-адреноблокатора тимолола и ингибитора ангиотензинпревращающего фермента (ACE) лизиноприла, понижающих внутриглазное давление (ВГД), в НЧ фосфата кальция усилило эффект лекарственных веществ у лабораторных животных по сравнению с их водными растворами.²⁹⁸ Содержащие антиоксидантный фермент супероксиддисмутазу 1 (SOD1) (рис. 24) СаР-NP продемонстрировали более высокую эффективность подавления воспаления в глазу при иммуногенном увеите у кроликов, чем водный раствор SOD1.²⁹⁷

Еще более значимые эффекты наблюдали при использовании СаР-NP, покрытых хитозаном, который обладает сродством к мушину на поверхности глаза.^{292,293,296} Включение эналаприлата (ингибитора ACE) в такие НЧ обеспечивало его медленное высвобождение из частиц,²⁹³ увеличивая время удерживания препарата в слезной жидкости кроликов после однократного капельного введения,^{292,293} а также значительно усиливало и продлеvalo эффект сниже-

ния ВГД по сравнению с препаратом в составе НЧ без покрытия хитозаном.²⁹³

В СаР-NP можно одновременно включать препараты различного действия. Так, совместное включение эналаприлата (молекулярная масса 348 Да) и SOD1 (32.5 кДа) в НЧ с хитозановым покрытием дало *in vivo* синергический эффект: снижение ВГД у кроликов через 1 ч после однократной инстилляцией было значительно сильнее, чем сумма данных показателей, полученных при использовании каждого из препаратов в составе НЧ по отдельности. Этот эффект обеспечивался различными физиологическими механизмами действия SOD1 и эналаприлата.²⁹² Сравнение физиологического действия эналаприлата в составе СаР-NP, хитозановых НЧ и наночастиц СаР, покрытых хитозаном, на ВГД выявило значительное преимущество сочетания неорганического ядра с хитозановым покрытием.²⁹⁹ Такие частицы наиболее эффективно включали активное вещество и снижали ВГД. Кроме того, следует упомянуть частицы карбоната кальция (CaCO_3), которые, строго говоря, являются микрочастицами, но также могут выступать в роли носителей активных веществ, в том числе противораковых средств,³⁰⁰ а также ферментов, например SOD1 (см.³⁰¹) и химотрипсина.³⁰² Следовательно, неорганические НЧ являются перспективными носителями как низкомолекулярных активных соединений, так и белков.

К созданию стабильных лекарственных препаратов на основе ферментов с дополнительной возможностью регуляции активности приводит их конъюгация со стимул-чувствительными полимерами.²⁷⁰ Начало этому направлению положило изучение свойств ферментов, включенных в полиэлектролитные комплексы путем присоединения к поликатиону или полианиону. Такой подход позволяет создать препарат на основе иммобилизованного фермента, количественный переход которого из раствора в осадок легко регулировать незначительным изменением свойств окружающей среды (рН или ионной силы раствора). Это обеспечивает регуляцию доступности субстрата и связанных с ним изменений активности ферментов в живых системах, содержащих природные полиэлектролиты (ДНК, РНК, полисахариды, белки), в условиях макромолекулярного краудинга.³⁰³ Например, были созданы препараты иммобилизованных ферментов, преимуществом которых является возможность проведения реакций в гомогенных условиях в присутствии растворенного биокатализатора с последующим его осаждением и отделением после завершения процесса. Это важно при биокаталитическом превращении высокомолекулярных и плохо растворимых субстратов.³⁰⁴ Такие стимул-чувствительные конъюгаты ферментов с полимерами, названные «умными» (smart) биокатализаторами,³⁰⁵ можно использовать при доставке лекарственных препаратов в организме.³⁰⁶

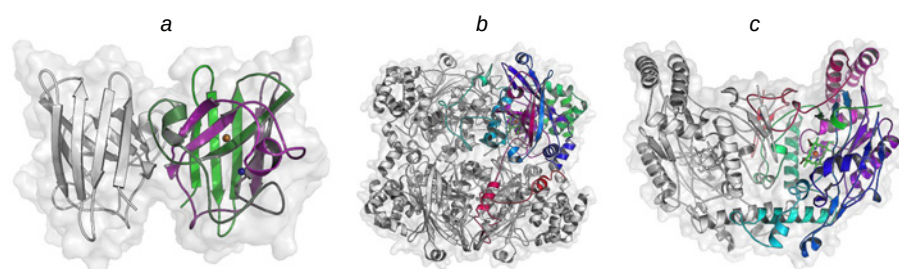
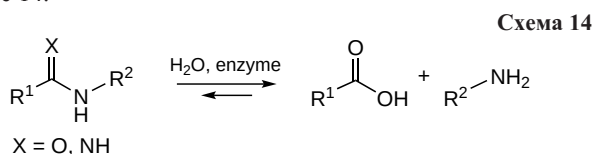


Рисунок 24. Структуры димерной Cu/Zn-зависимой SOD1 (a), тетрамерной каталазы (b) и димерной синтазы оксида азота человека (c). Структурные параметры взяты из базы данных RSCB PDB (коды 8Q6M, 8HID и 4NOS соответственно). Каталитически важные ионы Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} и Cu^{2+} в активных центрах ферментов показаны в виде сфер.

5.9. Ферменты — противоопухолевые препараты

Терапевтическое применение противоопухолевых ФП, катализирующих деpleцию определенных незаменимых аминокислот, основано на снижении активности соответствующих синтетаз аминокислот в некоторых опухолевых клетках. К представителям ферментов этой группы относятся *L*-аспарагиназы (*L*-ASP), *L*-лизин-альфа-оксидазы, метиониназы, аргининдезаминазы и др. *L*-Аспарагиназы из *E. coli* (EcA) и *Erwinia chrysanthemi* (ErA) используют в стандартной терапии острого лимфобластного лейкоза, лимфогранулематоза, множественной миеломы (рис. 25). Реакция гидролиза, катализируемая действующими на аминокислоты ферментами, в общем виде представлена на схеме 14.



Биохимический механизм противоопухолевого действия *L*-ASP заключается в снижении концентрации *L*-аспарагина, который необходим для синтеза белков и азотистых оснований для НК.^{307,308} Быстрорастущие опухолевые клетки испытывают дефицит во внутриклеточном *L*-аспарагине и в значительно большей степени, чем нормальные ткани, зависят от поступления экзогенного *L*-аспарагина. Введение *L*-ASP вызывает истощение запасов внеклеточного *L*-аспарагина, остановку клеточного цикла и последующую гибель клеток. Важным аспектом противоопухолевых свойств *L*-ASP также является рецептор-опосредованное воздействие данного фермента на опухолевые клетки.³⁰⁹

Основная проблема применения *L*-ASP в онкогематологии состоит в том, что ФП демонстрируют недостаточную активность, что приводит к применению высоких дозировок и развитию побочных эффектов. Главный фактор, ограничивающий использование *L*-ASP, — гиперчувствительность, которая, по разным данным, развивается в ответ на внутривенное введение бактериального фермента у 20–45% пациентов. Очевидно, для проведения энзимотерапии лейкозов целесообразно располагать набором *L*-ASP, отличающихся по антигенным свойствам. Это определяет актуальность разработки новых *L*-ASP-препаратов из альтернативных источников, а также способствует повышению терапевтической эффективности уже применяемых в медицинской практике ферментов.

Нами исследована серия *L*-ASP, продуцируемых различными штаммами, включая нативные и мутантные формы.^{310–314} Выяснилось, что каталитическая активность ряда *L*-ASP, измеренная по аспарагину, далеко не всегда коррелирует с их цитостатической активностью на культурах

опухолевых клеток. Для многих *L*-ASP наблюдаются кратные отклонения от «ожидаемых» результатов в большую и меньшую стороны. Отсутствие явных закономерностей в отклонениях по цитостатической активности *L*-ASP на разных клеточных линиях указывает на многофакторность механизма их цитостатического действия. Одной из причин антипролиферативной активности этого фермента оказался рецепторный эндоцитоз в случае чувствительных к *L*-ASP опухолей. Интернализация фермента внутри таких клеток приводит к нарушению синтеза белков даже в условиях избытка экзогенного аспарагина.³⁰⁸

Особый интерес представляет *L*-ASP из *Rhodospirillum rubrum* (RrA),^{307–309} которая имеет низкую гомологию с EcA и ErA, что позволило бы применять эти ферменты последовательно одним и тем же больным при развитии иммунотоксичности. Фермент RrA при сравнительно низкой каталитической активности по аспарагиновому субстрату и «неоптимальному» значению pH-оптимума (9.2) показывает высокий уровень цитостатической активности на ряде клеточных линий *in vitro*, а также в экспериментах *in vivo*.^{307,308} Последнее свойство обусловлено тем, что RrA способна проникать в раковые клетки и, следовательно, расщепляет аспарагин не только в системном кровотоке, но и внутри опухоли. Действие *L*-ASP внутри раковых клеток представляется перспективным фактором, который требует дальнейших исследований.

Помимо установления альтернативных механизмов действия *L*-ASP, важным аспектом реализации их терапевтического потенциала является разработка подходов к повышению терапевтической эффективности и снижению иммуногенности уже применяемых в медицинской практике ферментов. Наиболее распространенным подходом к блокированию иммуногенности и увеличению времени клиренса из организма является ПЭГилирование препаратов (ПЭГ — полиэтиленгликоль).^{307,315} Так, ПЭГилирование EcA увеличивает продолжительность ее циркуляции в кровотоке от 1.5 до 6 сут. Например, препарат «Онкаспар» на основе ПЭГилированной *L*-ASP применяют для лечения лейкозов при гиперчувствительности к этому ферменту.

В последние годы был предложен новый эффективный подход к регуляции биокаталитических свойств и стабильности *L*-ASP, используемых в медицинской практике, на примере рекомбинантных препаратов EwA (из *Erwinia chrysanthemi*) и RrA (см. рис. 25).^{311–318} Он заключается в образовании конъюгатов *L*-ASP с привитыми сополимерами разветвленной структуры на основе поликатионов различного состава и разной молекулярной архитектуры. Полиэлектrolитные свойства полимеров способствуют их многоточечному электростатическому взаимодействию с поверхностью белка, что позволяет модулировать каталитические свойства *L*-ASP, в том числе за счет сдвига pH-оптимума активности фермента в область физиологических значений.^{317,318} Оптимизация молекулярной архитектуры и

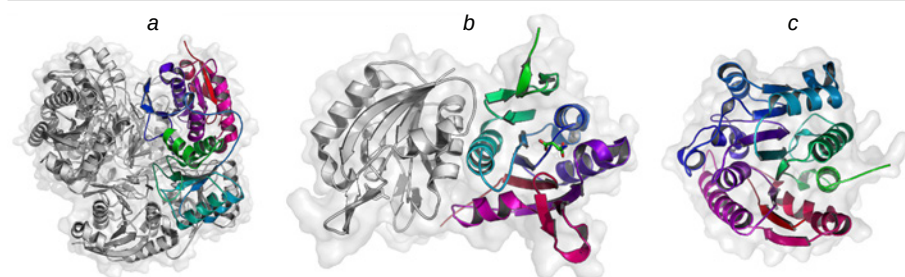


Рисунок 25. Структуры тетрамерной *L*-ASP из *Erwinia chrysanthemi* (EwA) (a), димерной *L*-ASP из *Rhodospirillum rubrum* (RrA) (b) и мономерной субъединицы аргиназы из *Bacillus thuringiensis* (c). Структурные параметры взяты из базы данных RSCB PDB (коды 5HW0, 8UOU и 6NBK соответственно).

состава конъюгатов позволяет достичь увеличения каталитической эффективности действия *L*-ASP в требуемых условиях до 5 раз. Предложенный метод позволил повысить каталитическую активность, термостабильность и стабильность к трипсинолизу ферментов EwA и RrA.^{311–314} В экспериментах *in vitro* конъюгаты EwA и RrA проявили в 10 раз более высокую противоопухолевую активность в сравнении с нативными аналогами в отношении клеток хронического миелоидного лейкоза (K-562) и аденокарциномы молочной железы (MCF7).³¹⁵ На основе разработанной технологии — формирования конъюгатов с биodeградируемыми сополимерами — обеспечивается повышение цитостатической активности ФП на культурах как лейкозных, так и солидных опухолей. Этот факт обуславливает перспективность применения ферментов в отношении солидных опухолей, в терапии которых *L*-ASP до сих пор были неэффективны.

5.10. Наноконтейнеры для доставки белков и нуклеиновых кислот

Инкапсуляция терапевтических агентов в наноконтейнеры различной структуры является эффективным методом создания новых лекарственных форм. Наиболее перспективными материалами для наноконтейнеров считаются полимеры (полимерные мицеллы, интерполиэлектrolитные комплексы), а также синтетические и природные липиды (липосомы, липидные наночастицы, внеклеточные везикулы или экзосомы) благодаря удобной функционализации структур на их основе.

В настоящее время, несмотря на успехи в понимании особенностей функционирования и регуляции ферментов, остаются нерешенными проблемы их использования в качестве лекарственных препаратов.³¹⁹ Причины кроются как в низкой стабильности самих ферментов, так и в часто возникающих побочных эффектах, включая аллергенность, иммуногенность и др. Для доставки высокомолекулярных лекарств (биополимеров), белков (ферментов) и НК разработаны различные технологии,³²⁰ в том числе включение активных молекул в наноконтейнеры (например, липосомы или полиэлектrolитные капсулы), микрогетерогенные системы^{321–323} и наноразмерные агрегаты из липидов и(или) ПАВ³²⁴ (см. рис. 23).

В современных подходах к созданию наноструктур для регуляции и доставки ферментов и НК наиболее активно развиваются следующие направления:

- применение стабилизированных наноэнзимов (НЧ белка и полиэлектrolитов);
- управление биокаталитическими процессами с помощью внешних факторов (например, низкочастотного переменного магнитного поля);

— использование собственных клеток организма и внеклеточных везикул в качестве систем доставки биополимеров.

Включение в наноконтейнеры на основе интерполиэлектrolитных комплексов оказалось удобным и универсальным решением как для разных белков и ферментов (так называемые «наноэнзимы»), так и для НК («полиплексы»). В этих системах ферменты сохраняют каталитическую активность, при их использовании улучшается проникновение ФП в клетки, повышается стабильность биомолекул в организме, а также увеличивается время его циркуляции в крови и снижается иммунный ответ.³²⁵

Распространение антибиотикоустойчивых патогенных микроорганизмов ставит задачи по производству новых антибиотиков и по разработке альтернативных фармакологических стратегий.^{326,327} На передний план выходят ферменты бактериальных вирусов (бактериофагов), отвечающие за разрушение пептидогликана и полисахаридов клеточных стенок и защитных капсул бактерий. С целью создания стабильных и эффективных средств борьбы с бактериальными инфекциями изучены^{327,328} особенности лизиса патогенов для ряда ферментов бактериофагов (PlyC, LysK, SPZ7, Lys394 и др.) (рис. 26). Получены стабилизирующие композиции этих ферментов с неионогенными ПАВ и полиэлектrolитами, в которых достигнуто 100%-ное сохранение активности против соответствующего патогена в течение нескольких месяцев.

Важным процессом представляется эффективный лизис клеток грамотрицательных бактерий, имеющих внешнюю мембрану.^{327,329} Для «разупорядочения» внешней мембраны и обеспечения доступа эндолизину Lys394 фага S-394 («антисальмонелльного фермента») к пептидогликану использовали низкочастотное магнитное поле.^{329–331} Такой магнитомеханический подход к дистанционному управлению биопроцессами существенно усиливает эффективность действия фермента.

Избыточное продуцирование в организме активных форм кислорода (АФК) при травме спинного мозга приводят к развитию воспаления, сопутствующей компрессии поврежденного спинного мозга и гибели нейронов.³³² На основе SOD1 и каталазы (см. рис. 24) в составе полимерных НЧ, обладающих выраженным противовоспалительным действием, были разработаны наноформуляции, которые оказались эффективными для лечения травматических поражений спинного мозга.³³³ Доставка SOD1 в виде нанопрепарата к месту повреждения существенно смягчила окислительный стресс в поврежденных тканях, продлила циркуляцию активного фермента в кровотоке и улучшила восстановление локомоторных функций и нервной ткани у крыс наряду с уменьшением воспаления и отека из-за компрессии спинного мозга.

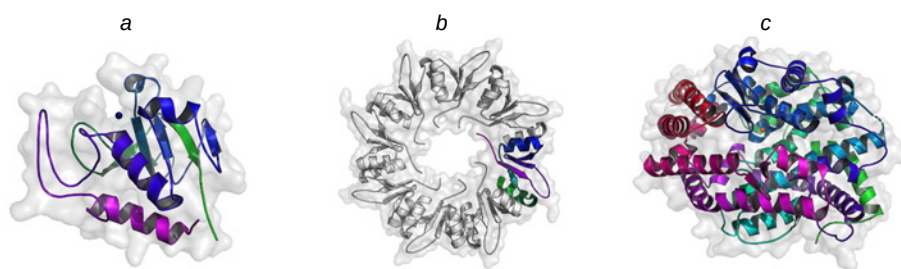


Рисунок 26. Структуры эндолизина LysK стафилококкового бактериофага K (a), октамерного лизина PlyC стрептококкового бактериофага C1 (b) и ангиотензинпревращающего фермента человека (c). Структурные параметры взяты из базы данных RSCB PDB (коды 4CSH, 4F87 и 1O86 соответственно). Каталитически важные ионы Zn^{2+} в активных центрах ферментов показаны в виде сфер.

Воспалительные заболевания глаз остаются наиболее распространенной клинической проблемой в офтальмологии, приводящей к дегенерации тканей, нечеткости зрения и даже к слепоте.³³⁴ Разработанная для лечения глаз композиция на основе многослойных полиионных НЧ, содержащих SOD1, была стабильна при хранении, имела выраженный терапевтический эффект без побочных реакций в виде раздражения глаз, острой, хронической и репродуктивной токсичности, аллергенности, иммуногенности и мутагенности даже при их использовании в больших дозах.³³⁵ Доклинические исследования показали, что инстилляции таких НЧ в глаз кролика с модельным иммуногенным увеитом были значительно эффективнее, чем применение свободного фермента, и уменьшали воспаление как во внешних, так и во внутренних структурах глаза.³³⁵

Сложной, но актуальной задачей является разработка эффективных антиоксидантных препаратов со способностью проникать через гематоэнцефалический барьер. Их действие поможет значительно снизить количество АФК в головном мозге, ослабит нейровоспаление и обеспечить нейропротекцию у пациентов с расстройствами центральной нервной системы. Многие заболевания (рассеянный склероз, последствия инсульта, болезни Паркинсона (БП) и Альцгеймера) имеют общий воспалительный компонент, включающий нейродегенерацию и последующую активацию микроглии, которая сопровождается избыточной продукцией АФК.³³⁶ Терапевтическая эффективность нагруженных стабилизированным ферментом макрофагов, выделенных из моноцитов костного мозга, которые обладают способностью накапливаться в воспаленных тканях, была подтверждена двукратным снижением микроглиоза, измеренным по экспрессии интегрина альфа-М (CD11b).³³⁷ При этом макрофаги оставались в зоне воспаления длительное время.

В последние годы адресная клеточно-опосредованная доставка антиоксидантных ферментов представляется важным элементом в разработке подходов к лечению БП. Для этого могут быть использованы генетически модифицированные клетки-носители, трансфицированные плазмидной ДНК (англ. pDNA), которая кодирует синтез терапевтического белка.³³⁸ На модели БП были показаны устойчивая экспрессия каталазы и последующие заметные эффекты — противовоспалительный и нейропротекторный. Было обнаружено, что трансфицированные макрофаги при системном введении выделяют экзосомы (внеклеточные везикулы) с включенными в них ДНК, мРНК, молекулами транскрипционных факторов и кодируемым белком.³³⁸ Экзосомы, секретируемые различными клетками, состоят из липидных бислоев с обилием адгезивных белков и обладают способностью преодолевать биологические барьеры.³³⁹ Разработан ряд наноформуляций на основе SOD1 и каталазы, загруженных во внеклеточные везикулы *ex vivo*. Такие ФП обладают выраженным противовоспалительным действием и пригодны для лечения БП.³⁴⁰ Показано, что экзосомные препараты ферментов обеспечивают значительный нейропротекторный эффект на моделях этого заболевания *in vitro* и *in vivo*.³⁴⁰

Следовательно, технология инкапсуляции ферментов и НК в наноконтейнеры на основе интерполиэлектrolитных комплексов и экзосом обладает значительным потенциалом для создания новых терапевтических средств. Одним из ключевых преимуществ полимерных композитов является их настраиваемая биodeградация, позволяющая контролировать длительность действия лекарственных препаратов.

Интеграция в структуру наноконтейнеров функциональных фрагментов, таких как векторы или магнитные наночастицы, открывает путь к получению многофункциональных носителей, которые могут не только контролируемо доставлять лекарственные средства, но и реагировать на биомаркеры заболеваний и использоваться в качестве диагностических средств (тераностика).

Таким образом, рассмотренные в данном разделе системы являются перспективной основой для создания средств персонализированной медицины.

6. Ферменты в анализе и диагностике

Ферменты чаще используют для аналитических целей, чем для определения их активности в биологических образцах. При определении параметров биологической системы, характеризующих ее состояние, ферменты выступают как молекулярные узнающие элементы для диагностики и(или) как компоненты модулей, усиливающих аналитический сигнал. Эти две функции могут быть скомбинированы и изменены искусственными эффекторами (например, аптамерами) или объединены с физико-химическими методами усиления сигнала (например, с помощью гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) и биоэлектрокатализа), а также реализованы в параллельном формате (например, в биочипах).

6.1. Аптамеры в диагностике и терапии

В постгеномную эру ДНК-оперирующие ферменты (биокатализаторы синтеза, репарации, рестрикции/модификации НК и т.д.) активно используют в диагностических системах при определении последовательностей НК. Понимание НК-белковых взаимодействий дает преимущество при разработке таких систем. Новый импульс исследованиям в этом направлении придала технология искусственного отбора НК-лигандов, названных аптамерами, к мишеням различной природы методом систематической эволюции путем экспоненциального обогащения (SELEX).

Аптамеры, аналогично белкам, служат в качестве направляющих молекул в системах доставки³⁴¹ и терапевтических агентов,³⁴² как исследовательский инструмент при разработке новых терапевтических средств,³⁴³ в качестве ингибиторов ферментов (например, термостабильных ДНК-полимераз, действие которых нужно синхронизировать при амплификации аналита) или инактивирующих лигандов (например, токсинов).^{344,345} Блокирование токсичных соединений аптамерами используют в целях обеспечения пищевой безопасности.³⁴⁶

Известны методы распознавания антибиотиков с помощью аптамеров, когда последние выступают как узнающие элементы в ферментативных системах аналогично антителам.^{347–349} Предполагают, что быстрое замещение аптамерами реальных антител возможно благодаря ряду свойств аптамеров:

- способности распознавать низкомолекулярные соединения (например, наркотики),³⁵⁰
- применению направленного SELEX к ним и мишеням различной природы,
- получению путем химических (а не биотехнологических) превращений,
- четкому узнаванию мишени,
- малому по сравнению с антителами размеру,
- относительной стабильности.³⁵¹

Объединение нескольких «узнающих» модулей в последовательность одного аптамера привели к расширению области их использования в биосенсорике путем сочетания с биолюминесцентной детекцией,³⁵² а дополнительные модификации аптамеров позволили визуализировать их методом АСМ³⁵³ и с помощью колориметрического обнаружения.³⁵⁴ Отдельно можно выделить применение аптамеров для выявления и инактивации уникальных мишеней (неструктурированных прионоподобных белков^{355,356}) и для дедифференцировочной терапии опухолей мозга.³⁵⁷

Экспериментальное сравнение апта- и иммуносенсоров при определении одного и того же аналита в аналогичных условиях осуществляют довольно редко из-за множественности и вариативности параметров сравнения. Эффективность аптасенсоров с точки зрения селективности и чувствительности проиллюстрирована на примере системы обнаружения тромбина,³⁵⁸ хотя общие выводы о ее преимуществах вызывают сомнения.

Аптамеры могут быть использованы в качестве альтернативы традиционным противомикробным средствам.³⁵⁹ Создание аптамеров является перспективной стратегией борьбы с резистентностью к антибиотикам. Бактериостатические аптамеры могут блокировать действие бактериальных токсинов, ингибировать образование биопленок,³⁶⁰ предотвращать бактериальную инвазию иммунных клеток и стимулировать ответ иммунной системы. Перечисленные функции не требуют проникновения аптамеров внутрь бактериальной клетки. Это снимает ограничения по безопасности и эффективности направленных систем доставки НК внутрь бактериальной клетки. Для функционирования аптамеров, взаимодействующих с металлолактамазами³⁶¹ и показавших аллостерический эффект ингибирования этих ферментов,³⁶² требуется их проникновение в клетку. Применение аптамеров против патогенов обсуждается давно,³⁶³ но такие препараты пока не дошли до клиники. В настоящее время реализуются лишь методы моделирования аптамеров *in silico*³⁶⁴ и расчетные квантово-химические методы дизайна их библиотек.³⁶⁵ Объединение современных экспериментальных методов отбора и анализа выбранных нуклеотидных последовательностей методами секвенирования 2-го и 3-го поколений, физико-химическая характеристика свойств аптамеров с возможностями *in silico* моделирования комплексов НК–мишень позволяют ускорить процесс получения аптамеров с необходимыми свойствами. Так, аптамеры на поверхностный белок вируса SARS-CoV2 получены в течение года после возникновения заболевания.^{366,367} В работах^{368,369} обобщены результаты ПТМ этого белка-мишени на эффективность узнавания его аптамерами.

Таким образом, исследования в области получения и изучения свойств аптамеров в биокатализе можно рассматривать как подготовку к борьбе со следующей пандемией. Данные направления определяют необходимость развития методов синтеза и анализа НК, их скрининга и вычислительных инструментов, адаптированных для анализа комплексов НК–мишень, а также выявления новых мишеней.

6.2. Технология биочипов с ферментативной детекцией для мультианализа

Ферменты находят широкое применение в качестве детектирующих систем в различных биоаналитических методах, наиболее часто используют для этих целей пероксидазу хрена и щелочную фосфатазу.³⁷⁰ К преимуществам ферментов относятся, в частности, доступность и разнообразие

способов регистрации их активности: колориметрического, хемилюминесцентного и электрохимического.

Новой областью применения ферментов в медицинской диагностике, которая интенсивно развивается в последние годы, является детекция результатов мультианализа генов на биочипах. Биочипы представляют собой носитель небольшой площади, на котором иммобилизованы синтетические одноцепочечные олигонуклеотидные зонды. В качестве носителей используют различные материалы, чаще всего — предметные стекла и полимерные носители.³⁷¹

Главная особенность технологии биочипов — их высокая мультиплексность, которая оказалась востребованной при создании молекулярных методов обнаружения генов устойчивости патогенных бактерий к антибиотикам. В связи со стремительным распространением антибиотикорезистентных бактерий и разнообразием механизмов резистентности^{372,373} крайне актуальной стала задача разработки быстрых и высокочувствительных методов одновременного обнаружения различных генов устойчивости и их полиморфизма.³⁷⁴ Первым примером использования для этой цели технологии мультианализа генов были биочипы с флуоресцентной детекцией генотипирования (определения совокупности всех однонуклеотидных полиморфизмов) наиболее клинически значимых BL класса А, обуславливающих устойчивость грамотрицательных бактерий к пенициллинам и цефалоспорином.³⁷⁵

Развитием методологии применения биочипов для решения задач лабораторной диагностики антибиотикоустойчивых бактерий стала разработка биочипов низкой плотности (включающих от 10 до 100 олигонуклеотидных зондов). В качестве примера можно привести 3D-микрочипы, основанные на иммобилизации зондов в микрокаплях геля, которые были предназначены для идентификации генов антибиотикоустойчивости микобактерий туберкулеза и ключевых однонуклеотидных полиморфизмов *Neisseria gonorrhoeae*.³⁷⁶ Созданы альтернативные флуоресцентные метки для ДНК-мишеней, наиболее популярной из которых стал биотин. Биотин вводят в исследуемую ДНК и затем выявляют в зонах биочипа с помощью конъюгатов стрептавидина с ферментами (пероксидазой хрена или щелочной фосфатазой^{377,378}). Среди методов регистрации активности ферментов (колориметрического, хемилюминесцентного и электрохимического)^{377,378} наиболее часто используют колориметрическую детекцию, основанную на применении хромогенных субстратов, при ферментативном превращении которых образуются нерастворимые окрашенные продукты. Регистрацию результатов анализа проводят с помощью оптических сканеров высокого разрешения или фотокамер, что существенно упрощает внедрение метода в клиническую практику.

Разработана технология изготовления биочипов на пористых мембранных носителях с колориметрической детекцией на основе пероксидазы хрена для определения генов 11 типов клинически значимых BL и карбапенемаз разных классов у грамотрицательных бактерий.³⁷⁹ Определение основано на прямой схеме гибридизационного анализа с использованием одного специфичного зонда для каждого исследуемого гена. На биочипе одновременно с типом фермента идентифицируются 24 однонуклеотидных полиморфизма, которые кодируют ключевые замены аминокислотных остатков, изменяющих субстратную специфичность BL класса А. Общее время анализа после выделения ДНК из бактериальных клеток составляет ~4 ч. Показана высокая специфичность идентификации смесей генов, кодирующих

разные BL, что важно для выявления мультирезистентных бактерий.

Компанией Check-Points предложены колориметрические биочипы с ферментативной детекцией, изготовленные из пористого мембранного носителя и размещенные в нижней части микропробирок. На первой стадии анализа методом лигирования получают комплексы ДНК–мишень с двумя праймерами, которые затем амплифицируются в ПЦР с использованием одного из праймеров, меченного биотином. Разработаны различные варианты биочипов, в том числе для определения генов устойчивости к метицилину *Staphylococcus aureus* и генов BL семейства *Enterobacteriaceae*.^{380,381} К преимуществам данной технологии относятся высокая специфичность определения одонуклеотидного полиморфизма и высокая чувствительность определения ДНК, позволяющая проводить анализ клинического образца без дополнительного культивирования клеток. Эта технология имеет высокий потенциал автоматизации, что важно для практического использования.

Одним из направлений развития технологии биочипов стало объединение нескольких биочипов на одном держателе, что позволяет упростить проведение стадий инкубации, отмывки и детекции. Разработаны биочипы в 8-луночных стрипах (AtrayStrips) для определения 14 типов генов карбапенемаз и 7 типов генов BL.³⁸²

Перспективными являются биочипы, помещенные в 96-луночные планшеты. Авторами работы³⁸³ представлен биочип, который размещен в двух лунках такого планшета и предназначен для идентификации 11 типов клинически значимых BL и карбапенемаз, а также 16 одонуклеотидных полиморфизмов. Размещение биочипов в планшетах позволяет существенно увеличить число параллельно анализируемых образцов, увеличить точность и воспроизводимость результатов, сократив общее время анализа.

Принципиальным шагом при размещении биочипов в лунках планшетов является возможность использования их для количественного анализа НК. Такая задача возникла в связи с распространением бактерий с множественной лекарственной устойчивостью и гетерорезистентностью. Для изучения данных бактерий и распознавания различных уровней экспрессии в них генов необходимо определять изменение концентраций специфичных мРНК в РНК-транскриптах бактерий в широком диапазоне. В 2022 г. был разработан метод количественного определения мРНК β-лактамазы TEM-типа на колориметрических биочипах в лунках.³⁸⁴ Впервые в молекулярно-генетическом анализе принцип количественного определения был основан на использовании стандартного образца мРНК BL, полученного методом транскрипции *in vitro*. Преимуществом такого образца мРНК, соответствующего полноразмерному исследуемому гену, является прохождение им всех стадий анализа параллельно с исследуемыми образцами с одинаковой эффективностью. Определение концентрации мРНК в образце проводят с помощью калибровочной зависимости, построенной на основании тестирования стандартных образцов мРНК того же гена.

Таким образом, биочипы в лунках планшетов характеризуются высокой производительностью и точностью, имеют перспективу использования в клинических лабораториях. Принципиальным преимуществом данной технологии является параллельный анализ нескольких десятков образцов ДНК в одинаковых условиях, что позволяет перейти от полуколичественного определения транскриптов генов к количественному анализу. Это расширяет области примене-

ния биочипов для контроля экспрессируемых генов при детальном изучении механизмов формирования резистентности бактерий к антибиотикам и поиска способов ее подавления.

6.3. Ферменты в стимул-чувствительных микрогелях

Эффективная и неdestructивная иммобилизация ферментов является одной из задач современной химической энзимологии и биотехнологии.^{385–388} В качестве матриц для иммобилизации ферментов широко применяют различные полимеры,³⁸⁹ особое место среди них занимают микрогели.³⁹⁰ Это сшитые (со)полимеры с размером частиц в диапазоне 0.05–5 мкм, сами частицы проницаемы для молекул растворителя, а также присутствующих в растворе низко- и многих высокомолекулярных соединений. По сути, микрогели представляют собой высокочувствительные контейнеры, способные связывать значительные количества различных молекул-«гостей».^{391,392} Такие полимерные системы способны обеспечивать благоприятное, обогащенное водой микроокружение для ферментов, что позволяет сохранить их биологическую активность и функции.

Наиболее перспективными материалами для иммобилизации ферментов являются так называемые стимул-чувствительные микрогели,³⁹⁰ в частности микрогели с двойной стимул-чувствительностью, свойства которых определяются как температурой, так и значением pH окружающей среды. К их числу относятся сополимерные микрогели на основе поли(*N*-изопропилакриламида) (ПНИПАМ) — термочувствительного полимера, обладающего нижней критической температурой растворения ~32°C. Входящие в состав микрогелей субцепи ПНИПАМ придают им термочувствительность, тогда как pH-чувствительность подобных полимерных объектов обусловлена наличием в их составе звеньев ионогенного сомономеров, которые могут протонироваться или депротонироваться в зависимости от pH среды.

Термочувствительность сополимерных микрогелей на основе ПНИПАМ проявляется в том, что при низких температурах их частицы находятся в набухом (высокогидратированном) состоянии, а при превышении некоторой критической температуры (температуры фазового перехода, сопровождающегося изменением объема) они значительно гидрофобизируются и сильно уменьшаются в объеме.³⁹⁰ Такое поведение в большинстве случаев является обратимым, и при понижении температуры частицы микрогелей снова набухают. Следовательно, варьируя pH и температуру среды, можно легко регулировать гидрофильно-гидрофобный баланс микрогелей, в частности их степень набухания и заряженности, что позволяет использовать подобные полимерные объекты для модификации поверхностей различной природы.³⁹³

Известно успешное использование pH- и термочувствительных катионных сополимерных микрогелей на основе ПНИПАМ для эффективной модификации проводящих поверхностей (например, графита и золота) с целью создания электрохимических ферментных биосенсорных систем^{393–397} (рис. 27).

Принципы работы биосенсоров, представленных на рис. 27, можно описать следующим образом:

1) в биосенсоре на холин фермент (холиноксидаза) превращает холин в бетаин с одновременным выделением электрохимически активного продукта — пероксида водорода,

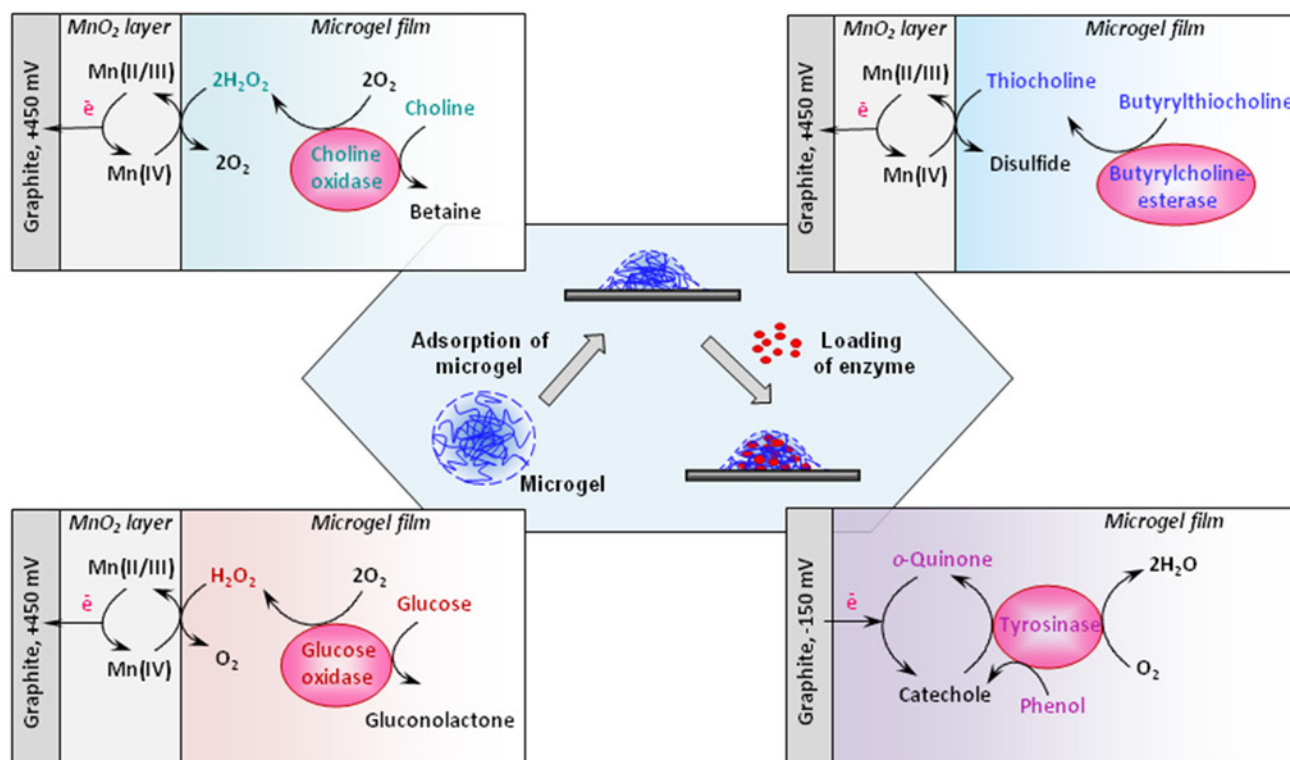


Рисунок 27. Способы модификации поверхности при формировании биосенсоров на основе микрогелей (в центре) и принципы работы биосенсорных систем, в которых использовали холиноксидазу, бутирилхолинэстеразу, глюкозооксидазу и тирозиназу для определения холина, бутирилтиохолина, глюкозы и фенола соответственно (по краям).

дальнейшее медиаторное окисление которого при потенциале +450 мВ генерирует ток электроокисления (измеряемый параметр);

2) в биосенсоре на глюкозу фермент (глюкозооксидаза) превращает глюкозу в глюконолактон с одновременным выделением электрохимически активного продукта — пероксида водорода, дальнейшее медиаторное окисление которого при потенциале +450 мВ генерирует ток электроокисления (измеряемый параметр);

3) в биосенсоре на фенол фермент (тирозидаза) превращает фенол в катехол и далее в *o*-хинон (электрохимически активный продукт), дальнейшее восстановление которого при потенциале –150 мВ генерирует ток электровосстановления (измеряемый параметр);

4) в биосенсоре на бутирилтиохоллин фермент (бутирилхолинэстераза) гидролизует бутирилтиохоллин до тиохолина (электроактивный продукт) и масляной кислоты, а дальнейшее медиаторное окисление первого при потенциале +450 мВ генерирует ток электроокисления (измеряемый параметр).

Чувствительность и иные аналитические параметры таких ферментных биосенсоров напрямую зависят от количества иммобилизованных ферментов и качества иммобилизации. Описанные в данном разделе микрогели прекрасно справляются с этими двумя задачами, обеспечивая высокоемкую и неструктурную физическую иммобилизацию.^{393–397}

Для формирования микрогель-ферментных покрытий на подобных поверхностях успешно применяют процесс, в котором проводят сначала адсорбцию микрогеля, а затем электростатическое связывание адсорбированными частицами микрогеля фермента. Для адсорбции микрогеля выби-

рают условия, при которых его частицы гидрофобизованы, т.е. существенно дегидратированы (повышенная температура), и находятся при pH, соответствующем их незаряженному (или слабозаряженному) состоянию. В этих условиях микрогель проявляет наибольшее сродство к относительно гидрофобным поверхностям. Затем микрогелевое покрытие заряжают, изменяя pH среды, и осуществляют электростатическое связывание фермента в «мягких» условиях (как правило, при нейтральных значениях pH среды и комнатной температуре). Использование этих условий для создания биосенсоров позволяет достичь наилучшей модификации поверхности микрогелями (в частности, катионными) и иммобилизовать большее количество фермента, что обеспечивает высокую чувствительность получаемых биосенсорных систем.^{393,394,396,397}

Иммобилизация ферментов оказывается наиболее эффективной, когда покрытие, сформированное при повышенной температуре сколлапсированными частицами микрогеля, вводят в контакт с раствором фермента при комнатной температуре. В этом случае электростатическое связывание фермента происходит одновременно с набуханием микрогелевой матрицы, которая работает как своеобразная «губка», впитывая в себя его дополнительное количество.³⁹⁴ В то же время возможен альтернативный подход к созданию микрогель-ферментных покрытий, который заключается в формировании микрогель-ферментного комплекса в растворе с его последующим нанесением на поверхность.³⁹⁸

Если микрогель содержит первичные аминогруппы, то после формирования микрогель-ферментного покрытия фермент можно ковалентно пришить к микрогелю, используя любые подходящие способы ковалентной иммобилиза-

ции, что существенно улучшает операционную стабильность биосенсорных систем.³⁹⁷

Сетчатая структура микрогелей позволяет осуществить селективную иммобилизацию ферментов в зависимости от размера их глобул. Так, была описана биферментная система, в которой два фермента, сильно различающиеся размерами своих глобул, имеют разную локализацию в адсорбированных частицах микрогеля.³⁹⁵ Один фермент (холиноксидаза с небольшим размером глобулы) оказывался способен проникать внутрь микрогеля. Второй фермент (BChE, крупный четырехсубъединичный фермент) не проникал внутрь микрогеля и локализовался преимущественно на поверхности его частиц. В зависимости от выбранного субстрата можно было независимо измерять электрохимические отклики холиноксидазы (по холину), BChE (по бутирилтиохолину) или каскадного двухферментного процесса (по бутирилхолину).

Иммобилизация BChE на адсорбированных частицах микрогеля привела к созданию высокочувствительных биосенсоров для количественного определения токсичных фосфорорганических пестицидов — хлорпирифоса и диазинона.³⁹⁶ Для такой микрогель-ферментной биосенсорной системы пределы определения указанных ФОС составили $< 10 \text{ пкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$, что является очень хорошим результатом.

Потенциал стимул-чувствительных микрогелей не ограничивается только созданием биосенсоров. Интересной представляется демонстрация температурной регуляции активности иммобилизованных в них ферментов.^{399,400} В таких системах обнаружена возможность изменения ферментативной активности в результате температурного перехода микрогелевой матрицы из набухшего состояния в сконденсированное. Показано, что при подобном фазовом переходе микрогеля активность иммобилизованной глюкозооксидазы понижается, а при понижении температуры — восстанавливается. Циклическое изменение активности фермента в повторяющихся температурных циклах «нагревание — охлаждение» подтвердили ее способность к многократной регуляции.

Таким образом, стимул-чувствительные микрогели обладают важными достоинствами и имеют преимущества для создания ферментных биосенсорных систем. Применение подобных полимерных объектов позволяет существенно улучшить аналитические возможности биосенсоров, открывает широкие перспективы для конструирования мультиферментных систем с различной локализацией нескольких ферментов. Каскадные биосенсорные системы закладывают основу для формирования «smart»-биосенсоров с возможностью регуляции аналитического отклика системы на внешнее воздействие.

6.4. Измерение активности ферментов и исследование белков с использованием спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния

Спектры комбинационного рассеяния (КР) предоставляют информацию о колебаниях группировок атомов в молекуле, а для количественного анализа используют интенсивность выбранных полос. В силу низкой интенсивности полос в биоаналитических исследованиях преимущественно применяют высокочувствительные модификации метода КР, такие как гигантское комбинационное рассеяние света (ГКР) и его резонансный вариант (РГКР), основанные на усилении сигнала при помощи металлических (чаще всего

Au или Ag) плазмонных наноструктур.⁴⁰¹ Применительно к ферментативным реакциям высокая чувствительность методов ГКР и РГКР актуальна прежде всего для измерения ферментных меток — универсальных систем усиления, используемых в твердофазном иммуоферментном анализе (ИФА), иммуногистохимии, и реже в системах, основанных на гибридизации нуклеиновых кислот. Наиболее часто в качестве меток используют РО из корней хрена, щелочную фосфатазу (AP) (см. рис. 9) и β -галактозидазу (β -GAL), поэтому высокочувствительные методы определения активности этих ферментов с помощью ГКР фактически являются основой нового поколения молекулярно-диагностических систем.⁴⁰¹ Для таких аналитов, как клинически значимые ферменты в биологических жидкостях, ферменты в продуктах питания и биотехнологические рекомбинантные ферменты, наибольшую значимость приобретают простота процедуры анализа, его продолжительность и стоимость, а также соответствие аналитического диапазона клиническим или производственным потребностям. В ряде случаев по этим критериям методики на основе ГКР(РГКР) считаются оптимальными.^{402–404}

Для разработки методик определения ферментативной активности на основе ГКР важно найти соединения (продукты или субстраты ферментативных реакций), которые обладают высоким сечением КР, связываются с поверхностью металлов и, как следствие, демонстрируют интенсивные спектры.⁴⁰⁵ Первый универсальный подход основан на прочных взаимодействиях некоторых химических группировок с поверхностью благородных металлов. Например, тиолы образуют ковалентную связь;^{406–408} а 1,2,3-триазолы, 8-гидроксифенилин и 7-амино-4-метилкумарин адсорбируются за счет нековалентных взаимодействий.^{405,409,410} Появление такой группировки в молекуле в ходе ферментативной реакции обеспечивает селективную ГКР-регистрацию продукта на фоне избытка субстрата. Этот подход используют для определения активности различных гидролаз: протеаз, липаз, эстераз (в том числе BChE), β -глюкозидазы, ОРН.^{405–408,410} Для ферментных меток (AP и β -GAL) данный принцип был опробован лишь в работе⁴⁰⁹ на уровне проверки концепции.

Второй широко используемый в ГКР подход к определению ферментативной активности связан с феноменологическим поиском пар субстрат–продукт, в которых продукт обладает более высоким сродством к поверхности Au или Ag. Чаще всего ГКР-регистрацию применяют в ИФА (рис. 28), и на сегодняшний момент большинство описанных систем являются адаптациями известных колориметрических субстратов к таким измерениям.⁴⁰² Наилучшие результаты в этом направлении достигнуты с субстратами РО хрена — *o*-фенилендиамином,^{411,412} 3,3',5,5'-тетраметилбензидином⁴¹³ и лейкокрасителями,⁴¹⁴ а также субстратом AP — 5-бром-4-хлор-3-индоксилфосфатом.⁴¹⁵

Для случаев, когда продукт ферментативной реакции не обладает интенсивным спектром ГКР, возможна предварительная модификация поверхности металла для осуществления химического взаимодействия с формированием ГКР-активного соединения *in situ*.^{403,416,417} Описан также подход к определению активности ферментов на основе ГКР путем измерения убыви субстрата.^{418,419} В этом варианте субстрат должен обладать более интенсивным по сравнению с продуктом спектром ГКР.

Коэффициент усиления полос в спектрах ГКР сильно зависит от размера и степени агрегации НЧ металла, что является основой еще одного универсального подхода к реги-

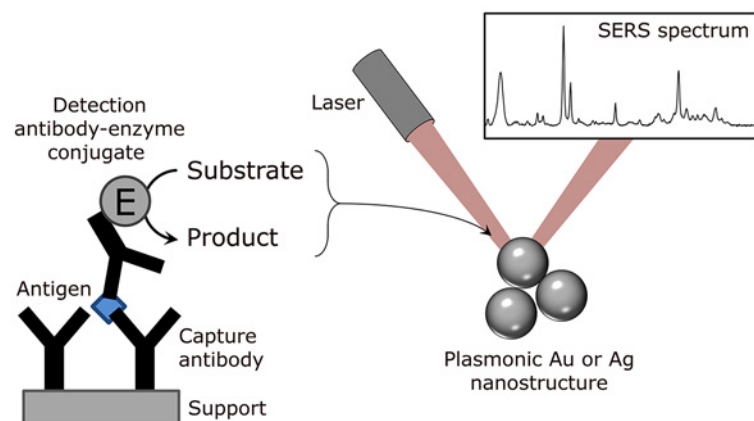


Рисунок 28. Принципиальная схема ИФА с ГКР-регистрацией. В результате проведения иммунохимических стадий на твердом носителе (поверхности полистирольного планшета, магнитных частицах и др.) присутствует ферментная метка (E) в количестве, связанном с концентрацией определяемого антигена. Активность ферментной метки измеряют методом ГКР с использованием одного из описанных в тексте подходов.

страции ферментативной активности. Если субстрат или продукт вызывает осаждение или растворение металла, модуляция сигнала ГКР репортерной молекулы, обладающей интенсивными полосами, может быть использована для мониторинга протекания ферментативной реакции,^{420–422} в том числе в качестве одного из вариантов реализации ИФА с ГКР-регистрацией.

Таким образом, сочетание ферментативного катализа и спектроскопии ГКР(РГКР) сформировало динамично развивающееся направление научных исследований, которое в настоящее время как обладает широким набором подходов, так и имеет практически значимые результаты в виде аналитических методик с улучшенными, а иногда и уникальными характеристиками.

Применение активных подложек, представляющих собой пленки Au или Ag с контролируемой морфологией и реализующие химический и электромагнитный механизмы ГКР, обеспечивает исследование и количественное определение непосредственно биомолекул — белков-переносчиков, белков-маркеров и ферментов.^{423,424} В последние годы разработано большое число разнообразных ГКР-подложек, способных обеспечить высокую чувствительность и стабильность метода, а также технологических подходов к контролю морфологии поверхности для улучшения ГКР-характеристик.^{425–427} Часто при разработке ГКР-подложек для детектирования белков в качестве тестового аналита используют раствор бычьего сывороточного альбумина (СА).^{428–430} Спектроскопия ГКР, реализуемая на планарных ГКР-подложках, позволяет исследовать и динамические свойства белков, включая агрегационное поведение и изменение вторичной структуры.⁴³⁰

Для детектирования белков также активно применяют различные ГКР-активные «сэндвич»-подложки на основе тонких слоев НЧ Au или Ag, которые нанесены на упорядоченные структуры, полученные травлением, или на полимерные матрицы.^{431,432} Например, были получены ГКР-спектры каталазы, цитохрома с, лизоцима и авидина в диапазоне концентраций от 50 до 5 мкг·мл⁻¹.⁴³¹ Следовательно, развитие метода ГКР в области исследования свойств и количественного определения ферментов и белков сопряжено с использованием высокотехнологичных методов формирования подложек, допускающих серийное производство и дальнейшую автоматизацию как процесса измерения, так и процесса обработки результатов с помощью методов машинного обучения. Для определения оптимальных параметров поверхности подложек, выбора до-

ступного и воспроизводимого технологического процесса для формирования подложек с различными морфологическими характеристиками, необходимо исследовать плазменные свойства подложек разных конфигураций и уметь прогнозировать эти факторы.

Ряд активных ГКР-подложек позволяет измерять спектры ГКР белков и ферментов без сложной пробоподготовки. На основе экспериментов по исследованию различных вариаций морфологии ГКР-подложек с Ag был предложен относительно простой метод их формирования электронно-лучевым испарением в вакууме при варьировании параметров процесса.⁴³³ Полученные ГКР-подложки представляли собой поверхности с наноразмерным рельефом, а их эффективность была продемонстрирована на примере миоглобина человека. Параллельно была проведена оптимизация процессов пробоподготовки на таких ГКР-подложках с использованием ультразвукового и лазерного воздействия на аналиты,⁴³⁴ что привело к дополнительному усилению амплитуды ГКР-сигналов в спектрах аналитов до двух порядков по величине.

Впервые с использованием ГКР-подложек⁴⁰² было проведено ГКР-исследование ангиотензинпревращающего фермента (АСЕ) (см. рис. 26,с) с целью разработки методики определения источника его получения. Сначала были зарегистрированы ГКР-спектры АСЕ из семенной жидкости в нативной и денатурированной форме и определен оптимальный тип ГКР-подложки для этого фермента.⁴³⁵ Далее получали ГКР-спектры АСЕ из семенной жидкости, легких и сердца и с помощью методов машинного обучения определяли вид источника.⁴³⁶ Для этого сигналы в спектрах из разных источников разделяли с помощью линейного дискриминантного анализа, а результат анализировали методом линейной классификации, получая основные вклады признаков (аналоги полос колебаний), определяющие различия в спектрах. Количественное определение белков было выполнено при установлении степени гликирования человеческого СА в его смеси с немодифицированным человеческим СА на ГКР-подложках на основе Ag.⁴³⁷ Массивы ГКР-спектров разных видов СА с различными концентрациями были обработаны аналогично данным по АСЕ. Результаты таких исследований показали перспективность применения ГКР-активных планарных подложек на основе Ag для решения разных задач с использованием методов машинного обучения и автоматизированной пробоподготовки, что актуально для клинической медицины и автоматизации диагностики различных заболеваний.

6.5. Биоэлектрокатализ и новые методы биоэлектроанализа

Биоэлектрокатализ сочетает преимущества био- и электрокатализа. Направления исследований под названиями «Биоэлектрокатализ как новый феномен» и «Ферменты как катализаторы электрохимических реакций» были предложены И.В.Березиным и С.Д.Варфоломеевым.⁴³⁸ Широкая субстратная специфичность цитохромов P450 (CYP) как основных ферментов I фазы биотрансформации и детоксификации ксенобиотиков (см. рис. 19) позволяет использовать модельные неинвазивные цитохром P450-системы для исследования метаболических превращений лекарственных препаратов, а также межлекарственных взаимодействий и плейотропных свойств фармакологических препаратов, для получения новых химических соединений с фармакологической активностью, для поиска препаратов-корректоров, регулирующих активность полиморфных модификаций цитохромов P450.⁴³⁹ Для каталитического действия цитохромов P450 необходимы белковые редокс-партнеры, выполняющие роль переносчиков электронов от донора электронов NADPH к этому ферменту: флавопротеин NADPH-зависимая редуктаза и цитохром b_5 в случае митохондриальных систем, а также ферредоксиредуктаза и ферредоксин для митохондриальных и бактериальных систем.⁴³⁹ Уникальность CYP-биоэлектрокатализа состоит в индуцировании реакции электронами с электрода, что исключает необходимость использования редокс-партнерных белков цитохрома P450 и восстановительных коферментов NADPH или NADH.^{440, 441}

Цитохромы P450 являются белками-мишенями при разработке новых лекарственных препаратов. Для гормон-зависимых онкологических заболеваний ингибиторы CYP17A1, катализирующего 17α -гидроксиллазную- $17,20$ -лиазную реакцию, используют при лечении андроген-зависимого рака простаты. Ингибиторы CYP19 (ароматазы) проявляют свойства противораковых препаратов и применяются при лечении рака молочной железы как эстроген-зависимого онкопоражения.^{439, 442} Среди исследованных производных прегн- $17(20)$ -ена были выявлены эффективные ингибиторы электрокаталитической активности CYP17A1.⁴⁴¹

Антиоксидантные препараты (аскорбиновая кислота, восстановленный глутатион, таурин, цитохром c , малат этилметилгидроксипиридина (этоксидол)) стимулируют электрохимическое восстановление CYP3A4 и CYP2C9 и уменьшают скорость накопления АФК, тем самым стабилизируя фермент. Антиоксиданты можно использовать в комплексной фармакотерапии для регуляции скорости метаболизма лекарственных средств, особенно при персонализированном подходе к лечению пациентов с полиморфизмом генов — изоферментов цитохрома P450.^{443, 444}

Полиморфизм ферментов, метаболизирующих лекарственные препараты, является причиной многих нежелательных побочных эффектов от приема лекарств. Показана стимулирующая роль антиоксидантных препаратов (мексидола и таурина) на метаболические реакции нестероидного противовоспалительного препарата диклофенака, катализируемые цитохромами. Технология, основанная на биоэлектрокаталитических процессах, перспективна для установления изменения диапазона концентраций (смещения «терапевтических окон») при комбинированном применении препаратов различной терапевтической направленности.^{443–446}

Разработаны количественные методы анализа субстратов и метаболитов цитохром P450-зависимых электрофер-

ментативных реакций с применением только электрохимических подходов для регистрации электрокаталитической активности этих гемопротеинов.^{447, 448} Использование потенциалов двух диапазонов и электродов двух типов (для ферментов цитохромов P450 и для субстратов) позволяет регистрировать и электрокаталитическую активность CYP, и электроокисление субстрата или метаболита.⁴⁴⁸

Недостаточно внимания пока уделяют работе цитохромов P450 в режиме электрохимических биореакторов для электроферментативного синтеза биологически активных соединений. Исследованы электрокаталитические цитохромы CYP3A4 и CYP2C9 как наиболее функционально-значимые изоформы в режиме перехода от 2D- к 3D-сенсору за счет включения фермента в регулярные нанопоровые мембраны анодного Al_2O_3 (Anodisc 13) или порообразующего белка стрептолизина O, помещенные на рабочую поверхность электрода.^{449–452} В реакциях N -деметилирования в качестве моделей электронотранспортной цепи CYP были использованы биоконъюгаты цитохромов P450 с флавиновыми нуклеотидами и рибофлавином. Имобилизация бактосом (бактериальных клеток, содержащих одновременно цитохром P450, редуктазу и цитохром b_5) также является перспективным подходом к повышению электрокаталитической активности CYP. Такие приемы увеличивают эффективность электрокаталитических цитохромов P450 на 50–200%.⁴⁵³

Следовательно, электрохимические CYP-биокаталитические системы можно считать новым неинвазивным инструментом для экспериментальной фармакологии, поиска новых лекарственных препаратов, исследования межлекарственных взаимодействий и анализа особенностей генетического полиморфизма цитохромов P450.

6.6. Молекулярный имиджинг ферментативной активности *in vivo*

В последнее время активно развиваются методы молекулярного имиджинга (МИ), объектом которого являются молекулярные процессы в живых интактных организмах. Смысл МИ систем заключается в сборе сигналов и формировании изображений, которые анализируют с получением пространственно-временных характеристик определенных молекулярных процессов, протекающих в органах и тканях живого организма и отличающихся высокой степенью гетерогенности как внутри живого организма, так и между различными особями. В качестве объектов для МИ-исследований выступают микроорганизмы, клетки млекопитающих и лабораторные животные (грызуны).

Наиболее значимым элементом структурной организации микроорганизмов является клеточная стенка, молекулярная структура которой в значительной степени определяется их биохимическими особенностями. На структуру стенки могут влиять внешние условия, в которых оказывается микроорганизм. Так, бактерии *Mycobacterium tuberculosis* в неблагоприятных условиях способны переходить в покоящееся состояние, при этом наблюдается накопление производного копропорфирина — его тетраметилового эфира,⁴⁵⁴ с конценрацией которого коррелируют изменения вязкости мембран.⁴⁵⁵ Следовательно, эндогенное накопление метилированных копропорфиринов приводит к возникновению неравновесного состояния в клетке, выражающегося в значительном изменении физических свойств мембраны микобактерий. При переходе клеток из

одного состояния в другое внутри них реализуется следующая цепь событий:

- закисление внешней среды,
- усиление процесса биосинтеза порфиринов,
- метилирование порфиринов и их релокализация в клеточную стенку,
- изменение вязкости мембраны,
- угнетение дыхания,
- изменение метаболического состояния клетки.

В случае клеток млекопитающих, которые имеют более сложную организацию клетки, появляется множество клеточных компартментов, прежде всего ядер клеток. Для оценки различий во внутриклеточной вязкости используют среднее время пребывания флуоресцентного зонда в фокальном объеме, измеряемое методами флуоресцентной корреляционной микроскопии. Флуктуации от появления флуоресцентной молекулы в фокальном объеме возникают при ее концентрации в наномолярном диапазоне. Флуоресцентную молекулу можно создавать при использовании фотоконвертируемых (например, из форм с зеленым свечением в красные) флуоресцентных белков.⁴⁵⁶ Таким способом удалось зарегистрировать, что на ранней стадии апоптоза, когда еще нет морфологических изменений в структуре клетки, наблюдается активация каспазы 3 по времени жизни расщепленного FRET-сенсора (FRET — фёрстеровский резонансный перенос энергии). Судя по увеличению времени удерживания в фокальном объеме, можно сделать вывод о том, что одновременно происходит увеличение вязкости,⁴⁵⁷ причем внутри всей клетки. Однако это увеличение неомогенно и наиболее ярко выражено вблизи клеточного ядра, где возможно формирование комплекса с PARP. Следовательно, в клетках млекопитающих, обладающих более сложной структурой по сравнению с бактериальными клетками, изменение вязкостных свойств в различных клеточных компартментах может происходить по-разному, что свидетельствует о различной локализации ферментативной активности внутри клетки.

Квазинепрерывный неинвазивный мониторинг в реальном времени клеточных и молекулярных событий в организмах является важной задачей современной системной биологии. Наиболее эффективным инструментом для этой цели служат флуоресцентные белки (FP), поскольку их можно применять для длительных измерений *in vivo* без дополнительных помех или стрессов, связанных с введением флуоресцентного соединения в живой организм.⁴⁵⁸ Наиболее эффективно FP используют для прижизненной детекции различных регуляторных протеаз, например каспазы 3, роль которой в программируемой гибели клеток хорошо известна. Современные методы регистрации флуоресценции по временам жизни в возбужденном состоянии открывают новые возможности для визуализации процессов в реальном времени как *in vitro*, так и *in vivo*.⁴⁵⁹ Методы Flim-Fret исключают проблемы, связанные с колебанием концентрации флуорофора в биологических образцах, не требуют процедуры калибровки⁴⁵⁹ и обеспечивает наблюдение за активацией каспазы-3 в виде изображения, что позволяет оценить гетерогенность ответа на химиотерапию в различных областях опухоли. Так, изображение ксенотрансплантата A549-TR23K имеет бимодальное распределение времен жизни. Это подтверждает гипотезу гетерогенного ответа опухоли на химиотерапию, связанную, вероятно, с особенностями фармакокинетики противоопухолевых агентов в моделях ксенотрансплантатов, что обусловлено характеристиками кровоснабжения опухоли. Хотя точность из-

мерения флуоресцентного времени жизни не зависит от концентрации FP и протекания ряда фотохимических процессов, в живом организме появляются новые факторы, которые необходимо учитывать, в частности сложная траектория движения фотонов из-за множественного рассеяния. Проблема рассеяния фотонов может быть снята с помощью флуоресцентной томографии по оптическим различиям тканей в показателе преломления. Чтобы решить эту задачу, связанную с размером и локализацией опухоли в организме животных, необходимо применять методы анатомического и морфологического анализа, например магниторезонансную томографию. Совместить одновременное измерение флуоресцентно-томографического изображения с магниторезонансным изображением можно при использовании оптоволоконного жгута. В 2022 г. были успешно проведены модельные эксперименты с простейшим световодом и фантомом мыши.⁴⁶⁰

Таким образом, уже существуют прототипы приборов, которые могут в реальном времени решать отдельные задачи МИ, т.е. регистрировать статистические процессы, а также контролировать неравновесные морфологические и анатомические изменения в тканях. Однако в ближайшее время такие прототипы должны быть дополнены новыми вычислительными методами, которые используют алгоритмы искусственного интеллекта и учитывают реальную физическую картину процессов, протекающих в живых организмах.

7. Заключение

Современное технологическое общество базируется на создании новых процессов, обеспечивающих высокоэффективные технологии конверсии вещества и энергии с практически бесконечными ресурсными возможностями и с предельно низким влиянием на качество окружающей среды. Эти условия являются базисом для устойчивого развития. Использование традиционного химического катализа и катализа белковыми молекулами определяется условиями реакции. Ферменты не могут работать при высоких температурах (>100°C), при которых термодинамически возможны многие востребованные химические процессы. В то же время ферменты будут вне конкуренции, если проводить реакцию в условиях стабильности белковых молекул, причем области применения ферментов непрерывно расширяются. Использование ферментов и биотехнологических процессов на их основе в настоящее время реализуется как одна из основ химико-технологического устойчивого развития. Это определяется тем, что ферменты — самые распространенные, доступные и подробно исследованные катализаторы. Химическая и инженерная энзимология обеспечивают эту отрасль знания возможностями создания и использования биокатализаторов для самых разных областей.

В настоящее время получена структурная информация с атомарным разрешением для >150 тысяч белков, значительная часть из них — ферменты. Качественный скачок в понимании фундаментальных основ молекулярных механизмов катализа ферментами произошел 10–15 лет назад в связи с развитием суперкомпьютерных вычислительных технологий и применением методов квантовой и молекулярной механики для моделирования процессов в каталитических центрах биокатализаторов. Для многих значимых ферментов получена информация о структуре всех интермедиатов и переходных состояний каталитического процес-

са, построены энергетические профили реакций, даны оценки возможных значений кинетических характеристик превращений. Принципиально важную роль в общем понимании природы ферментативного катализа играет биоинформатика с ее набором компьютерных методов. Фундаментальный прорыв в понимании молекулярных трансформаций каталитического центра ферментов в процессе каталитического цикла с выяснением особенностей строения в высшей степени нестабильных интермедиатов и переходных состояний вносит неоценимый вклад в общую теорию катализа.

Развитие генной инженерии позволяет производить замeны отдельных аминокислот в молекуле белка, что обеспечивает путь создания катализаторов с новыми свойствами — термостабильностью, каталитической активностью, специфичностью по реагентам. Возможности целенаправленного изменения структуры белка как рационального подхода к конструированию белковой молекулы создают уникальные основы для получения катализаторов многих нетривиальных реакций. Этот подход имеет гигантский потенциал для развития.

В настоящее время возрастает роль биокатализа в развитии медико-биологических технологий и медицины в целом. Синтез современных антибиотиков основан на использовании ферментов. В то же время ферменты патогенных организмов в мутационном процессе активно разлагают антибиотики, проявляя резистентность к ним. Устойчивость к действию антибиотиков — одна из наиболее значимых проблем борьбы с инфекциями, молекулярные биокаталитические аспекты которой требуют дальнейшего исследования.

Большинство современных лекарственных препаратов — ингибиторы ферментов. Знание структуры белка при компьютерном моделировании процессов обуславливает возможность скрининга химических препаратов как потенциальных лекарственных средств. Такой довольно тривиальный подход используют практически все фармацевтические компании мира. Он развивается в исследованиях лактамаз, разрушающих антибиотики, и в поисках лекарственных средств, улучшающих когнитивные функции человека при нейродегенеративных заболеваниях. Среди таких средств — ингибиторы ключевых ферментов центральной нервной системы человека. Структура, механизмы действия и перспективы создания современных лекарств составляют главные проблемы развития биокатализа в медицине.

Разработка молекулярной стратегии борьбы с патологиями требует фундаментального понимания биокаталитических закономерностей развития тех или иных процессов. Принципиально важные ферментативные реакции протекают в организме при изменении молекулярной структуры ДНК. Ферменты обеспечивают процессы репарации ДНК, создавая условия функционирования метаболизма в норме и при патологиях. В последнее десятилетие существенное развитие получили исследования ферментного разрушения токсикантов как в организме человека, так и в среде его обитания, применения ферментов в терапии (в частности, онкологических заболеваний), а также разработка новых методов доставки и использования белковых препаратов. Ярким достижением в этой области стало создание и применение ферментов, разрушающих нервнопаралитические яды.

Существенна роль ферментов в аналитической химии, причем она постоянно возрастает. Сегодня иммуноферментный анализ — основа современной медицинской

диагностики. В бытовом медицинском анализе широкое применение находят биоинженерные системы определения глюкозы в крови на основе биоэлектрокатализа с использованием фермента глюкозооксидазы. Аптамеры, мультианализ на основе биочиповых технологий и стимул-чувствительных микрочипов являются элементами современных аналитических подходов. Большое практическое значение приобретают аналитические методы усиления сигналов ГКР и исследования белков этим методом. Продолжают совершенствоваться методы биоэлектрокатализа и аналитических применений сенсорных технологий на основе биоэлектроанализа. Новые возможности открывает молекулярный имиджинг активности ферментов непосредственно в организме.

Ферменты и биокаталитические технологии — существенная часть химико-технологического, медико-биологического и химико-аналитического обеспечения современного общества. Производство ферментов составляет ~25% от общего количества катализаторов в мире. Уровень фундаментальных исследований ферментов и их практических применений создают основы для уверенности в существенном расширении спектра применения биокатализа и повышения его вклада в устойчивое развитие общества.

8. Благодарности

Обзор подготовлен при финансовой поддержке из следующих источников:

— из средств Госзаданий МГУ им. М.В.Ломоносова по темам №№121041500039-8, 122041100066-7, 123032300028-0, 121011290089-4, 121011990022-4 (для разделов 3, 4.1–4.4, 5.1, 5.6, 5.8–5.10, 5.12, 6.2–6.4);

— Российского научного фонда (проекты №№23-13-00011 и 21-71-30003 для раздела 2, №21-14-00037 для раздела 4.3, №21-71-30003 для раздела 5.1, №23-74-10040 и 22-14-00112 для раздела 5.3, №20-15-00390-П для раздела 5.4, №23-24-00115 для раздела 5.5, №20-14-00155 для раздела 5.7, №24-25-00104 для раздела 5.9, №22-13-00261 для раздела 5.10, №22-24-00424 для раздела 6.3);

— Российского фонда фундаментальных исследований (проект №20-04-00915а) и субсидии из федерального бюджета по реализации отдельных мероприятий Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 гг. (Соглашение №075-15-2021-1396) (для раздела 3);

— из средств Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для реализации крупных научных проектов по приоритетным направлениям развития науки и техники (проект №075-15-2024-627) (для раздела 5.2) и в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период 2021 - 2030 годы (проект №122030100168-2) (для раздела 6.5);

— из средств Госзадания ИХБФМ СО РАН (тема №121031300056-8) (для раздела 5.3);

— из средств Междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ им. М.В. Ломоносова (проект №23-Ш04-45) (для раздела 6.1);

— из средств Госзадания ИБХФ РАН (тема №122041400080-0) и ИТПЭ РАН (тема FFUR-2024- 0007), а также РНФ (проект №22-14-00213) (для раздела 6.4);

— из средств Госзадания ФИЦ Биотехнологии РАН (тема №122041100154-1) (для раздела 6.6).

Обсуждаемые в обзоре экспериментальные данные были получены в том числе на оборудовании, приобретенном по Программе развития МГУ (разделы 5.9, 5.10, 6.3, 6.4). Авторы раздела 5.2 выражают благодарность ЦКП ИФАВ РАН (FFSG-2024-0021) за предоставленное оборудование.

9. Список сокращений

ΔG^0 — свободная энергия Гиббса,
 K_M — константа Михаэлиса,
 k_{cat} — каталитическая константа,
ACE — ангиотензинпревращающий фермент,
AChE — ацетилхолинэстераза,
Amp — ампициллин,
AMP — аденозинтрифосфат,
L-ASP — L-аспарагиназа,
AP — щелочная фосфатаза,
APE1 — апуриновая(апиримидиновая) эндонуклеаза-1,
ATP — аденозинтрифосфат,
BChE — бутирилхолинэстераза,
BL — β -лактамазы,
CBH — целлобиогидролаза,
CboFDH — формиадегидрогеназа из дрожжей *Candida boidinii*,
CES — карбоксилэстераза,
ChE — холинэстеразы,
CP — предпочтение к коферменту (coenzyme preference),
CYP — цитохром P450,
DAAO — оксидаза D-аминокислот,
DASPO — D-аспаратоксидаза,
E — фермент,
E-nR — ферментативные нанореакторы
EcA — L-аспарагиназа из *Escherichia coli*,
EGI — гетерологичная эндоглюканаза I из *Trichoderma reesei*
EGII — эндо- β -1,4-глюканаза II,
EPO — пероксидаза эозинофилов,
ErA — L-аспарагиназа из *Erwinia chrysanthemi*,
FDH — формиадегидрогеназа,
FP — флуоресцентные белки,
FRET — фёрстеровский резонансный перенос энергии,
 β -GAL — β -галактозидаза,
GAPD — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа,
HAA — гидролазы эфиров α -D-аминокислот,
HPF1 — фактор PAR-илирования гистонов 1,
IC₅₀ — концентрация полумаксимального ингибирования,
LD₅₀ — полулетальная доза,
LPO — лактопероксидаза,
Luc — люцифераза,
MPO — миелопероксидаза,
PPase — пирофосфатаза,
mPPase — мембранные пирофосфатазы,
NAD — никотинамиддениндинуклеотид,
NADP — никотинамиддинуклеотидфосфат,
NhaDAAO — оксидаза D-аминокислот из архей *Natrichaeobius halalkaliphilus* AArch4,
NhyDAAO — оксидаза D-аминокислот из бактерий *Natronosporangium hydrolyticum* ASPA39,
OpaDAAO — оксидаза D-аминокислот из дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL-1,
OPH — органофосфатгидролаза,
PA — пенициллинацилаза,
PAR — поли(ADP-рибоза),

PARG — поли(ADP-рибоза)гликогидролаза,
PARP1 — поли(ADP-рибоза)полимераза 1,
PBP — пенициллинсвязывающие белки,
PO — пероксидаза хрена,
Por — порфирин,
POX — параоксон,
PPase — пирофосфатаза,
PPi — пирофосфат,
PseFDH — формиадегидрогеназа из бактерий *Pseudomonas* sp.101,
PUA — α,β -ненасыщенный альдегид,
RrA — L-аспарагиназа из *Rhodospirillum rubrum*,
SauFDH — формиадегидрогеназа из патогена *Staphylococcus aureus*,
SELEX — систематическая эволюция путем экспоненциального обогащения,
SOD1 — супероксиддисмутаза 1,
TPO — тиреоидная пероксидаза,
Xyle — гетерологичная эндоксилаза E из *Penicillium canescens*,
АП (сайты) — апуриновые-апиримидиновые (сайты),
АСМ — атомно-силовая микроскопия,
АФГ — активные формы галогенов,
АФК — активные формы кислорода,
БА — болезнь Альцгеймера,
БП — болезнь Паркинсона,
ВГД — внутриглазное давление,
ГКР — гигантское комбинационное рассеяние,
ИФА — иммуноферментный анализ,
КМ/ММ — (методы) квантовой механики/молекулярной механики,
КМЦ — карбоксиметилцеллюлоза,
КР — комбинационное рассеяние,
КФ — классификация ферментов,
МКЦ — микрокристаллическая целлюлоза,
МИ — молекулярный имиджинг,
НМ — неупорядоченный мутагенез,
НПС — некрахмальные полисахариды,
НК — нуклеиновые кислоты,
НЧ (англ. NP) — наночастицы,
ОНП — однонуклеотидный полиморфизм,
ПАВ — поверхностно-активные вещества,
ПНИПАМ — поли(N-изопропилакриламид),
ПТМ — посттрансляционные модификации,
ПЦР — полимеразная цепная реакция,
ПЭГ — полиэтиленгликоль,
РГКР — резонансное гигантское комбинационное рассеяние,
СА — сывороточный альбумин,
ФОС — фосфорорганические соединения,
ФП — ферментные препараты,
ЭРО — эксцизионная репарация оснований.

10. Сведения об авторах

С.Д.Варфоломеев (S.D.Varfolomeev). Член-корреспондент РАН, доктор химических наук, профессор, директор Института физико-химических основ функционирования сетей нейронов и искусственного интеллекта химического факультета МГУ, научный руководитель ИБХФ РАН (автор разделов 1 и 7).
E-mail: sdvarf@bk.ru
Область научных интересов: биокатализ, ферментативная кинетика биопроцессов, молекулярное моделирование механизма действия ферментов, химическая энзимология.

В.К.Швядас (V.Švedas). Доктор химических наук, профессор факультета биоинженерии и биоинформатики, заведующий лабораторией информатики Научно-исследовательского вычислительного центра МГУ (разделы 1, 2 и 5.1).

E-mail: vytas@belozersky.msu.ru

Область научных интересов: биокатализ, методы биоинформатики в энзимологии, ферментативная кинетика, молекулярное моделирование механизма действия ферментов, ферменты в органическом синтезе.

Е.Н.Ефременко (E.N.Efremenko). Доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией экобиокатализа химического факультета МГУ (разделы 1, 4.2, 5.6 и 11).

E-mail: elena_efremenko@list.ru

Область научных интересов: экобиокатализ.

А.М.Егоров (A.M.Egorov). Академик РАН, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории инженерной энзимологии химического факультета МГУ (разделы 2 и 5.1).

E-mail: aegorov@enz.chem.msu.ru

Область научных интересов: энзимология, структурная биология, антибиотикорезистентность, белковая инженерия.

М.Г.Хренова (M.G.Khrenova). Доктор физико-математических наук, профессор химического факультета МГУ (разделы 2, 5.1 и 6.1).

E-mail: khrenovamg@my.msu.ru

Область научных интересов: молекулярное моделирование, механизмы ферментативных реакций, вычислительная и квантовая химия, молекулярная динамика.

В.И.Тишков (V.I.Tishkov). Доктор химических наук, профессор химического факультета МГУ (раздел 3).

E-mail: vitishkov@gmail.com

Область научных интересов: биокатализ, молекулярная биология, структурная биология, генетическая инженерия и дизайн белков, биотехнология, медицинский анализ и диагностика.

Д.Л.Атрошенко (D.L.Atroshenko). Кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной инженерии ФИЦ Биотехнологии РАН, доцент химического факультета МГУ (раздел 3).

E-mail: atrdenis@gmail.com

Область научных интересов: биокатализ, молекулярная биология, структурная биология, генетическая инженерия и дизайн белков, биотехнология, медицинский анализ и диагностика.

А.А.Пометун (A.A.Pometun). Доктор химических наук, заведующая лабораторией молекулярной инженерии ФИЦ Биотехнологии РАН, старший научный сотрудник химического факультета МГУ (раздел 3).

E-mail: aapometun@gmail.com

Область научных интересов: биокатализ, молекулярная биология, структурная биология, генетическая инженерия и дизайн белков, биотехнология, медицинский анализ и диагностика.

С.С.Савин (S.S.Savin). Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник химического факультета МГУ (раздел 3).

E-mail: savinslava@gmail.com

Область научных интересов: биокатализ, молекулярная биология, структурная биология, генетическая инженерия и дизайн белков, биотехнология, медицинский анализ и диагностика.

Н.Н.Угарова (N.N.Ugarova). Доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории физико-химических основ биоконверсии энергии химического факультета МГУ (раздел 4.1).

E-mail: nugarova@gmail.com

Область научных интересов: молекулярный дизайн и функционирование ферментов, биолюминесцентный микроанализ.

Г.Ю.Ломакина (G.Yu.Lomakina). Кандидат химических наук, старший научный сотрудник той же лаборатории (раздел 4.1).

E-mail: lomakinagalina@yahoo.com

Область научных интересов: молекулярный дизайн и функционирование ферментов, биолюминесцентный микроанализ.

И.В.Гачок (I.V.Gachok). Кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории экобиокатализа химического факультета МГУ (разделы 8, 9, 10 и 11).

E-mail: ivgachok@gmail.com

Область научных интересов: биокатализ.

И.В.Лягин (I.V.Lyagin). Кандидат химических наук, старший научный сотрудник той же лаборатории (раздел 5.6).

E-mail: lyagin@enzyme.chem.msu.ru

Область научных интересов: кинетика и катализ.

В.И.Муронец (V.I.Muronetz). Доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом биохимии животной клетки НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ (раздел 4.3).

E-mail: vimuronets@belozersky.msu.ru

Область научных интересов: энзимология, белковая химия, гликолиз, молекулярные механизмы нейродегенеративных заболеваний.

А.П.Синицын (A.P.Sinitsyn). Доктор химических наук, профессор, заведующий лабораториями физико-химии ферментативной трансформации полимеров химического факультета МГУ и биотехнологии ферментов ФИЦ Биотехнологии РАН (раздел 4.4).

E-mail: apsinityn@gmail.com

Область научных интересов: энзимология и биохимия карбогидраз, промышленные ферменты, промышленная биотехнология.

О.А.Синицына (O.A.Sinitsyna). Кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории физико-химии ферментативной трансформации полимеров химического факультета МГУ (раздел 4.4).

E-mail: oapsinitsyna@gmail.com

Область научных интересов: энзимология и биохимия карбогидраз, промышленные ферменты.

А.М.Рожкова (A.M.Rojhkova). Кандидат химических наук, старший научный сотрудник химического факультета МГУ и лаборатории биотехнологии ферментов ФИЦ Биотехнологии РАН (раздел 4.4).

E-mail: amrojkova@yahoo.com

Область научных интересов: генетическая инженерия грибов, промышленные ферменты.

Г.Ф.Махаева (G.F.Makhaeva). Кандидат химических наук, главный научный сотрудник и заведующая лабораторией молекулярной токсикологии ИФАВ ФИЦ ПХФ и МХ РАН (раздел 5.2).

E-mail: gmakh@ipac.ac.ru

Область научных интересов: медицинская химия, поиск и исследование новых потенциальных препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний, биокатализ, сериновые гидролазы.

С.О.Бачурин (S.O.Bachurin). Академик РАН, доктор химических наук, профессор, научный руководитель и заведующий отделом медицинской и биологической химии того же института (раздел 5.2).

E-mail: bachurin@ipac.ac.ru

Область научных интересов: медицинская химия, поиск и исследование новых потенциальных препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний, исследование связи структура–биологическая активность соединений, моделирование нейродегенеративных процессов.

О.И.Лаврик (O.I.Lavrik). Академик РАН, доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник и заведующая лабораторией биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН (раздел 5.3).

E-mail: lavrik@niboch.nsc.ru

Область научных интересов: энзимология и регуляция процессов репарации ДНК.

Д.О.Жарков (D.O.Zharkov). Член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией геномной и белковой инженерии того же института (раздел 5.3).

E-mail: dzharkov@niboch.nsc.ru

Область научных интересов: репарация ДНК, биокатализ, структурная биология, белковая инженерия, синтетическая биология, геномное редактирование.

А.В.Юдкина (A.V.Yudkina). Кандидат биологических наук, научный сотрудник той же лаборатории (раздел 5.3).

E-mail: ayudkina@niboch.nsc.ru

Область научных интересов: репарация ДНК, репликация ДНК, биокатализ, структурная биология, белковая инженерия.

О.М.Панасенко (O.M.Panasenko). Член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом биофизики ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М.Лопухина ФМБА России (раздел 5.4).

E-mail: o-panas@mail.ru

Область научных интересов: медицинская биофизика, физико-химическая медицина, молекулярная медицина, окислительный и галогенирующий стресс.

А.А.Байков (A.A.Baykov). Доктор химических наук, профессор, заведующий отделом химии белка НИИ ФХБ им. А.Н.Белозерского МГУ (раздел 5.5).

E-mail: baykov@belozersky.msu.ru

Область научных интересов: энзимология, химия белка, мембранный транспорт.

П.Массон (P.Masson). Доктор фармацевтических наук (State Doctorate in Pharmaceutical Sciences), член-корреспондент Национальной академии медицины Парижа, действительный член Национальной фармацевтической академии, главный научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории «OpenLab Биохимическая нейрофармакология» ИФМиБ К(П)ФУ (раздел 5.7).

E-mail: pum.masson@free.fr; PMasson@kpfu.ru

Область научных интересов: структуры холинэстераз и молекулярные механизмы катализа и ингибирования, мутанты холинэстераз, гидролизующие фосфорорганические соединения, параоксоназа, фосфотриэстеразы, профилактическое и пост-контактное лечение отравлений фосфорорганическими соединениями, лечение болезни Альцгеймера и нервно-мышечных заболеваний.

Т.Н.Паширова (T.N.Pashirova). Кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории фосфорсодержащих аналогов природных соединений ИОФХ КазНЦ РАН (раздел 5.7).

E-mail: tatyana_pashirova@mail.ru

Область научных интересов: супрамолекулярная химия, адресные системы доставки, липидные наночастицы, липосомы, нанореакторы, поверхностно-активные вещества, мицеллярный катализ.

З.М.Шайхутдинова (Z.M.Shaihutdinova). Младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории «OpenLab Биохимическая нейрофармакология» ИФМиБ К(П)ФУ (раздел 5.7).

E-mail: shaihutdinova.z@mail.ru

Область научных интересов: кинетика ферментативных реакций, биохимия, нанореакторы.

Е.В.Попова (E.V.Popova). Кандидат химических наук, младший научный сотрудник химического факультета МГУ (раздел 5.8).

E-mail: popova.ekaterina1995@gmail.com

Область научных интересов: неорганические наночастицы, наночастицы на основе хитозана, глазные лекарственные формы.

В.Е.Тихомирова (V.E.Tikhomirova). Кандидат химических наук, научный сотрудник того же факультета (раздел 5.8).

E-mail: vetikhomirova@gmail.com

Область научных интересов: биокатализ, глазные лекарственные формы, наночастицы для доставки активных компонентов в растения, спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния.

О.А.Кост (O.A.Kost). Кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник того же факультета (раздел 5.8).

E-mail: olga.a.kost@gmail.com

Область научных интересов: биокатализ, механизм действия ангиотензин-превращающего фермента, обнаружение и характеристика ангиотензин-превращающего фермента при развитии заболеваний, глазные лекарственные формы, наночастицы для доставки активных компонентов в растения.

Е.В.Кудряшова (E.V.Kudryashova). Доктор химических наук, профессор того же факультета (раздел 5.9).

E-mail: HelenaKoudriachova@hotmail.com

Область научных интересов: биокатализ, фитофармацевтические свойства, стабилизированные ферменты, нанобиоматериалы, спектроскопические методы анализа.

Н.В.Добрякова (N.V.Dobryakova). Аспирант того же факультета (раздел 5.9).

E-mail: natdobryak@gmail.com

Область научных интересов: биокатализ, стабилизированные ферменты, нанобиоматериалы, спектроскопические методы анализа биоматериалов.

Н.Л.Клячко (N.L.Klyachko). Доктор химических наук, профессор, заведующая кафедрой химической энзимологии химического факультета МГУ (раздел 5.10).

E-mail: nklyachko@gmail.com

Область научных интересов: ферменты и их регуляция, бионаноматериалы, мицеллярная энзимология, структура и стабильность биомолекул, магнитные наночастицы, низкочастотное негравитационное магнитное поле, лекарственные средства и носители для доставки.

М.М.Веселов (M.M.Veselov). Кандидат химических наук, младший научный сотрудник лаборатории химического дизайна бионаноматериалов того же факультета (раздел 5.10).

E-mail: veselov.mac@gmail.com

Область научных интересов: магнитные наночастицы, магнитное поле, иммобилизованные ферменты, регуляция свойств ферментов.

А.В.Лопухов (A.V.Lopukhov). Кандидат химических наук, старший преподаватель того же факультета (раздел 5.10).

E-mail: lopukhov@enzyme.chem.msu.ru

Область научных интересов: химический дизайн бионаноматериалов, адресная доставка лекарств.

И.М.Ле-Дейген (I.M.Le-Deygen). Кандидат химических наук, доцент того же факультета (раздел 5.10).

E-mail: Le-deygenIM@my.msu.ru

Область научных интересов: ИК-спектроскопия Фурье, липидные везикулы, системы доставки лекарств.

А.Д.Усвалиев (A.D.Usvaliev). Ведущий инженер лаборатории химического дизайна бионаноматериалов того же факультета (раздел 5.10).

E-mail: azximik@gmail.com

Область научных интересов: разработка и создание бионаносистем на основе магнитных наночастиц, ПЦР в реальном времени.

Ю.В.Чудосай (Yu.V.Chudosai). Ведущий инженер той же лаборатории (раздел 5.10).

E-mail: chudosay@gmail.com

Область научных интересов: энзимология и дизайн бионаноматериалов для биомедицины.

Н.Л.Еремеев (N.L.Eremeev). Доктор химических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории мицеллярной энзимологии химического факультета МГУ (раздел 5.10).

E-mail: nleremeev@gmail.com

Область научных интересов: биокатализ, кинетика ферментативных реакций, биотехнология.

М.Э.Зверева (M.E.Zvereva). Доктор химических наук, профессор лаборатории химии нуклеопротеидов того же факультета (раздел 6.1).

E-mail: maria.i.zvereva@yandex.ru

Область научных интересов: ДНК-оперирующие ферменты, ДНК-нанотехнология, аптамеры, онкогенез, молекулярная онкология, мутации, теломеразы, теломеры, квадруплексы, нуклеиновые кислоты, рибонуклеопротеиды, внеклеточные НК, методы анализа НК, секвенирование.

М.Ю.Рубцова (M.Yu.Rubtsova). Кандидат химических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории инженерной энзимологии того же факультета (раздел 6.2).

E-mail: myr@enz.chem.msu.ru

Область научных интересов: энзимология, аналитическая биотехнология, биочипы, нанобиосенсоры, антибиотикорезистентность.

М.М.Уляшова (M.M.Ulyashova). Кандидат химических наук, научный сотрудник той же лаборатории (раздел 6.2).

E-mail: mmu@enzyme.chem.msu.ru

Область научных интересов: энзимология, аналитическая биотехнология, биочипы, нанобиосенсоры, антибиотикорезистентность.

Г.В.Преснова (G.V.Presnova). Кандидат химических наук, старший научный сотрудник той же лаборатории (раздел 6.2).

E-mail: gkovba@enzyme.chem.msu.ru

Область научных интересов: энзимология, аналитическая биотехнология, биочипы, нанобиосенсоры, антибиотикорезистентность.

Л.В.Сиголаева (L.V.Sigolaeva). Кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории постгеномной химии кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ (раздел 6.3).

E-mail: lsigolaeva@genebee.msu.ru

Область научных интересов: биосенсоры, модификация поверхности, тонкие пленки, адсорбция, ферменты, белки, полимеры, полиэлектролиты, углеродные наноматериалы, наночастицы металлов, нанокompозиты.

Д.В.Пергушов (D.V.Pergushov). Кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории полиэлектролитов и биополимеров кафедры высокомолекулярных соединений того же факультета (раздел 6.3).

E-mail: pergush@genebee.msu.ru

Область научных интересов: полиэлектролиты, полиэлектролитные комплексы, интерполиэлектролитные реакции, адсорбция полиэлектролитов, полиэлектролитные мультислои, ионогенные со- и терполимеры, ионогенные микрогели, самоорганизация макромолекул, наночастицы, биосенсоры.

И.Н.Курочкин (I.N.Kurochkin). Доктор химических наук, профессор, директор ИБХФ РАН, заведующий лабораторией кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ (раздел 6.4).

E-mail: inkurochkin@gmail.com

Область научных интересов: биоаналитические системы, спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния, электрохимические биосенсоры, нанофотоника

Е.Г.Евтушенко (E.G.Evtushenko). Младший научный сотрудник кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, научный сотрудник ИБХФ РАН (раздел 6.4).

E-mail: evtushenko@enzyme.chem.msu.ru

Область научных интересов: биоаналитические системы, спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния.

И.А.Богинская (I.A.Boginskaya). Кандидат технических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории нанотехнологии композиционных материалов и тонкопленочных структур ИТПЭ РАН (раздел 6.4).

E-mail: i.boginskaya@bk.ru

Ю.Ю.Звягина (Yu.Yu.Zvyagina). Аспирант, инженер той же лаборатории (раздел 6.4).

E-mail: jul-zvyagina@inbox.ru

Область научных интересов: спектроскопия комбинационного рассеяния.

Е.А.Слипченко (E.A.Slipchenko). Инженер той же лаборатории (раздел 6.4).

E-mail: slipchenko-katya@mail.ru

Область научных интересов: спектроскопия комбинационного рассеяния.

О.В.Крюкова (O.V.Kryukova). Кандидат химических наук, научный сотрудник химического факультета МГУ (раздел 6.4).

E-mail: so.b1londe@gmail.com

Область научных интересов: биокатализ, ангиотензинпревращающий фермент, моноклональные антитела, спектры ГКР.

М.В.Седова (M.V.Sedova). Кандидат технических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории нанотехнологии композиционных материалов и тонкопленочных структур ИТПЭ (раздел 6.4).

E-mail: sedova_marina@mail.ru

Область научных интересов: спектроскопия комбинационного рассеяния.

И.А.Рыжиков (I.A.Ryzhikov). Кандидат технических наук, доцент, заведующий лабораторией нанотехнологии композиционных материалов и тонкопленочных структур ИТПЭ и лабораторией НОЦ ФМН – МГТУ им. Н.Э.Баумана (раздел 6.4).

E-mail: nanocom@yandex.ru

Область научных интересов: спектроскопия комбинационного рассеяния.

В.В.Шумянцева (V.V.Shumyantseva). Доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией биоэлектрохимии ИБМХ (раздел 6.5).

E-mail: viktorina.shumyantseva@ibmc.msk.ru

Область научных интересов: биокатализ, биоэлектрохимия.

П.И.Королёва (P.I.Koroleva). Младший научный сотрудник той же лаборатории (раздел 6.5).

E-mail: polinakoroleva1996@gmail.com

Область научных интересов: биокатализ, биоэлектрохимия.

Т.В.Булко (T.V.Bulko). Научный сотрудник той же лаборатории (раздел 6.5).

E-mail: tanyabulko@mail.ru

Область научных интересов: биокатализ, биоэлектрохимия.

Л.Е.Агафонова (L.E.Agafonova). Кандидат химических наук, научный сотрудник той же лаборатории (раздел 6.5).

E-mail: agafonovaluba@mail.ru

Область научных интересов: электрохимия, биокатализ, биоэлектрохимия.

Р.А.Масампех (R.A.Masamreh). Кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии медико-биологического факультета РНИМУ (раздел 6.5).

E-mail: rami.masamreh@yandex.ru

Область научных интересов: аналитическая химия, биокатализ, биоэлектрохимия.

Т.А.Филиппова (T.A.Filippova). Младший научный сотрудник лаборатории биоэлектрохимии ИБМХ (раздел 6.5).

E-mail: lipivif@gmail.com

Область научных интересов: биокатализ, биоэлектрохимия, протеазы.

А.В.Кузиков (A.V.Kuzikov). Кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии медико-биологического факультета РНИМУ (раздел 6.5).

E-mail: alexeykuzikov@gmail.com

Область научных интересов: аналитическая химия, биокатализ, биоэлектрохимия.

А.П.Савицкий (A.P.Savitsky). Доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник и заведующий лабораторией физической биохимии ФИЦ Биотехнологии РАН (раздел 6.6).

E-mail: apsavitsky@inbi.ras.ru

Область научных интересов: молекулярная визуализация, флуоресцентная микроскопия, флуоресцентная спектроскопия биологических молекул, GFP-подобные цветные флуоресцентные белки, флуоресцентная томография, фотодинамическая терапия опухолей, антибактериальная фотодинамическая терапия, аналитическая биохимия, неонатальный скрининг и пренатальная диагностика, белковая инженерия, иммунохимия, энзимология, химия биоконъюгатов, биосенсоры, клеточная биология.

М.О.Шлеева (M.O.Shleeva). Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник и заведующая лабораторией биохимии стрессов микроорганизмов ФИЦ Биотехнологии РАН (раздел 6.6).

E-mail: mshleeva@inbi.ras.ru

Область научных интересов: микобактерии, латентный туберкулез, порфирины, стимуляторы роста бактерий, пептидные антибиотики, функции белков, антибактериальная фотодинамическая терапия, энзимология, микобактериофаги, химия биоконъюгатов, биосенсоры, макрофаги.

И.Д.Соловьев (I.D.Solovyev). Кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории физической биохимии ФИЦ Биотехнологии РАН (раздел 6.6).

E-mail: i.solovyev@fbras.ru

Область научных интересов: флуоресцентная микроскопия, флуоресцентная спектроскопия биологических молекул, GFP-подобные цветные флуоресцентные белки, флуоресцентная томография, антибактериальная фотодинамическая терапия.

Н.К.Марынич (N.K.Marynich). Младший научный сотрудник той же лаборатории (раздел 6.6).

E-mail: marynich_n@mail.ru

Область научных интересов: молекулярная визуализация, флуоресцентная микроскопия, флуоресцентная спектроскопия биологических молекул, GFP-подобные цветные флуоресцентные белки, аналитическая биохимия, неонатальный скрининг и пренатальная диагностика, белковая инженерия, биосенсоры, клеточная биология.

11. Литература

1. S.D.Varfolomeev. *Biophysics*, **67**, 499 (2022); <https://doi.org/10.1134/S0006350922040212>
2. *Our Dear Ilya Vasilyevich Berezin*. (Eds N.N.Ugarova, E.N.Efremenko). (Moscow: Publishing house 'Scientific library', 2023); <https://doi.org/10.36871/978-5-907672-36-9>
3. *Half a Century with Chemical Enzymology*. (Eds N.N.Ugarova, E.N.Efremenko). (Moscow: Publishing house 'Scientific library', 2024); <https://doi.org/10.36871/978-5-907823-50-1>
4. *Иммобилизованные ферменты: Современное состояние и перспективы*. В 2-х тт. (Под ред. И.В.Березина, К.Мартинек, В.К.Антонова). (Москва: Изд-во МГУ, 1976)
5. К.Мартинек, И.В.Березин. *Russ. Chem. Rev.*, **49**, 385 (1980) [К.Мартинек, И.В.Березин. *Успехи химии*, **49**, 737 (1980)]; <https://doi.org/10.1070/RC1980v049n05ABEH002466>
6. С.Д.Варфоломеев, К.Г.Гуревич. *Биокинетика. Практический курс*. (Учебное пособие). (Москва: Изд-во Фаир-Пресс, 1999)
7. М.В.Гернет, А.М.Егоров, Т.В.Авилова, А.П.Осипов, В.К.Швядас, А.Л.Марголин, А.Н.Семенов, В.И.Яковлева, Л.С.Губницкий. *Введение в прикладную энзимологию. Иммобилизованные ферменты*. (Учебное пособие). (Под ред. И.В.Березина, К.Мартинек). (Москва: Изд-во МГУ, 1982)
8. С.Д.Варфоломеев, С.В.Зайцев. *Кинетические методы в биохимических исследованиях*. (Москва: Изд-во МГУ, 1982)
9. А.К.Яцимирский, С.Д.Варфоломеев, А.Н.Семёнов, Н.И.Ларионова, В.П.Торчилин, Н.Н.Угарова, Л.Ю.Бровко, А.А.Клёсов, Ю.Лаш, Л.В.Козлов, Л.Я.Бессмертная, В.К.Антонов, П.Чаупек, В.Йирку, Й.Калал, В.Кубанек, Л.Куниак, Й.Пешка, Л.Рексова, Й.Штамберг, Ф.Швец, Я.Туркова, В.Веруович, Й.Земек. *Химическая энзимология*. (Москва: Изд-во МГУ, 1983)
10. И.В.Березин, В.И.Кузнецов, С.Д.Варфоломеев, Т.А.Осипова, А.П.Осипов. *Биокатализ: История моделирования опыта живой природы*. (Москва: Наука, 1984)
11. И.В.Березин, Н.Л.Клячко, А.В.Левашов, К.Мартинек, В.В.Можаяев, Ю.Л.Хмельницкий. *Серия: Биотехнология, книга 7. Иммобилизованные ферменты*. (Учебное пособие). (Москва: Высшая школа, 1987)
12. И.В.Березин, А.А.Клесов, В.К.Швядас, Н.Н.Угарова, С.Д.Варфоломеев, А.И.Ярополов, Н.Ф.Казанская, А.М.Егоров. *Серия: Биотехнология, книга 8. Инженерная энзимология*. (Учебное пособие). (Москва: Высшая школа, 1987)
13. E.L.Bell, W.Finnigan, S.P.France, A.P.Green, M.A.Hayes, L.J.Hepworth, S.L.Lovelock, H.Niikura, S.Osuna, E.Romero, K.S.Ryan, N.J.Turner, S.L.Flitsch. *Nat. Rev. Methods Primers*, **1**, 46 (2021); <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00044-z>
14. S.P.France, R.D.Lewis, C.A.Martinez. *JACS Au*, **3**, 715 (2023); <https://doi.org/10.1021/jacsau.2c00712>
15. P.Intasian, K.Prakinee, A.Phintha, D.Trisirivirat, N.Weeranoppanant, T.Wongnate, P.Chaiyen. *Chem. Rev.*, **121**, 10367 (2021); <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00121>
16. K.Nam, Y.Shao, D.T.Major, M.Wolf-Watz. *ACS Omega*, **9**, 7393 (2024); <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c09084>
17. K.Crampon, A.Giorkallos, M.Deldossi, S.Baud, L.A.Steffenel. *Drug Discov. Today*, **27**, 151 (2022); <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.09.007>
18. P.T.Anastas, J.C.Warner. *Green Chemistry: Theory and Practice*. (Oxford: Oxford University Press, 2000); <https://doi.org/10.1093/oso/9780198506980.001.0001>
19. T.Keijer, V.Bakker, J.C.Slootweg. *Nat. Chem.*, **11**, 190 (2019); <https://doi.org/10.1038/s41557-019-0226-9>
20. R.Sheldon. *Green Chem.*, **18**, 3180 (2016); <https://doi.org/10.1039/c6gc90040b>
21. *United Nations, Transforming Our World. The 2030 Agenda for Sustainable Development*. (New York, 2015); <https://sdgs.un.org/es/goals> (дата доступа 05.10.2024)
22. P.Lozano, E.Garcia-Verdugo. *Green Chem.*, **25**, 7041 (2023); <https://doi.org/10.1039/D3GC01878D>
23. R.A.Sheldon. *Green Chem.*, **25**, 1704 (2023); <https://doi.org/10.1039/d2gc04747k>
24. D.J.C.Constable, P.J.Dunn, J.D.Hayler, G.R.Humphrey, J.L.Leazer Jr., R.J.Linderman, K.Lorenz, J.Manley, B.A.Pearlman, A.Wells, A.Zaks, T.Y.Zhang. *Green Chem.*, **9**, 411 (2007); <https://doi.org/10.1039/B703488C>
25. J.S.Carey, D.Laffan, C.Thomson, M.T.Williams. *Org. Biomol. Chem.*, **4**, 2337 (2006); <https://doi.org/10.1039/B602413K>
26. M.C.Bryan, P.J.Dunn, D.Entwistle, F.Gallou, S.G.Koenig, J.D.Hayler, M.R.Hickey, S.Hughes, M.E.Kopach, G.Moine, P.Richardson, F.Roschangar, A.Steven, F.J.Weiberth. *Green Chem.*, **20**, 5082 (2018); <https://doi.org/10.1039/C8GC01276H>
27. A.Zaks, A.M.Klibanov. *Science*, **224**, 1249 (1984); <https://doi.org/10.1126/science.6729453>
28. H.Gröger, F.Gallou, B.H.Lipshutz. *Chem. Rev.*, **123**, 5262 (2023); <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00416>
29. H.Terholsen, S.Schmidt. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **85**, 103058 (2024); <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2023.103058>
30. J.Carceller, K.Arias, M.Climont, S.Iborra, A.Corma. *Chem. Soc. Rev.*, **53**, 7875 (2024); <https://doi.org/10.1039/D3CS00595J>
31. *Industrial Enzymes Market by Type (Carbohydrases, Proteases, Lipases, Polymerases & Nucleases), Application (Food & Beverages, Bioethanol, Feed, Detergents, Wastewater, Soil, and Oil Treatment), Source, Formulation and Region – Global Forecast to 2029*. Top Market Reports; 2023; <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/industrial-enzymes-market-237327836.html> (дата доступа 05.10.2024)
32. *Global Enzymes Market by Source (Animals, Plants and Microorganisms), by Type (Protease, Carbohydrase, Lipase, Polymerase and Nuclease and Other Types), by Reaction Type (Transferase, Lyase, Hydrolase, Oxidoreductase and Other Reaction Types), by Application (Household Care, Bioenergy, Pharmaceutical and Biotechnology, Food & Beverages, Feed and Other Applications), by Regional Outlook, Industry Analysis Report and Forecast, 2021–2027*. Enzyme Market Reports; 2021; <https://www.kbvresearch.com/enzymes-market/> (дата доступа 05.10.2024)
33. S.Gurkok. *Int. J. Sci. Eng. Res.*, **10** (9), 75 (2019)
34. Е.А.Агафонова, Е.В.Шейда, О.В.Кван. *Животноводство и кормопроизводство*, **106**, 132 (2023); <https://doi.org/10.33284/2658-3135-106-1-132>
35. B.Galani, J.Chauhan, S.Gohel. *Trends Hortic*, **7**, 4902 (2024); <https://doi.org/10.24294/th.v7i2.4902>
36. S.U.Pathan, A.Kharwar, M.A.Ibrahim, S.B.Singh, P.Bajaj. *Bioanalysis*, **16**, 485 (2024); <https://doi.org/10.4155/bio-2023-0207>
37. G.Meghwanshi, N.Kaur, S.Verma, D.Swati, N.Dabi, A.Vashishtha, P.Charan, P.Purohit, H.S.Bhandari, N.Bhojak, R.Kumar. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **67**, 586 (2020); <https://doi.org/10.1002/bab.1919>
38. D.S.Kocabaş, R.Grument. *GM Crops Food*, **10**, 191 (2019); <https://doi.org/10.1080/21645698.2019.1649531>
39. U.Khan, Z.Selamoglu. *Arch. Razi Inst.*, **75**, 131 (2020); <https://doi.org/10.22092/ari.2019.126286.1341>
40. S.A.Pullano, M.Greco, M.G.Bianco, D.Foti, A.Brunetti, A.S.Fiorillo. *Theranostics*, **12**, 493 (2022); <https://doi.org/10.7150/thno.64035>

41. *Chemical Catalyst Market, By Type (Homogeneous, Heterogeneous, Heterogenized Homogeneous Catalyst, Biocatalyst), By Application (Petroleum Refining, Chemical Synthesis, Environmental, Others), By Region Forecast to 2030*. Report ID: ER_001503 (2022); <https://www.emergenresearch.com/industry-report/chemical-catalyst-market> (дата доступа 05.10.2024)
42. D.A.Suplatov, K.E.Kopylov, N.N.Popova, V.V.Voevodin, V.K.Švedas. *Bioinformatics*, **34**, 1583 (2018); <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx831>
43. D.A.Suplatov, V.K.Švedas. *Acta Naturae*, **7** (4), 36 (2015) [*Acta Naturae*, **7** (4), 39 (2015)]
44. D.Suplatov, Y.Sharapova, D.Timonina, K.Kopylov, V.Švedas. *J. Bioinform. Comput. Biol.*, **16**, 1840005 (2018); <https://doi.org/10.1142/S021972001840005X>
45. D.A.Suplatov, V.K.Arzhaniuk, V.K.Švedas. *Acta Naturae*, **3** (1), 93 (2011) [*Acta Naturae*, **3** (1), 99 (2011)]
46. S.D.Varfolomeev, I.Gariev, I.Uporov. *Russ. Chem. Rev.*, **74**, 61 (2005) [С.Д.Варфоломеев, И.Гариев, И.Упоров. *Успехи химии*, **74**, 67 (2005)]; <https://doi.org/10.1070/RC2005v074n01ABEH001159>
47. D.Suplatov, D.Shalaeva, E.Kirilin, V.Arzhaniuk, V.K.Švedas. *J. Biomol. Struct. Dynam.*, **32**, 75 (2014); <https://doi.org/10.1080/07391102.2012.750249>
48. D.Suplatov, E.Kirilin, V.Takhaviev, V.K.Švedas. *J. Biomol. Struct. Dynam.*, **32**, 1752 (2014); <https://doi.org/10.1080/07391102.2013.834514>
49. D.Suplatov, Y.Sharapova, E.Gerasova, V.Švedas. *Nucleic Acids Res.*, **48**, W65 (2020); <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa276>
50. D.Suplatov, K.Kopylov, Y.Sharapova, V.Švedas. *J. Biomol. Struct. Dynam.*, **37**, 2049 (2019); <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1475260>
51. D.D.Podshivalov, E.M.Kirilin, S.I.Konnov, V.K.Švedas. *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 499 (2020) [*Биохимия*, **85**, 578 (2020)]; <https://doi.org/10.1134/S0006297920040100>
52. D.Timonina, Y.Sharapova, V.Švedas, D.Suplatov. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **19**, 1302 (2021); <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.02.005>
53. D.Suplatov, D.Timonina, Y.Sharapova, V.Švedas. *Nucleic Acids Res.*, **47**, W308 (2019); <https://doi.org/10.1093/nar/gkz385>
54. I.V.Gushchina, A.M.Polenova, D.A.Suplatov, V.K.Švedas, D.K.Nilov. *J. Chem. Inform. Model.*, **60**, 3692 (2020); <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c00303>
55. D.A.Suplatov, V.V.Voevodin, V.K.Švedas. *Biotechnol. J.*, **10**, 344 (2015); <https://doi.org/10.1002/biot.201400150>
56. T.A.Shcherbakova, N.V.Panin, D.A.Suplatov. I.V.Shapovalova, V.K.Švedas. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **112**, 66 (2015); <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.11.015>
57. D.Suplatov, N.Panin, E.Kirilin, T.Shcherbakova, P.Kudryavtsev, V.Švedas. *PLOS ONE*, **9**, e100643 (2014); <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100643>
58. D.A.Suplatov, W.Besnmatter, V.K.Švedas, A.Svendsen. *Prot. Eng. Des. Sel.*, **25**, 689 (2012); <https://doi.org/10.1093/protein/gzs068>
59. I.G.Khaliullin, D.A.Suplatov, D.N.Shalaeva, M.Otsuka, Y.Asano, V.K.Švedas. *Acta Naturae*, **2** (2), 66 (2010) [*Acta Naturae*, **2** (2), 70 (2010)]
60. K.Fesko, D.Suplatov, V.Švedas. *FEBS Open Bio*, **8**, 1013 (2018); <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12441>
61. Y.Sharapova, D.Suplatov, V.Švedas. *FEBS J.*, **285**, 2428 (2018); <https://doi.org/10.1111/febs.14486>
62. D.Suplatov, E.Kirilin, M.Arbaitsky, V.Takhaviev, V.Švedas. *Nucleic Acids Res.*, **42**, W344 (2014); <https://doi.org/10.1093/nar/gku448>
63. S.Evteev, D.Nilov, A.Polenova, V.Švedas. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 1 (2021); <https://doi.org/10.3390/ijms222313112>
64. D.K.Nilov, M.Schmidtke, V.A.Makarov, V.K.Švedas. *Supercomp. Front. Innov.*, **9**, 79 (2022); <https://doi.org/10.14529/jsfi220207>
65. Y.A.Sharapova, V.K.Švedas. *Mosc. Univ. Chem. Bull.*, **73**, 205 (2018) [*Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*, **59**, 323 (2018)]; <https://doi.org/10.3103/S0027131418050097>
66. I.V.Gushchina, D.K.Nilov, T.A.Shcherbakova, S.M.Baldin, V.K.Švedas. *Acta Naturae*, **15** (2), 81 (2023) [*Acta Naturae*, **15** (2), 81 (2023)]; <https://doi.org/10.32607/actanaturae.15709>
67. Патент РФ 2703465 (2019)
68. S.M.Baldin, V.O.Shegolev, V.K.Švedas. *Supercomp. Front. Innov.*, **9**, 72 (2022); <https://doi.org/10.14529/jsfi220305>
69. Патент РФ 2661151 (2018)
70. V.V.Voevodin, A.Antonov, D.Nikitenko, P.Schvets, S.Sobolev, I.Sidorov, K.Stefanov, S.Zhumatiy. *Supercomp. Front. Innov.*, **8**, 4 (2011)
71. H.M.Senn, W.Thiel. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **48**, 1198 (2009); <https://doi.org/10.1002/anie.200802019>
72. S.D.Varfolomeev, S.V.Lushchekina, A.V.Nemukhin, A.M.Kulakova, E.D.Kots, G.F.Makhaeva, E.Delacour, O.Lockridge, P.Masson. *Russ. Chem. Bull.*, **65**, 1592 (2016) [*Изв. АН. Сер. хим.*, 1592 (2016)]; <https://doi.org/10.1007/s11172-016-1487-8>
73. T.Vasilevskaya, M.G.Khrenova, A.V.Nemukhin, W.Thiel. *J. Comput. Chem.*, **37**, 1801 (2016); <https://doi.org/10.1002/jcc.24395>
74. E.Kots, M.Khrenova, S.Lushchekina, S.Varfolomeev, B.Grigorenko, A.Nemukhin. *J. Phys. Chem. B*, **120**, 4221 (2016); <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b02542>
75. S.D.Varfolomeev, E.D.Kots, M.G.Khrenova, S.V.Lushchekina, A.V.Nemukhin. *Dokl. Phys. Chem.*, **474** (Pt 2), 89 (2017) [*Докл. АН*, **474**, 444 (2017)]; <https://doi.org/10.1134/S0012501617060045>
76. B.L.Grigorenko, A.I.Krylov, A.V.Nemukhin. *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 10239 (2017); <https://doi.org/10.1021/jacs.7b00676>
77. A.V.Krivitskaya, M.G.Khrenova. *J. Chem. Inform. Model.*, **62**, 6519 (2022); <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.2c00539>
78. B.L.Grigorenko, I.V.Polyakov, A.V.Nemukhin. *J. Phys. Chem. B*, **124**, 451 (2020); <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b07349>
79. M.G.Khrenova, B.L.Grigorenko, A.V.Nemukhin. *ACS Catal.*, **11**, 8985 (2021); <https://doi.org/10.1021/acscatal.1c00582>
80. B.L.Grigorenko, I.V.Polyakov, A.I.Krylov, A.V.Nemukhin. *J. Phys. Chem. B*, **123**, 8901 (2019); <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b06988>
81. I.V.Polyakov, M.G.Khrenova, B.L.Grigorenko, A.V.Nemukhin. *Mendeleev Commun.*, **32**, 739 (2022); <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2022.11.010>
82. A.V.Krivitskaya, M.G.Khrenova, A.V.Nemukhin. *Molecules*, **20**, 6280 (2021); <https://doi.org/10.3390/molecules26072026>
83. S.D.Varfolomeev, N.A.Semenova, V.I.Bykov, S.B.Tsybenova. *Dokl. Phys. Chem.*, **484**, 23 (2019) [*Докл. АН*, **484**, 441 (2019)]; <https://doi.org/10.1134/S0012501619020039>
84. S.D.Varfolomeev, N.A.Semenova, M.V.Ublinsky, V.I.Bykov, S.B.Tsybenova. *Chem. Phys. Lett.*, **729**, 84 (2019); <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2019.05.033>
85. S.D.Varfolomeev, V.I.Bykov, N.A.Semenova, S.B.Tsybenova. *ACS Chem. Neurosci.*, **12**, 2202 (2021); <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.9b00671>
86. A.F.T.Arnsten, M.Wang. *Am. J. Psychiatry*, **177**, 1103 (2020); <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2020.20101458>
87. M.Khrenova, E.Kots, S.Varfolomeev, S.Lushchekina, A.Nemukhin. *J. Phys. Chem. B*, **121**, 9389 (2017); <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b08759>
88. E.D.Kots, M.G.Khrenova, A.V.Nemukhin, S.D.Varfolomeev. *Russ. Chem. Rev.*, **88**, 1 (2019) [Е.Д.Коц, М.Г.Хренова, А.В.Немукхин, С.Д.Варфоломеев. *Успехи химии*, **88**, 1 (2019)]; <https://doi.org/10.1070/RCR4842>
89. M.G.Khrenova, V.G.Tsirelson, A.V.Nemukhin. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **22**, 19069 (2020); <https://doi.org/10.1039/D0CP03560B>
90. M.G.Khrenova, A.V.Nemukhin, V.G.Tsirelson. *Mendeleev Commun.*, **30**, 583 (2020); <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2020.09.010>

91. A.V.Krivitskaya, M.G.Khrenova. *Russ. Chem. Bull.*, **71**, 915 (2022) [*Изв. АН. Сер. хим.*, 915 (2022)]; <https://doi.org/10.1007/s11172-022-3490-6>
92. A.V.Krivitskaya, M.G.Khrenova. *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 176 (2022); <https://doi.org/10.3390/ijms24010176>
93. S.Burton, D.A.Cowan, J.M.Woodley. *Nat. Biotechnol.*, **20**, 35 (2002); <https://doi.org/10.1038/nbt0102-37>
94. V.I.Tishkov, A.A.Pometun, S.S.Savin. *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **78**, 151 (2023) [*Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*, **64**, 289 (2023)]; <https://doi.org/10.3103/S0027131423040077>
95. A.Andreadeli, D.Platis, V.Tishkov, V.Popov, N.E.Labrou. *FEBS J.*, **275**, 3859 (2008); <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06533.x>
96. S.S.Savin, V.I.Tishkov. *Acta Naturae*, **2** (1), 97 (2010) [*Acta Naturae*, **2** (1), 80 (2010)]; <https://doi.org/10.32607/20758251-2010-2-1-97-101>
97. D.Atroshenko, M.Shelomov, A.Zhgun, D.Avdanina, M.Eldarov, A.Pometun, T.Chubar, S.Savin, V.Tishkov. *FEBS Open Bio*, **8**, 190 (2018); <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12453>
98. V.I.Tishkov, M.D.Shelomov, A.A.Pometun, S.S.Savin, D.L.Atroshenko. *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **78**, 1 (2023); <https://doi.org/10.3103/S0027131423010066> [*Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*, **64**, 72 (2023)]; <https://doi.org/10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-2-72-84>
99. A.A.Pometun, K.M.Boyko, T.S.Yurchenko, A.Yu.Nikolaeva, D.L.Atroshenko, S.S.Savin, V.O.Popov, V.I.Tishkov. *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 689 (2020); <https://doi.org/10.1134/S0006297920060061> [*Биохимия*, **85**, 807 (2020)]; <https://doi.org/10.31857/S0320972520060068>
100. D.L.Atroshenko, D.I.Golovina, E.P.Sergeev, M.D.Shelomov, A.G.Elcheninov, I.N.Kublanov, T.A.Chubar, A.A.Pometun, S.S.Savin, V.I.Tishkov. *Acta Naturae*, **14** (1), 57 (2022) [*Acta Naturae*, **14** (1), 57 (2022)]; <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11812>
101. Патент РФ 2803295 (2023)
102. A.A.Pometun, A.A.Shirokova, N.P.Galanicheva, L.A.Shaposhnikov, D.L.Atroshenko, E.V.Pometun, V.I.Tishkov, S.S.Savin. *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **78**, 20 (2023); <https://doi.org/10.3103/S0027131423010042> [*Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*, **64**, 99 (2023)]; <https://doi.org/10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-2-99-111>
103. D.L.Atroshenko, M.D.Shelomov, S.A.Zarubina, I.V.Golubev, S.S.Savin, V.I.Tishkov. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 4412 (2019); <https://doi.org/10.3390/ijms20184412>
104. A.Poloznikov, G.Zakharova, T.Chubar, V.Tishkov, I.Gazaryan. *Biochimie*, **115**, 71 (2015); <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.04.021>
105. V.I.Tishkov, S.S.Savin, A.S.Yasnaya. *Acta Naturae*, **2** (3), 82 (2010) [*Acta Naturae*, **2** (3), 27 (2010)]; <https://doi.org/10.32607/20758251-2010-2-3-47-61>
106. A.V.Sklyarenko, O.V.Berezina, D.E.Satarova, V.V.Fedorchuk, E.A.Fedorchuk, S.S.Savin, S.V.Yarotsky, V.I.Tishkov. *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **69**, 63 (2014) [*Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*, **55**, 86 (2014)]; <https://doi.org/10.3103/S0027131414020084>
107. P.D.Parshin, A.A.Pometun, U.A.Martysuk, S.Yu.Kleymentov, D.L.Atroshenko, E.V.Pometun, S.S.Savin, V.I.Tishkov. *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 575 (2020); [*Биохимия*, **85**, 673 (2020)]; <https://doi.org/10.1134/S0006297920050065>
108. A.A.Pometun, L.A.Shaposhnikov, S.A.Zubanova, R.P.Kovalevskii, D.L.Atroshenko, E.V.Pometun, S.S.Savin, V.I.Tishkov. *Biochemistry (Moscow)*, **88**, 1378 (2023); <https://doi.org/10.1134/S0006297923090171>
109. G.O.Ndochinwa, Q.Y.Wang, N.O.Okoro, O.C.Amadi, N.N.Nwagu, C.I.Nnamchi, A.N.Moneke, A.S.Odiba. *Open Life Sci.*, **19**, 20220856 (2024); <https://doi.org/10.1515/biol-2022-0856>
110. A.Kokorin, P.D.Parshin, P.J.Bakkes, A.A.Pometun, V.I.Tishkov, V.B.Urlacher. *Sci. Rep.*, **11**, 21706 (2021); <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00957-5>
111. E.Lio, P.Parshin, E.D'Oronzio, S.Plebani, A.A.Pometun, S.Yu.Kleymentov, V.I.Tishkov, F.Secundo. *Int. J. Biol. Macromol.*, **253**, 126637 (2023); <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126637>
112. N.N.Ugarova, G.Y.Lomakina. In *A Comprehensive Guide to Chemiluminescence*. (Ed. L.P.Da Silva). (Nova Science Publ., 2019). P. 35
113. N.N.Ugarova, G.Y.Lomakina. *Photochem. Photobiol.*, **100**, 1191 (2024); <https://doi.org/10.1111/php.13909>
114. Y.Modestova, M.I.Koksharov, N.N.Ugarova. *Biochim. Biophys. Acta*, **1864**, 1818 (2016); <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.09.007>
115. M.B.Al-Handawi, S.Polavaram, A.Kurlevskaya, P.Commins, S.Schramm, C.Carrasco-Lopez, N.M.Lui, K.M.Solntsev, S.P.Laptenok, I.Navizet, P.Naumov. *Chem. Rev.*, **122**, 13207 (2022); <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c01047>
116. Y.Modestova, M.I.Koksharov, N.N.Ugarova. *Biochim. Biophys. Acta*, **1844**, 1463 (2014); <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.04.021>
117. N.N.Ugarova, G.Y.Lomakina. *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **75**, 15 (2020) [*Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*, **61**, 19 (2020)]; <https://doi.org/10.3103/S0027131420010113>
118. N.N.Ugarova, L.G.Maloshenok, I.V.Uporov, M.I.Koksharov. *Biochemistry (Moscow)*, **70**, 1262 (2005) [*Биохимия*, **70**, 1534 (2005)]; <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0257-2>
119. M.I.Koksharov, N.N.Ugarova. *Prot. Engin. Des. Sel.*, **24**, 835 (2011); <https://doi.org/10.1093/protein/gzr044>
120. E.Efremenko, O.Senko, N.Stepanov, O.Maslova, G.Y.Lomakina, N.Ugarova. *Chemosensors*, **10**, 493 (2022); <https://doi.org/10.3390/chemosensors10110493>
121. I.Lyagin, E.Efremenko. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 1761 (2021); <https://doi.org/10.3390/ijms22041761>
122. I.V.Lyagin, E.N.Efremenko, S.D.Varfolomeev. *Russ. Chem. Rev.*, **86**, 339 (2017) [*И.В.Лягин, Е.Н.Ефременко, С.Д.Варфоломеев. Успехи химии*, **86**, 339 (2017)]; <https://doi.org/10.1070/RCR4678>
123. P.Katyal, S.Chu, J.K.Montclare. *Ann. NY Acad. Sci.*, **1480**, 54 (2020); <https://doi.org/10.1111/nyas.14451>
124. S.Zhao, W.Xu, W.Zhang, H.Wu, C.Guang, W.Mu. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **105**, 8241 (2021); <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11633-z>
125. I.Lyagin, E.Efremenko. *Molecules*, **24**, 2362 (2019); <https://doi.org/10.3390/molecules24132362>
126. I.Lyagin, N.Stepanov, O.Maslova, O.Senko, A.Asylanli, E.Efremenko. *Catalysts*, **12**, 1095 (2022); <https://doi.org/10.3390/catal12101095>
127. A.Asylanli, I.Lyagin, E.Efremenko. *Biol. Chem.*, **399**, 869 (2018); <https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0162>
128. I.Lyagin, N.Stepanov, D.Presnov, A.Trifonov, E.Efremenko. *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 1831 (2023); <https://doi.org/10.3390/ijms24031831>
129. E.N.Efremenko, I.V.Lyagin, N.L.Klyachko, T.Bronich, N.V.Zavyalova, Y.Jiang, A.V.Kabanov. *J. Control. Release*, **247**, 175 (2017); <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.12.037>
130. I.Lyagin, O.Maslova, N.Stepanov, E.Efremenko. *Int. J. Biol. Macromol.*, **218**, 866 (2022); <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.179>
131. O.V.Maslova, O.V.Senko, E.N.Efremenko. *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. B*, **12**, 181 (2018); <https://doi.org/10.1134/S1990750818020087>
132. I.Lyagin, N.Stepanov, G.Frolov, E.Efremenko. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 1359 (2022); <https://doi.org/10.3390/ijms23031359>
133. A.Asylanli, M.Domnin, N.Stepanov, E.Efremenko. *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 3566 (2023); <https://doi.org/10.3390/ijms24043566>
134. A.Asylanli, M.Domnin, N.Stepanov, E.Efremenko. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 9400 (2022); <https://doi.org/10.3390/ijms23169400>
135. E.N.Efremenko, I.V.Lyagin, F.M.Plueva, I.Y.Galaev, B.Mattiasson. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **159**, 251 (2009); <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8564-5>

136. E.Efremenko, I.Lyagin, A.Aslanli, N.Stepanov, O.Maslova, O.Senko. *Polymers*, **15**, 591 (2023); <https://doi.org/10.3390/polym15030591>
137. I.Lyagin, E.Efremenko. *Catal. Commun.*, **120**, 91 (2019); <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2018.11.019>
138. G.A.Khoury, R.C.Baliban, C.A.Floudas. *Sci. Rep.*, **1**, 90 (2011); <https://doi.org/10.1038/srep00090>
139. J.Wang, G.Jia, H.Li, S.Yan, J.Qian, X.Guo, G.Li, H.Qi, Z.Zhu, Y.Wu, W.He, W.Niu. *Antioxidants*, **10**, 1488 (2021); <https://doi.org/10.3390/antiox10091488>
140. Z.Cheng, J.Wu, A.Setterdahl, K.Reddie, K.Carroll, L.A.Hammad, J.A.Karty, C.E.Bauer. *Mol. Microbiol.*, **85**, 734 (2012); <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08135.x>
141. T.Arakawa, Y.Kawano, Y.Katayama, H.Nakayama, N.Dohmae, M.Yohda, M.Odaka. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 14838 (2009); <https://doi.org/10.1021/ja903979s>
142. S.A.H.Manage, A.M.Fleming, H.-N.Chen, C.J.Burrows. *ACS Chem. Biol.*, **17**, 2583 (2022); <https://doi.org/10.1021/acscchembio.2c00511>
143. E.V.Schmalhausen, M.V.Medvedeva, M.V.Serebryakova, V.V.Chagovets, V.I.Muronetz. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Sub.*, **1866**, 130032 (2022); <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.130032>
144. Y.-J.Kim, D.Kim, J.L.Illuzzi, S.Delaplane, D.Su, M.Bernier, M.L.Gross, M.M.Georgiadis, D.M.Wilson. *J. Mol. Biol.*, **414**, 313 (2011); <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.10.023>
145. S.Roychoudhury, S.Pramanik, H.L.Harris, M.Tarpley, A.Sarkar, G.Spagnol, P.L.Sorgen, D.Chowdhury, V.Band, D.Klinkebiel, K.K.Bhakat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 11409 (2020); <https://doi.org/10.1073/pnas.1912355117>
146. А.П.Синицын, О.А.Синицына, А.М.Рожкова. *Биотехнология*, **36**, 24 (2020); <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-6-24-41>
147. A.P.Sinitsyn, O.A.Sinitsyna, I.N.Zorov, A.M.Rozhkova. *Appl. Biochem. Microbiol.*, **56**, 634 (2020); <https://doi.org/10.1134/S0003683820060162> [*Прикл. биохим. микробиол.*, **56**, 551 (2020); <https://doi.org/10.31857/S0555109920060161>]
148. A.P.Sinitsyn, O.A.Sinitsyna, I.N.Zorov, A.M.Rozhkova. *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **78**, 170 (2023); <https://doi.org/10.3103/S0027131423040065> [*Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*, **64**, 81 (2023); <https://doi.org/10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-4-312-333>]
149. А.П.Синицын, О.Г.Короткова, Е.А.Рубцова, О.А.Синицына, Е.Г.Кондратьева, А.С.Серед, И.Н.Зоров, А.М.Рожкова. *Биотехнология*, **35**, 6 (2019); <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-4-6-14>
150. N.V.Panin, D.T.Guranda, I.V.Shapovalova, V.K.Švedas. *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **78**, 187 (2023) [*Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*, **64**, 334 (2023)]; <https://doi.org/10.3103/s0027131423040041>
151. N.A.Pchelintsev, M.I.Youshko, V.K.Švedas. *J. Mol. Catal., B: Enzym.*, **56**, 202 (2009); <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.05.006>
152. I.A.Morozova, D.T.Guranda, N.V.Panin, V.K.Švedas. *Acta Naturae*, **15** (1), 69 (2023) [*Acta Naturae*, **15** (1) 69 (2023)]; <https://doi.org/10.32607/actanaturae.13703>
153. J.M.Bolivar, B.Nidetzky. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Proteins Proteomics*, **1868**, 140333 (2020); <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140333>
154. M.F.Mojica, M.-A.Rossi, A.J.Vila, R.A.Bonomo. *Lancet Infect. Dis.*, **22**, e28 (2022); [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30868-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30868-9)
155. J.M.A.Blair, M.A.Webber, A.J.Baylay, D.O.Ogbolu, L.J.V.Piddock. *Nat. Rev. Microbiol.*, **13**, 42 (2015); <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
156. D.Shcherbinin, A.Veselovsky, M.Rubtsova, V.Grigorenko, A.Egorov. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **38**, 2369 (2020); <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1634642>
157. A.Egorov, M.Ulyashova, M.Rubtsova. In *Antibiotic Drug Resistance*. (Eds J.L.Capelo-Martínez, G.Igrejas). (Wiley, 2019). P. 119; <https://doi.org/10.1002/9781119282549.ch6>
158. A.Egorov, M.Rubtsova, V.Grigorenko, I.Uporov, A.Veselovsky. *Biomolecules*, **9**, 854 (2019); <https://doi.org/10.3390/biom9120854>
159. V.G.Grigorenko, T.E.Petrova, C.Carolan, M.Y.Rubtsova, I.V.Uporov, J.Pereira, G.Chojnowski, V.R.Samygina, V.S.Lamzin, A.M.Egorov. *Acta Crystallogr., Sect. D: Struct. Biol.*, **78**, 825 (2022); <https://doi.org/10.1107/S2059798322004879>
160. A.M.Egorov, M.M.Ulyashova, M.Y.Rubtsova. *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 1292 (2020); [*Биохимия*, **85**, 1519 (2020)]; <https://doi.org/10.31857/S0320972520110020>
161. M.G.Khrenova, A.V.Nemukhin. *J. Phys. Chem. B*, **122**, 1378 (2018); <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b10188>
162. M.G.Khrenova, A.V.Krivitskaya, V.G.Tsirelson. *New J. Chem.*, **43** (2019); <https://doi.org/10.1039/c9nj00254e>
163. V.G.Grigorenko, M.G.Khrenova, I.P.Andreeva, M.Y.Rubtsova, A.I.Lev, T.S.Novikova, E.V.Detusheva, N.K.Fursova, I.A.Dyatlov, A.M.Egorov. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 1834 (2022); <https://doi.org/10.3390/ijms23031834>
164. M.Carreiras, E.Mendes, M.Perry, A.Francisco, J.Marco-Contelles. *Curr. Top. Med. Chem.*, **13**, 1745 (2013); <https://doi.org/10.2174/15680266113139990135>
165. S.Zhou, G.Huang. *Biomed. Pharmacother.*, **146**, 112556 (2022); <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112556>
166. Z.Y.Ha, S.Mathew, K.Y.Yeong. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **21**, 99 (2020); <https://doi.org/10.2174/1389203720666191107094949>
167. M.M.Martins, P.S.Branco, L.M.Ferreira. *ChemistrySelect*, **8**, e202300461 (2023); <https://doi.org/10.1002/slct.202300461>
168. S.O.Bachurin, A.Y.Aksinenko, G.F.Makhaeva, E.F.Shevtsova. *Russ. Chem. Bull.*, **72**, 130 (2023) [*Изв. АН. Сер. хим.*, 130 (2023)]; <https://doi.org/10.1007/s11172-023-3718-0>
169. G.F.Makhaeva, E.F.Shevtsova, N.P.Boltneva, S.V.Lushchekina, N.V.Kovaleva, E.V.Rudakova, S.O.Bachurin, R.J.Richardson. *Chem. Biol. Interact.*, **308**, 224 (2019); <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.05.020>
170. G.F.Makhaeva, S.V.Lushchekina, N.P.Boltneva, V.B.Sokolov, V.V.Grigoriev, O.G.Serebryakova, E.A.Vikhareva, A.Y.Aksinenko, G.E.Barreto, G.Aliev, S.O.Bachurin. *Sci. Rep.*, **5**, 13164 (2015) <https://doi.org/10.1038/srep13164>
171. G.F.Makhaeva, V.B.Sokolov, E.F.Shevtsova, N.V.Kovaleva, S.V.Lushchekina, N.P.Boltneva, E.V.Rudakova, A.Y.Aksinenko, P.N.Shevtsov, M.E.Neganova, L.G.Dubova, S.O.Bachurin. *Pure Appl. Chem.*, **89**, 1167 (2017); <https://doi.org/10.1515/pac-2017-0308>
172. S.O.Bachurin, E.F.Shevtsova, G.F.Makhaeva, V.V.Grigoriev, N.P.Boltneva, N.V.Kovaleva, S.V.Lushchekina, P.N.Shevtsov, M.E.Neganova, O.M.Redkozubova, E.V.Bovina, A.V.Gabrelyan, V.P.Fisenko, V.B.Sokolov, A.Y.Aksinenko, V.Echeverria, G.E.Barreto, G.Aliev. *Sci. Rep.*, **7**, 45627 (2017); <https://doi.org/10.1038/srep45627>
173. G.F.Makhaeva, S.O.Bachurin. *Russ. J. Gen. Chem.*, **93** (S2), S528 (2023); <http://doi.org/10.1134/s1070363223150161>
174. G.F.Makhaeva, S.V.Lushchekina, N.V.Kovaleva, T.Yu.Astakhova, N.P.Boltneva, E.V.Rudakova, O.G.Serebryakova, A.N.Proshin, I.V.Serkov, T.P.Trofimova, V.A.Tafeenko, E.V.Radchenko, V.A.Palyulin, V.P.Fisenko, J.Korábečný, O.Soukup, R.J.Richardson. *Bioorg. Chem.*, **112**, 104974 (2021); <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104974>
175. G.F.Makhaeva, A.N.Proshin, N.V.Kovaleva, E.V.Rudakova, N.P.Boltneva, S.V.Lushchekina, T.Y.Astakhova, I.V.Serkov, I.P.Kalashnikova, S.O.Bachurin. *Russ. Chem. Bull.*, **71**, 2404 (2022) [*Изв. АН. Сер. хим.*, 2404 (2022)]; <https://doi.org/10.1007/s11172-022-3668-y>
176. G.F.Makhaeva, N.V.Kovaleva, N.P.Boltneva, E.V.Rudakova, S.V.Lushchekina, T.Y.Astakhova, I.V.Serkov, A.N.Proshin, E.V.Radchenko, V.A.Palyulin, J.Korabecny, O.Soukup,

- S.O.Bachurin, R.J.Richardson. *Molecules*, **27**, 1060 (2022); <https://doi.org/10.3390/molecules27031060>.
177. L.J.Niedernhofer, A.U.Gurkar, Y.Wang, J.Vijg, J.H.J.Hoeijmakers, P.D.Robbins. *Annu. Rev. Biochem.*, **87**, 295 (2018); <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012239>
178. E.E.Alemasova, O.I.Lavrik. *Nucleic Acids Res.*, **47**, 3811 (2019); <https://doi.org/10.1093/nar/gkz120>
179. M.V.Sukhanova, L.Hamon, M.M.Kutuzov, V.Joshi, S.Abrakhi, I.Dobra, P.A.Curmi., D.Pastre, O.I.Lavrik. *J. Mol. Biol.*, **431**, 2655 (2019); <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.05.028>
180. C.B.Vågbø, G.Slupphaug. *DNA Repair*, **95**, 102927 (2020); <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102927>
181. A.S.Singatulina, L.Hamon, M.V.Sukhanova, B.Desforges, V.Joshi, A.Bouhss, O.I.Lavrik, D.Pastré. *Cell Rep.*, **27**, 1809 (2019); <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.031>
182. M.Dasovich, A.K.L.Leung. *Mol. Cell*, **83**, 1552 (2023); <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.04.009>
183. S.Jungmichel, F.Rosenthal, M.Altmeyer, J.Lukas, M.O.Hottiger, M.L.Nielsen. *Mol. Cell*, **52**, 272 (2013); <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.026>
184. S.L.Rulten, A.Rotheray, R.L.Green, G.J.Grundy, D.A.Moore, F.Gómez-Herreros, M.Hafezparast, K.W.Caldecott. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 307 (2014); <https://doi.org/10.1093/nar/gkt835>
185. M.V.Sukhanova, A.S.Singatulina, D.Pastré, O.I.Lavrik. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 7020 (2020); <https://doi.org/10.3390/ijms21197020>
186. I.Gibbs-Seymour, P.Fontana, J.G.M.Rack, I.Ahel. *Mol. Cell*, **62**, 432 (2016); <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.008>
187. M.J.Suskiwicz, F.Zobel, T.E.H.Ogden, P.Fontana, A.Ariza, J.C.Yang, K.Zhu, L.Bracken, W.J.Hawthorne, D.Ahel, D.Neuhaus, I.Ahel. *Nature*, **579**, 598 (2020); <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2013-6>
188. J.J.Bonfiglio, P.Fontana, Q.Zhang, T.Colby, I.Gibbs-Seymour, I.Atanassov, E.Bartlett, R.Zaja, I.Ahel, I.Matic. *Mol. Cell*, **65**, 932 (2017); <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.01.003>
189. T.A.Kurgina, N.A.Moor, M.M.Kutuzov, K.N.Naumenko, A.A.Ukrainsev, O.I.Lavrik. *Commun. Biol.*, **4**, 1259 (2021); <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02780-0>
190. M.F.Langelier, R.Billur, A.Sverzhinsky, B.E.Black, J.M.Pascal. *Nat. Commun.*, **12**, 6675 (2021); <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27043-8>
191. T.A.Kurgina, N.A.Moor, M.M.Kutuzov, O.I.Lavrik. *DNA Repair*, **120**, 103423 (2022); <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2022.103423>
192. E.J.Longarini, H.Dauben, C.Locatelli, A.R.Wondisford, R.Smith, C.Muench, A.Kolvenbach, M.L.Lynskey, A.Pope, J.J.Bonfiglio, E.P.Jurado, R.Fajka-Boja, T.Colby, M.Schuller, I.Ahel, G.Timinszky, R.J.O'Sullivan, S.Huet, I.Matic. *Mol. Cell*, **83**, 1743 (2023); <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.03.027>
193. N.J.Curtin, C.Szabo. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **19**, 711 (2020); <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0076-6>
194. S.S.Dhakar, A.Galera-Prat, L.Lehtiö. *Sci. Rep.*, **14**, 3875 (2024) <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54123-8>
195. M.M.Greenberg. *Acc. Chem. Res.*, **47**, 646 (2014); <https://doi.org/10.1021/ar400229d>
196. J.Nakamura, M.Nakamura. *DNA Repair*, **88**, 102806 (2020); <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102806>
197. P.S.Thompson, D.Cortez. *DNA Repair*, **90**, 102866 (2020); <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102866>
198. B.Demple. In *DNA Damage, DNA Repair and Disease*. Vol. 1. (Eds M.Dizdaroglu, R.S.Lloyd). (London: Royal Society of Chemistry, 2021). P. 204; <https://doi.org/10.1039/9781839160769-00204>
199. U.Kühbacher, J.P.Duxin. *DNA Repair*, **94**, 102924 (2020); <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102924>
200. A.V.Yudkina, A.P.Dvornikova, D.O.Zharkov. *PLOS ONE*, **13**, e0198480 (2018); <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.05.014>
201. A.V.Yudkina, A.V.Endutkin, E.A.Diatlova, N.A.Moor, I.P.Vokhtantsev, I.R.Grin, D.O.Zharkov. *Genes*, **11**, 866 (2020); <https://doi.org/10.3390/genes11080866>
202. A.V.Yudkina, E.S.Shilkin, A.V.Makarova, D.O.Zharkov. *Genes*, **13**, 166 (2022); <https://doi.org/10.3390/genes13020166>
203. C.Bryan, X.Wei, Z.Wang, K.Yang. *J. Biol. Chem.*, **298**, 102055 (2022); <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102055>
204. A.V.Yudkina, N.A.Bulgakov, D.V.Kim, S.V.Baranova, A.A.Ishchenko, M.K.Saparbaev, V.V.Koval, D.O.Zharkov. *Nucleic Acids Res.*, **51**, 6321 (2023); <https://doi.org/10.1093/nar/gkad423>
205. A.V.Yudkina, A.E.Barmatov, N.A.Bulgakov, E.O.Boldinova, E.S.Shilkin, A.V.Makarova, D.O.Zharkov. *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 10877 (2023); <https://doi.org/10.3390/ijms241310877>
206. N.E.Price, K.S.Gates. *Chem. Res. Toxicol.*, **37**, 199 (2024); <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.3c00345>
207. K.Housh, J.S.Jha, Z.Yang, T.Haldar, K.M.Johnson, J.Yin, Y.Wang, K.S.Gates. *J. Am. Chem. Soc.*, **143**, 15344 (2021); <https://doi.org/10.1021/jacs.1c06926>
208. A.V.Yudkina, D.O.Zharkov. *Chem. Res. Toxicol.*, **35**, 303 (2022); <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.1c00359>
209. O.M.Panasenko, I.V.Gorudko, A.V.Sokolov. *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 1466 (2013) [*Учену биол. хумуу*, **53**, 195 (2013)]; <https://doi.org/10.1134/S0006297913130075>
210. O.M.Panasenko, Y.A.Vladimirov, V.I.Sergienko. *Biochemistry (Moscow)*, **89** (Suppl. 1), S148 (2024) [*Учену биол. хумуу*, **64**, 291 (2024)]; <https://doi.org/10.1134/S0006297924140098>
211. M.J.Davies, C.L.Hawkins. *Antioxid. Redox. Signal.*, **32**, 957 (2020); <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8030>
212. Q.-B.Lu. *Cells*, **9**, 1461 (2020); <https://doi.org/10.3390/cells9061461>
213. H.R.Thiam, S.L.Wong, D.D.Wagner, C.M.Waterman. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **36**, 191 (2020); <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-020520-111016>
214. O.M.Panasenko, T.I.Torkhovskaya, I.V.Gorudko, A.V.Sokolov. *Biochemistry (Moscow)*, **85** (Suppl. 1), S34 (2020) [*Учену биол. хумуу*, **60**, 75 (2020)]; <https://doi.org/10.1134/S0006297920140035>
215. C.M.C.Andrés, J.M.Pérez de la Lastra, C.A.Juan, F.J.Plou, E.Pérez-Lebeña. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 10735 (2022); <https://doi.org/10.3390/ijms231810735>
216. J.A.Ronald, J.W.Chen, Y.Chen, A.M.Hamilton, E.Rodriguez, F.Reynolds, R.A.Hegele, K.A.Rogers, M.Querol, A.Bogdanov, R.Weissleder, B.K.Rutt. *Circulation*, **120**, 592 (2009); <https://doi.org/10.1161/circulationaha.108.813998>
217. V.E.Reut, I.V.Gorudko, D.V.Grigorieva, A.V.Sokolov, O.M.Panasenko. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **48**, 467 (2022) [*Биоорг. химия*, **48**, 415 (2022)]; <https://doi.org/10.1134/S1068162022030165>
218. T.Lazarevic-Pasti, A.Leskovac, V.Vasic. *Curr. Drug Metab.*, **16**, 168 (2015); <https://doi.org/10.2174/138920021603150812120640>
219. A.A.Baykov, V.A.Anashkin, A.Salminen, R.Lahti. *FEBS Lett.*, **591**, 3225 (2017); <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12877>
220. A.A.Baykov, H.K.Tuominen, R.Lahti. *ACS Chem. Biol.*, **6**, 1156 (2011); <https://doi.org/10.1021/cb200231>
221. J.Erenö-Orbea, I.Oyenarte, L.A.Martínez-Cruz. *Arch. Biochem. Biophys.*, **540**, 70 (2013); <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.10.008>
222. V.A.Anashkin, A.Salminen, H.Tuominen, V.N.Orlov, R.Lahti, A.A.Baykov. *J. Biol. Chem.*, **290**, 27594 (2015); <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.680272>
223. T.Kajander, J.Kellosalo, A.Goldman. *FEBS Lett.*, **587**, 1863 (2013); <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.003>
224. S.Nath. *Front. Chem.*, **11**, 1058500 (2023); <https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1058500>
225. N.N.Vorobyeva, S.A.Kurilova, A.V.Vlasova, V.A.Anashkin, T.I.Nazarova, E.V.Rodina, A.A.Baykov. *Biophys. Biochem Acta*, **1865**, 129762 (2021); <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129762>

226. S.Wang, J.Wei, S.Li, Y.Luo, Y.Li, X.Wang, W.Shen, D.Luo, D.Liu. *Front. Oncol.*, **12**, 1012090 (2022); <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1012090>
227. S.M.Iqbal, S.Qadir, H.M.Aslam, M.A.Qadir. *Cureus*, **11**, e38402019 (2019); <https://doi.org/10.7759/cureus.2020.4136>
228. A.V.Valueva, R.S.Romanov, S.S.Mariasina, M.S.Eliseev, E.V.Rodina. *ACS Omega*, **7**, 8579 (2020); <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b04429>
229. Patent KR 2022158291 (2022)
230. S.Kanungo, J.Morton, M.Neelakantan, K.Ching, J.Saeedian, A.Goldstein. *Ann. Transl. Med.*, **6**, 475 (2018); <https://doi.org/10.21037/atm.2018.12.13>
231. A.Salminen, V.A.Anashkin, M.Lahti, H.K.Tuominen, R.Lahti, A.A.Baykov. *J. Biol. Chem.*, **289**, 22865 (2014); <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.589473>
232. A.A.Baykov, A.M.Malinen, H.H.Luoto, R.Lahti. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **77**, 267 (2013); <https://doi.org/10.1128/MMBR.00003-13>
233. A.O.M.Holmes, A.C.Kalli, A.Goldman. *Front. Mol. Biosci.*, **6**, 132 (2019); <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00132>
234. S.M.Lin, J.Y.Tsai, C.D.Hsiao, Y.T.Huang, C.L.Chieu, M.H.Liu, J.Y.Tung, T.H.Liu, R.L.Pan, Y.J.Sun. *Nature*, **484**, 399 (2012); <https://doi.org/10.1038/nature10963>
235. J.Kellosalo, T.Kajander, K.Kogan, K.Pokharel, A.Goldman. *Science*, **337**, 473 (2012); <https://doi.org/10.1126/science.1222505>
236. A.A.Baykov, V.A.Anashkin, A.M.Malinen, A.V.Bogachev. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 9504 (2022); <https://doi.org/10.3390/ijms23169504>
237. H.H.Luoto, A.A.Baykov, R.Lahti, A.M.Malinen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 1255 (2013); <https://doi.org/10.1073/pnas.1217816110>
238. N.R.Shah, C.Wilkinson, S.P.Harborne, A.Turku, K.M.Li, Y.J.Sun, S.Harris, A.Goldman. *Struct. Dyn.*, **4**, 032105 (2017); <https://doi.org/10.1063/1.4978038>
239. A.A.Baykov. *Front. Plant Sci.*, **11**, 107 (2020); <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00107>
240. F.Calisto, F.M.Sousa, F.V.Sena, P.N.Refojo, M.M.Pereira. *Chem. Rev.*, **121**, 1804 (2021); <https://doi.org/10.1021/asc.chemrev.0c00830>
241. N.G.Johansson, L.Dreano, K.Vidilaseris, A.Khattab, J.Liu, A.Lasbleiz, O.Ribeiro, A.Kiriazis, G.Boije af Gennäs, S.Meri, A.Goldman, J.Yli-Kauhalauma, H.Xhaard. *ChemMedChem*, **16**, 3360 (2021); <https://doi.org/10.1002/cmdc.202100392>
242. E.Efremenko, A.Asanli, I.Lyagin. *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 4630 (2023); <https://doi.org/10.3390/ijms24054630>
243. D.Dobritzsch, H.Wang, G.Schneider, S.Yu. *Biochem. J.*, **462**, 441 (2014); <https://doi.org/10.1042/bj20140382>
244. P.Jacquet, B.Rémy, R.P.T.Bross, M.van Grol, F.Gaucher, E.Chabrière, M.C.de Koning, D.Daudé. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 8152 (2021); <https://doi.org/10.3390/ijms22158152>
245. S.P.Harvey, L.R.McMahon, F.J.Berg. *Heliyon*, **6** (1), e03153 (2020); <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03153>
246. C.H.Díaz Nieto, A.M.Granero, M.A.Zon, H.Fernández. *Food Chem. Toxicol.*, **118**, 460 (2018); <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.057>
247. G.Rychen, G.Aquilina, G.Azimonti, V.Bampidis, M.de Lourdes Bastos, G.Bories, A.Chesson, P.S.Cocconcelli, G.Flachowsky, J.Gropp, B.Kolar, M.Kouba, S.López Puente, M.López-Alonso, A.Mantovani, B.Mayo, F.Ramos, G.Rychen, M.Saarela, R.E.Villa, R.P.T.Wallace, P.Wester. *EFSA J.*, **14** (11), e04617 (2016); <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4617>
248. E.Efremenko, O.Maslova, N.Stepanov, A.Ismailov. *Toxins*, **13**, 34 (2021); <https://doi.org/10.3390/toxins13010034>
249. M.Kelbert, C.S.Pereira, N.A.Daronch, K.Cesca, C.Michels, S.de Oliveira, H.M.Souares. *J. Hazard. Mater.*, **409**, 124520 (2021); <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124520>
250. M.Naghdi, M.Taheran, S.K.Brar, A.Kermanshahi-pour, M.Verma, R.Y.Surampalli. *Process Biochem.*, **67**, 147 (2018); <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.02.009>
251. P.Acheampong, S.H.Thomas. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **82**, 923 (2016); <https://doi.org/10.1111/bcp.13028>
252. M.Maryskova, M.Vrsanska, A.Sevcu, V.Novotny, A.Blahutova, S.Voberkova. *Environ. Technol. Innov.*, **26**, 102316 (2022); <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102316>
253. J.Havlasek, J.Vrba, M.Zatloukalova, B.Papouskova, M.Modriansky, J.Storch, J.Vacek. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **476**, 116654 (2023); <https://doi.org/10.1016/j.taap.2023.116654>
254. I.V.Lyagin, E.N.Efremenko. *Biochimie*, **144**, 115 (2018); <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.10.023>
255. K.Hu, J.Torán, E.López-García, M.V.Barbieri, C.Postigo, M.López de Alda, G.Caminal, M.Sarrà, P.Blánquez. *Sci. Total Environ.*, **743**, 140628 (2020); <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140628>
256. M.F.Khan, C.D.Murphy. *Enzyme Microb. Technol.*, **161**, 110102 (2022); <https://doi.org/10.1016/j.enzymmictec.2022.110102>
257. E.Efremenko, N.Stepanov, O.Senko, O.Maslova, I.Lyagin, A.Asanli. *Life*, **13**, 841 (2023); <https://doi.org/10.3390/life13030841>
258. E.N.Efremenko, I.V.Lyagin, O.V.Maslova, O.V.Senko, N.A.Stepanov, A.G.Asanli. *Russ. Chem. Rev.*, **92** (2), RCR5069 (2023) [E.N.Ефре́менко, И.В.Лягин, О.В.Маслова, О.В.Сенько, Н.А.Степанов, А.Г.Асланлы. *Ученые химии*, **92** (2), RCR5069 (2023)]; <https://doi.org/10.57634/RCR5069>
259. E.Efremenko, O.Senko, O.Maslova, I.Lyagin, A.Asanli, N.Stepanov. *Toxins*, **15**, 205 (2023); <https://doi.org/10.3390/toxins15030205>
260. M.Noga, A.Michalska, K.Jurowski. *Sci. Total Environ.*, **890**, 164241 (2023); <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164241>
261. M.Matula, T.Kucera, O.Soukup, J.Pejchal. *J. Catal.*, **10**, 1365 (2020); <https://doi.org/10.3390/catal10121365>
262. K.Chauhan, A.Zárate-Romero, P.Sengar, C.Medrano, R.Vazquez-Duhalt. *ChemCatChem*, **13**, 3732 (2021); <https://doi.org/10.1002/cctc.202100604>
263. Z.Liu, W.Zhou, C.Qi, T.Kong. *Adv. Mater.*, **32**, e2002932 (2020); <https://doi.org/10.1002/adma.202002932>
264. X.Wang, X.Qiao, H.Chen, L.Wang, X.Liu, X.Huang. *Small Methods*, **7**, e2201712 (2023); <https://doi.org/10.1002/smt.202201712>
265. T.N.Pashirova, Z.M.Shaihutdinova, V.F.Mironov, P.Masson. *Acta Naturae*, **15** (1), 4 (2023); [*Acta Naturae*, **15** (1), 1 (2023)]; <https://doi.org/10.32607/actanaturae.15681>
266. M.Eddleston. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **59**, 341 (2019); <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021842>
267. P.Masson, F.Nachon. *J. Neurochem.*, **142**, 26 (2017); <https://doi.org/10.1111/jnc.14026>
268. E.Prchalova, Z.Kohoutova, K.Knittelova, D.Malinak, K.Musilek. *Arch. Toxicol.*, **97**, 2839 (2023); <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03587-0>
269. P.Masson, S.V.Lushchekina. *Chem. Biol. Interact.*, **259**, 319 (2016); <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.02.010>
270. T.N.Pashirova, Z.M.Shaihutdinova, E.B.Souto, P.Masson, V.F.Mironov. *Colloid J.*, **85**, 655 (2023); <https://doi.org/10.1134/S1061933X23600720> [*Коллоид. журн.*, **85**, 655 (2023)]; <https://doi.org/10.31857/S0023291223600487>
271. Z.Shajhutdinova, T.Pashirova, P.Masson. *Biomedicines*, **10**, 784 (2022); <https://doi.org/10.3390/biomedicines10040784>
272. T.Pashirova, Z.Shaihutdinova, D.Tatarinov, M.Mansurova, R.Kazakova, A.Bogdanov, E.Chabrière, P.Jacquet, D.Daudé, A.A.Akhunzianov, R.R.Miftakhova, P.Masson. *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 15756 (2023); <https://doi.org/10.3390/ijms242115756>
273. T.N.Pashirova, Z.Shaihutdinova, M.Mansurova, R.Kazakova, D.Shambazova, A.Bogdanov, D.Tatarinov, D.Daudé, P.Jacquet, E.Chabrière, P.Masson. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **14**, 19241 (2022); <https://doi.org/10.1021/acsami.2c03210>

274. M.M.Rahman, L.Ahmed, F.Anika, A.A.Riya, S.K.Kali, A.Rauf, R.Sharma. *Bioinorg. Chem. Appl.*, 2409642 (2023); <https://doi.org/10.1155/2023/2409642>
275. J.Chen, Y.Guo, X.Zhang, J.Liu, P.Gong, Z.Su, L.Fan, G.Li. *J. Agric. Food Chem.*, **71**, 3564 (2023); <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c06740>
276. T.M.Joseph, D.K.Mahapatra, A.Esmacili, Ł.Piszczyk, M.S.Hasanin, M.Kattali, J.Haponiuk, S.Thomas. *Nanomaterials*, **13**, 574 (2023); <https://doi.org/10.3390/nano13030574>
277. V.De Matteis, L.Rizzello. *Cells*, **9**, 679 (2020); <https://doi.org/10.3390/cells9030679>
278. F.Masse, M.Ouellette, G.Lamoureux, E.Boisselier. *Med. Res. Rev.*, **39**, 302 (2019); <https://doi.org/10.1002/med.21509>
279. P.Milán-Rois, C.Rodríguez-Díaz, M.Castellanos, Á.Somoza. *Methods Mol. Biol.*, **2434**, 103 (2022); https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2010-6_6
280. A.Kaushal, I.Khurana, P.Yadav, P.Allawadhi, A.K.Banothu, D.Neeradi, S.Thalugula, P.J.Barani, R.R.Naik, U.Navik, K.K.Bharani, A.Khurana. *Chem. Biol. Interact.*, **382**, 110590 (2023); <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110590>
281. S.Khan, M.Zahoor, R.Sher Khan, M.Ikram, N.U.Islam. *Heliyon*, **9**, e16928 (2023); <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16928>
282. N.U.Khalil, J.Lee, J.Kim, Y.Kim, S.Yu, J.Kim, S.Kim, D.Sung, H.Kim. *Pharmaceutics*, **15**, 1432 (2023); <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051432>
283. Y.Xu, H.Li. *J. Biomater. Appl.*, **37**, 333 (2022); <https://doi.org/10.1177/08853282221090880>
284. A.A.Alhowyan, M.A.Kalam, M.Iqbal, M.Raish, A.M.El-Toni, M.Alkholief, A.A.Almomen, A.Alshamsan. *Molecules*, **28**, 1260 (2023); <https://doi.org/10.3390/molecules28031260>
285. S.Martin-Ortigosa, D.J.Peterson, J.S.Valenstein, V.S.Lin, B.G.Trewyn, L.A.Lyznik, K.Wang. *Plant Physiol.*, **164**, 537 (2014); <https://doi.org/10.1104/pp.113.233650>
286. S.N.Kim, S.A.Ko, C.G.Park, S.H.Lee, B.K.Huh, Y.H.Park, Y.K.Kim, A.Ha, K.H.Park, Y.B.Choy. *Mol. Pharm.*, **15**, 3143 (2018); <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00215>
287. S.Jafari, B.Mahyad, H.Hashemzadeh, S.Janfaza, T.Gholikhani, L.Tayebi. *Int. J. Nanomed.*, **15**, 3447 (2020); <https://doi.org/10.2147/ijn.s249441>
288. S.Anjum, M.Hashim, S.A.Malik, M.Khan, J.M.Lorenzo, B.H.Abbasi, C.Hano. *Cancers*, **13**, 4570 (2021); <https://doi.org/10.3390/cancers13184570>
289. E.K.Schneider-Futschik, F.Reyes-Ortega. *Pharmaceutics*, **13**, 1157 (2021); <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081157>
290. A.Pusta, M.Tertis, I.Crăciunescu, R.Turcu, S.Mirel, C.Cristea. *Pharmaceutics*, **15**, 1872 (2023); <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071872>
291. F.Machla, V.Sokolova, V.Platania, O.Prymak, K.Kostka, B.Kruse, M.Agrymakis, S.Pasadaki, A.Kritis, K.Alpantaki, M.Vidaki, M.Chatzinikolaïdou, M.Epple, A.Bakopoulou. *Acta Biomater.*, **159**, 156 (2023); <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2023.01.044>
292. E.Popova, O.Matveeva, O.Beznos, V.Tikhomirova, E.Kudryashova, Y.Grigoriev, N.Chesnokova, O.Kost. *Pharmaceutics*, **15**, 550 (2023); <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020550>
293. E.V.Popova, V.E.Tikhomirova, O.V.Beznos, N.B.Chesnokova, Y.V.Grigoriev, N.L.Klyachko, O.A.Kost. *Nanomedicine*, **40**, 102493 (2022); <https://doi.org/10.1016/j.nano.2021.102493>
294. O.B.Безнос, В.Е.Тихомирова, Е.В.Попова, Т.А.Павленко, О.А.Кост, Н.Б.Чеснокова. *Офтальмология*, **18**, 331 (2021); <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2021-2-331-337>
295. S.Lara-Ochoa, W.Ortega-Lara, C.E.Guerrero-Beltrán. *Pharmaceutics*, **13**, 1642 (2021); <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101642>
296. I.I.Nikolskaya, O.V.Beznos, A.I.Eltsov, I.V.Gachok, N.B.Chesnokova, V.P.Varlamov, O.A.Kost. *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **73**, 85 (2018); [*Вестн. Моск. ун-та. Серия 2. Химия*, **59**, 170 (2018)]; <https://doi.org/10.3103/S0027131418020116>
297. I.I.Nikolskaya, O.V.Beznos, V.A.Galitskiy, N.B.Chesnokova, O.A.Kost. *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **71**, 154 (2016); [*Вестн. Моск. ун-та. Серия 2. Химия*, **57**, 138 (2016)]; <https://doi.org/10.3103/S002713141603007X>
298. E.V.Shimanovskaya, I.I.Nikol'skaya, P.V.Binevsky, O.V.Beznos, N.L.Klyachko, T.A.Pavlenko, N.B.Chesnokova, O.A.Kost. *Nanotechnol. Russ.*, **9**, 219 (2014) [*Рос. нанотехнол.*, **9** (2), 100 (2014)]; <https://doi.org/10.1134/S1995078014020141>
299. E.V.Popova, V.E.Tikhomirova, O.V.Beznos, N.B.Chesnokova, Y.V.Grygoryev, M.E.Taliansky, O.A.Kost. *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 15532 (2023); <https://doi.org/10.3390/ijms242115532>
300. D.B.Trushina, T.N.Borodina, S.Belyakov, M.N.Antipina. *Mater Today Adv.*, **14**, 100214 (2022); <https://doi.org/10.1016/j.mtadv.2022.100214>
301. P.V.Binevski, N.G.Balabushevich, V.I.Uvarova, A.S.Vikulina, D.Volodkin. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **181**, 437 (2019); <https://doi.org/10.1016/j.colsurf.2019.05.077>
302. N.G.Balabushevich, E.A.Kovalenko, L.Y.Filatova, E.A.Kirzhanova, E.V.Mikhalechik, D.Volodkin, A.S.Vikulina. *Macromol. Biosci.*, **22**, 2200005 (2022); <https://doi.org/10.1002/mabi.202200005>
303. I.M.Kuznetsova, K.K.Turoverov, V.N.Uversky. *Int. J. Mol. Sci.*, **15**, 23090 (2014); <https://doi.org/10.3390/ijms151223090>
304. X.Yu, Z.Zhang, J.Li, Y.Su, M.Gao, T.Jin, G.Chen. *Biores. Technol.*, **321**, 124509 (2021); <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124509>
305. A.K.Shakya, K.S.Nandakumar. *J. R. Soc. Interface*, **15**, 20180062 (2018); <https://doi.org/10.1098/rsif.2018.0062>
306. V.I.Muronetz, D.V.Pozdyshev, P.I.Semenyuk. *Polymers*, **14**, 4204 (2022); <https://doi.org/10.3390/polym14194204>
307. N.N.Sokolov, M.A.Eldarov, M.V.Pokrovskaya, S.S.Aleksandrova, O.Y.Abakumova, O.V.Podobed, N.S.Melik-Nubarov, E.V.Kudryashova, D.V.Grishin, A.I.Archakov. *Biomed. Chem.*, **61**, 312 (2015); <https://doi.org/10.18097/PBMC20156103312>
308. M.V.Pokrovskaya, V.S.Pokrovsky, S.S.Aleksandrova, N.N.Sokolov, D.D.Zhdanov. *Pharmaceutics*, **14**, 599 (2022); <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030599>
309. D.V.Borsakova, E.I.Sinauridze. *Pediatr. Hematol. Immunopathol.*, **17**, 82 (2019); <https://doi.org/10.24287/1726-1708-2018-17-4-82-99>
310. N.V.Dobryakova, D.D.Zhdanov, N.N.Sokolov, S.S.Aleksandrova, M.V.Pokrovskaya, E.V.Kudryashova. *Appl. Sci.*, **13**, 3373 (2023); <https://doi.org/10.56304/S0234275822050040>
311. M.A.Malakhova, M.V.Pokrovskaya, S.S.Alexandrova, N.N.Sokolov, E.V.Kudryashova. *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **73**, 185 (2018); [*Вест. Моск. ун-та. Серия 2. Химия*, **73**, 185 (2018)]; <https://doi.org/10.3103/S0027131418040065>
312. N.Dobryakova, D.Zhdanov, M.Dumina, S.Aleksandrova, M.Pokrovskaya, A.Genin, A.Shishparenok, A.Zhgun, E.V.Kudryashova. *Catalysts*, **13**, 832 (2023); <https://doi.org/10.3390/catal13050832>
313. K.V.Sukhovkov, E.V.Kudryashova. *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 113 (2015) [*Биохимия*, **80**, 113 (2015)]; <https://doi.org/10.1134/S0006297915010137>
314. I.D.Zlotnikov, A.A.Ezhov, E.V.Kudryashova. *Biophysica*, **4**, 340 (2024). <https://doi.org/10.3390/biophysica4030024>
315. N.V.Dobryakova, D.D.Zhdanov, N.N.Sokolov, S.S.Aleksandrova, M.V.Pokrovskaya, E.V.Kudryashova. *Pharmaceutics*, **15**, 406 (2022); <https://doi.org/10.3390/ph15040406>
316. E.V.Kudryashova, K.V.Suhovkov, N.N.Sokolov. *Biomed. Chem.*, **61**, 480 (2015); <https://doi.org/10.18097/PBMC20156104480>
317. E.V.Kudryashova, N.N.Sokolov. *Anal. Biochem.*, **598**, 113694 (2020); <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113694>

318. N.V.Dobryakova, M.V.Dumina, A.A.Zhgun, D.D.Zhdanov, M.V.Pokrovskaya, S.S.Aleksandrova, E.V.Kudryashova. *Int. J. Mol. Sci.*, **25**, 4174 (2024); <https://doi.org/10.3390/ijms25084174>
319. B.J.Bruno, G.D.Miller, C.S.Lim. *Ther. Deliv.*, **4**, 1443 (2013); <https://doi.org/10.4155/tde.13.104>
320. J.Gao, J.M.Karp, R.Langer, N.Joshi. *Chem. Mater.*, **35**, 359 (2023); <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.2c03003>
321. M.A.Do, D.Levy, A.Brown, G.Marriott, B.Lu. *Sci. Rep.*, **9**, 17274 (2019); <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53844-5>
322. C.Y.Zhu, F.L.Li, Y.W.Zhang, R.K.Gupta, S.K.S.Patel, J.K.Lee. *Polymers*, **14**, 488 (2023); <https://doi.org/10.3390/polym14071409>
323. M.E.M.Cruz, M.L.Corvo, M.B.Martins, S.Simões, M.M.Gaspar. *Pharmaceutics*, **14**, 531 (2022); <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030531>
324. K.Martinek, A.V.Levashov, Yu.L.Khmelnitsky, N.L.Klyachko, I.V.Berezin. *Science*, **218**, 889 (1982); <https://doi.org/10.1126/science.6753152>
325. A.Figueiras, C.Domingues, I.Jarak, A.I.Santos, A.Parra, A.Pais, C.Alvarez-Lorenzo, A.Concheiro, A.Kabanov, H.Cabral, F.Veiga. *Pharmaceutics*, **14**, 1700 (2022); <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081700>
326. E.M.Darby, E.Trampari, P.Siasat, M.S.Gaya, I.Alav, M.A.Webber, J.M.Blair. *Nat. Rev. Microbiol.*, **21**, 280 (2023); <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y>
327. A.Bhagwat, M.Mixon, C.H.Collins, J.S.Dordick. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **104**, 9019 (2020); <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10862-y>
328. L.Y.Filatova, D.M.Donovan, S.C.Becker, D.N.Lebedev, A.D.Priyma, H.V.Koudriachova, A.V.Kabanov, N.L.Klyachko. *Biochimie*, **95**, 1689 (2013); <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.04.013>
329. S.A.Legotsky, K.Y.Vlasova, A.D.Priyma, M.M.Shneider, V.G.Pugachev, O.D.Totmenina, A.V.Kabanov, K.A.Miroshnikov, N.L.Klyachko. *Biochimie*, **107**, 293 (2014); <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.09.017>
330. Y.I.Golovin, S.L.Gribanovsky, D.Y.Golovin, N.L.Klyachko, A.G.Majouga, A.M.Master, M.Sokolsky, A.V.Kabanov. *J. Control. Release*, **219**, 43 (2015); <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.09.038>
331. A.D.Usvaliev, N.G.Belogurova, K.V.Pokholok, A.V.Finko, A.N.Prusov, D.Yu.Golovin, K.A.Miroshnikov, Y.I.Golovin, N.L.Klyachko. *Pharmaceutics*, **15**, 1871 (2023); <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071871>
332. Z.Jia, H.Zhu, J.Li, X.Wang, H.Misra, Y.Li. *Spinal Cord*, **50**, 264 (2012); <https://doi.org/10.1038/sc.2011.111>
333. N.V.Nukolova, A.D.Aleksashkin, T.O.Abakumova, A.Y.Morozova, I.L.Gubskiy, E.A.Kirzhanova, M.A.Abakumov, V.P.Chekhonin, N.L.Klyachko, A.V.Kabano. *J. Control. Release*, **270**, 226 (2018); <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.11.044>
334. L.Ung, U.Pattamatta, N.Carnt, J.L.Wilkinson-Berka, G.Liew, A.J.R.White. *Clin. Sci.*, **131**, 2865 (2017); <https://doi.org/10.1042/CS20171246>
335. A.N.Vaneev, O.A.Kost, N.L.Eremeev, O.V.Beznos, A.V.Alova, P.V.Gorelkin, A.S.Erofeev, N.B.Chesnokova, A.V.Kabanov, N.L.Klyachko. *Biomedicines*, **9**, 396 (2021); <https://doi.org/10.3390/biomedicines9040396>
336. V.B.A.Umeno, Y.Yoshida. *Free Radical Res.*, **51**, 413 (2017); <https://doi.org/10.1080/10715762.2017.1315114>
337. M.J.Haney, P.Suresh, Y.Zhao, G.D.Kanmogne, I.Kadiu, M.Sokolsky-Papkov, N.L.Klyachko, R.L.Mosley, A.V.Kabanov, H.E.Gendelman, E.V.Batrakova. *Nanomedicine*, **7**, 815 (2012); <https://doi.org/10.2217/nmm.11.156>
338. M.J.Haney, Y.Zhao, E.B.Harrison, V.Mahajan, S.Ahmed, Z.He, P.Suresh, S.D.Hingtgen, N.L.Klyachko, R.L.Mosley, H.E.Gendelman, A.V.Kabanov, E.V.Batrakova. *PLOS ONE*, **8**, e61852 (2013); <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061852>
339. M.Pegtél, S.J.Gould. *Annu. Rev. Biochem.*, **88**, 487 (2019); <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118>
340. M.J.Haney, N.L.Klyachko, Y.Zhao, R.Gupta, E.G.Plotnikova, Z.He, T.Patel, A.Piroyan, M.Sokolsky, A.V.Kabanov, E.V.Batrakova. *J. Control. Release*, **207**, 18 (2015); <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.03.033>
341. A.Jabbari, E.Sameiyan, E.Yaghoobi, M.Ramezani, M.Alibolandi, K.Abnous, S.M.Taghdisi. *Int. J. Pharm.*, **646**, 123448 (2023); <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123448>
342. A.Economou, C.Kokkinos, L.Bousiakiou, T.Hianik. *Sensors*, **23**, 7786 (2023); <https://doi.org/10.3390/s23187786>
343. Y.Li, W.W.Tam, Y.Yu, Z.Zhuo, Z.Xue, C.Tsang, X.Qiao, X.Wang, W.Wang, Y.Li, Y.Tu, Y.Gao. *Biomark. Res.*, **11**, 70 (2023); <https://doi.org/10.1186/s40364-023-00510-8>
344. T.W.Chang, P.Janardhanan, C.M.Mello, B.R.Singh, S.Cai. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **180**, 10 (2016); <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2081-0>
345. A.Samokhvalov, I.Safenkova, A.Zherdev, B.Dzantiev. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **505**, 536 (2018); <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.109>
346. M.Tavassoli, A.Khezerlou, B.Khalilzadeh, A.Ehsani, H.Kazemian. *Mikrochim. Acta*, **190**, 371 (2023); <https://doi.org/10.1007/s00604-023-05937-2>
347. M.Simmons, L.M.Miller, M.O.Sundström, S.Johnson. *Antibiotics*, **9**, 655 (2020); <https://doi.org/10.3390/antibiotics9100655>
348. S.Arshavsky-Graham, K.Urmann, R.Salama, N.Massad-Ivanir, J.-G.Walter, T.Scheper, E.Segal. *Analyst*, **145**, 499 (2020); <https://doi.org/10.1039/d0an00178c>
349. G.Liang, L.Song, Y.Gao, K.Wu, R.Guo, R.Chen, J.Zhen, L.Pan. *Toxics*, **11**, 513 (2023); <https://doi.org/10.3390/toxics11060513>
350. Y.Xu, X.Yang, E.Wang. *Anal. Chim. Acta*, **1295**, 342304 (2024); <https://doi.org/10.1016/j.aca.2024.342304>
351. C.Zhu, Z.Feng, H.Qin, L.Chen, M.Yan, L.Li, F.Qu. *Talanta*, **266** (Pt 1), 124998 (2024); <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124998>
352. A.Davydova, V.Krasitskaya, P.Vorobjev, V.Timoshenko, A.Tupikin, M.Kabilov, L.Frank, A.Veniaminova, M.Vorobyeva. *RSC Adv.*, **10**, 32393 (2020); <https://doi.org/10.1039/d0ra05117a>
353. T.Pleshakova, A.Kaysheva, I.Shumov, V.Ziborov, J.Bayzyanova, V.Konev, V.Uchaikin, A.Archakov, Y.Ivanov. *Micromachines*, **10**, 129 (2019); <https://doi.org/10.3390/mi10020129>
354. A.Davydova, M.Vorobyeva. *Biomedicines*, **10**, 1606 (2022); <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071606>
355. O.Mitkevich, N.Kochneva-Pervukhova, E.Surina, S.Benevolensky, V.Kushnirov, M.D.Ter-Avanesyan. *Prion*, **6**, 400 (2012); <https://doi.org/10.4161/pri.20678>
356. E.R.Surina, E.V.Morozkina, E.V.Marchenko, M.D.Ter-Avanesian, S.V.Benevolenskii. *Mol. Biol.*, **43**, 626 (2009) [*Мол. биол.*, **43**, 682 (2009)]; <https://doi.org/10.1134/S0026893309040153>
357. G.Pavlova, V.Kolesnikova, N.Samoylenkova, S.Drozd, A.Revishchin, D.Shamadykova, D.Usachev, A.Kopylov. *Front. Oncol.*, **12**, 880740 (2022); <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.880740>
358. R.Eivazzadeh-Keihan, Z.Saadatidizaji, A.Maleki, M.Guardia, M.Mahdavi, S.Barzegar, S.Ahadian. *Biosensors*, **12**, 767 (2022); <https://doi.org/10.3390/bios12090767>
359. D.Li, Y.Su, J.Li, R.Liu, B.Fang, J.He, W.Xu, L.Zhu. *Biomacromolecules*, **24**, 4568 (2023); <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.3c00634>
360. A.Matchawong, C.Srisawat, S.Sangboonruang, C.Tharinjaroen. *Molecules*, **27**, 3894 (2022); <https://doi.org/10.3390/molecules27123894>
361. W.Sabrowski, N.Dreymann, A.Möller, D.Czepluch, P.Albani, D.Theodoridis, M.Menger. *Sci. Rep.*, **12**, 7936 (2022); <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12062-2>

362. N.Khan, A.Bui, Y.Xiao, B.Sutton, R.Shaw, B.Wylie, M.Latham. *PLOS ONE*, **14**, e0214440 (2019); <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214440>
363. A.Davydova, M.Vorobjeva, D.Pyshnyi, S.Altman, V.Vlassov, A.Veniaminova. *Crit. Rev. Microbiol.*, **42**, 847 (2016); <https://doi.org/10.3109/1040841X.2015.1070115>
364. A.Buglak, A.Samokhvalov, A.Zherdev, B.Dzantiev. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8420 (2020); <https://doi.org/10.3390/ijms21228420>
365. M.Vorobyeva, A.Davydova, P.Vorobjev, A.Veniaminova. *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 470 (2018); <https://doi.org/10.3390/ijms19020470>
366. Y.Song, J.Song, X.Wei, M.Huang, M.Sun, L.Zhu, B.Lin, H.Shen, Z.Zhu, C.Yang. *Anal. Chem.*, **92**, 9895 (2020); <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01394>
367. I.Ferreira-Bravo, J.De Stefano. *Viruses*, **13**, 1983 (2021); <https://doi.org/10.3390/v13101983>
368. J.Abduljalil, A.Elghareib, A.Samir, A.Ezat, A.Elfiqy. *Int. J. Biol. Macromol.*, **242**, 125153 (2023); <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125153>
369. F.Grabovenko, L.Nikiforova, B.Yanenko, A.Ulitin, E.Loktyushov, T.Zatsepina, E.Zavyalova, M.Zvereva. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 557 (2022) <https://doi.org/10.3390/ijms23010557>
370. E.Engvall. *Clin. Chem.*, **56**, 319 (2010); <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.127803>
371. D.Sabourin, J.Petersen, D.Snakenborg, M.Brivio, H.Gudnadson, A.Wolff, M.Dufva. *Biomed. Microdev.*, **12**, 673 (2010); <https://doi.org/10.1007/s10544-010-9420-7>
372. D.I.Andersson, N.Q.Balaban, F.Baquero, P.Courvalin, P.Glaser, U.Gophna, R.Kishony, S.Molin, T.Tonjum. *FEMS Microbiol. Rev.*, **44**, 171 (2020); <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa001>
373. M.S.Mulani, E.E.Kamble, S.N.Kumkar, V.S.Tawre, K.R.Pardesi. *Front. Microbiol.*, **10**, 539 (2019); <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>
374. A.Van Belkum, C.-A.D.Burnham, J.W.A.Rossen, F.Mallard, O.Rochas, W.M.Dunne. *Nat. Rev. Microbiol.*, **18**, 299 (2020); <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0327-x>
375. D.M.Leinberger, V.Grimm, M.Rubtsova, Y.Weile, K.Schröppe, T.A.Wichelhaus, C.Knabbe, R.D.Schmid, T.T.Bachmann. *J. Clin. Microbiol.*, **48**, 460 (2010); <https://doi.org/10.1128/JCM.00765-09>
376. B.Shaskolskiy, I.Kandinov, D.Kravtsov, A.Vinokurova, S.Gorshkova, M.Filippova, A.Kubakov, V.Solomka, D.Deryabin, E.Dementieva, D.Gruadunov. *Polymers*, **13**, 3889 (2021); <https://doi.org/10.3390/polym13223889>
377. M.Y.Rubtsova, M.M.Ulyashova, M.V.Edelstein, A.M.Egorov. *Biosens. Bioelectron.*, **26**, 1252 (2010); <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.06.053>
378. Y.Song, F.Dou, S.He, Y.Zhou, Q.Liu. *BioMed. Res. Int.*, 8219748 (2019); <https://doi.org/10.1155/2019/8219748>
379. M.Yu.Rubtsova, M.M.Ulyashova, Yu.I.Pobolelova, G.V.Presnova, A.M.Egorov. *Appl. Biochem. Microbiol.*, **56**, 130 (2020); [*Прикл. биохим. микробиол.*, **56**, 123 (2020)]; <https://doi.org/10.1134/S000368382002012X>
380. S.Monecke, G.Coombs, A.C.Shore, D.C.Coleman, P.Akpaka, M.Borg, H.Ip.M.Chow, L.Jatzwauk, D.Jonas, K.Kadlec, A.Kearns, F.Laurent, F.G.O'Brien, J.Pearson, A.Ruppelt, S.Schwarz, E.Scicluna, P.Slickers, H.L.Tan, S.Weber, R.Ehrlich. *PLOS ONE*, **6**, e17936 (2011); <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017936>
381. P.Bogaerts, G.Cuzon, S.Evrard, M.Hoebeke, T.Naas, Y.Glupczynski. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **48**, 189 (2016); <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.05.006>
382. S.D.Braun, S.Monecke, A.Thürmer, A.Ruppelt, O.Makarewicz, M.Pletz, A.ReiBig, P.Slickers, R.Ehrlich. *PLOS ONE*, **9**, e102232 (2014); <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102232>
383. M.M.Ulyashova, G.V.Presnova, A.A.Filippova, V.G.Grigorenko, A.M.Egorov, M.Y.Rubtsova. *Curr. Issues Mol. Biol.*, **46**, 53 (2024); <https://doi.org/10.3390/cimb46010005>
384. M.Yu.Rubtsova, A.A.Filippova, N.K.Fursova, V.G.Grigorenko, G.V.Presnova, M.M.Ulyashova, A.M.Egorov. *J. Anal. Chem.*, **77**, 519 (2022) [*Журн. аналит. химии*, **77**, 393 (2022)]; <https://doi.org/10.1134/S1061934822050124>
385. U.Hanefeld, L.Gardossi, E.Magner. *Chem. Soc. Rev.*, **38**, 453 (2009); <https://doi.org/10.1039/B711564B>
386. J.Meyer, L.E.Meyer, S.Kara. *Eng. Life Sci.*, **22**, 165 (2022); <https://doi.org/10.1002/elsc.202100087>
387. M.Salehipour, S.Rezaei, M.Yazdani, M.Mogharabi-Manzari. *Polym. Bull.*, **80**, 5861 (2023); <https://doi.org/10.1007/s00289-022-04370-4>
388. N.C.Dubey, D.Gaur, B.P.Tripathi. *J. Polym. Sci.*, **61**, 1730 (2023); <https://doi.org/10.1002/pol.20230031>
389. A.Rodriguez-Abetxuko, D.Sánchez-deAlcázar, P.Muñumer, A.Beloqui. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **8**, 830 (2020); <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00830>
390. F.A.Plamper, W.Richtering. *Acc. Chem. Res.*, **50**, 131 (2017); <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00544>
391. S.Walta, D.V.Pergushov, A.Oppermann, A.A.Steinschulte, K.Geisel, L.V.Sigolaeva, F.A.Plamper, D.Wöll, W.Richtering. *Polymer*, **119**, 50 (2017); <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2017.05.008>
392. D.V.Pergushov, L.V.Sigolaeva, N.G.Balabushevich, T.Z.Sharifullin, M.Noyong, W.Richtering. *Polymer*, **213**, 123227 (2021); <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2020.123227>
393. L.V.Sigolaeva, D.V.Pergushov, S.Yu.Gladys, I.N.Kurochkin, W.Richtering. *Adv. Mater. Interfaces*, **9**, 2200310 (2022); <https://doi.org/10.1002/admi.202200310>
394. L.V.Sigolaeva, S.Yu.Gladys, A.P.H.Gelissen, O.Mergel, D.V.Pergushov, I.N.Kurochkin, F.A.Plamper, W.Richtering. *Biomacromolecules*, **15**, 3735 (2014); <https://doi.org/10.1021/bm5010349>
395. L.V.Sigolaeva, O.Mergel, E.G.Evtushenko, S.Yu.Gladys, A.P.H.Gelissen, D.V.Pergushov, I.N.Kurochkin, F.A.Plamper, W.Richtering. *Langmuir*, **31**, 13029 (2015); <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b03497>
396. L.V.Sigolaeva, S.Yu.Gladys, O.Mergel, A.P.H.Gelissen, M.Noyong, U.Simon, D.V.Pergushov, I.N.Kurochkin, F.A.Plamper, W.Richtering. *Anal. Chem.*, **89**, 6091 (2017); <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00732>
397. L.V.Sigolaeva, D.V.Pergushov, M.Oelmann, S.Schwarz, M.Brugnoni, I.N.Kurochkin, F.A.Plamper, A.Fery, W.Richtering. *Polymers*, **10**, 791 (2018); <https://doi.org/10.3390/polym10070791>
398. L.V.Sigolaeva, A.A.Shalybkova, T.Z.Sharifullin, D.V.Pergushov. *Micromachines*, **14**, 1629 (2023); <https://doi.org/10.3390/mi14081629>
399. L.V.Sigolaeva, O.V.Efremova, D.V.Pergushov. *Mendeleev Commun.*, **33**, 559 (2023); <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2023.06.038>
400. L.V.Sigolaeva, O.V.Efremova, D.V.Pergushov. *Mendeleev Commun.*, **34**, 100 (2024); <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2024.01.030>
401. I.N.Kurochkin, A.D.Vasilyeva, E.G.Evtushenko, A.V.Efremenko, D.V.Pergushov, L.V.Sigolaeva. *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **78**, 201 (2023) [*Вестн. Моск. ун-та. Серия 2. Химия*, **64**, 353 (2023)]; <https://doi.org/10.3103/S0002713142304003X>
402. Y.Yuan, N.Panwar, S.H.K.Yap, Q.Wu, S.Zeng, J.Xu, S.C.Tjin, J.Song, J.Qu, K.-T.Yong. *Coord. Chem. Rev.*, **337**, 112393 (2017); <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.02.006>
403. X.Wu, Y.Li, J.Wang, H.Zhou, X.Tang, Y.Yang, Z.Wang, D.Chen, X.Zhou, J.Guo, H.Cai, J.Zheng, P.Sun. *Anal. Chem.*, **92**, 15050 (2020); <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03017>
404. R.Liu, C.Xie, Y.Yan, L.Hu, S.Wang, K.A.Alamry, H.M.Marwani, L.Chen. *Nanomaterials*, **10**, 575 (2020); <https://doi.org/10.3390/nano10030575>

405. I.A.Larmour, K.Faulds, D.Graham. *Chem. Sci.*, **1**, 151 (2010); <https://doi.org/10.1039/C0SC00226G>
406. V.Liberman, K.Hamad-Schifferli, T.A.Thorsen, S.T.Wick, P.A.Carr. *Nanoscale*, **7**, 11013 (2015); <https://doi.org/10.1039/C5NR01974E>
407. N.Nechaeva, T.Prokopkina, G.Makhaeva, E.Rudakova, N.Boltneva, C.Dishovsky, A.Eremenko, I.Kurochkin. *Sensors Actuators, B: Chem.*, **259**, 75 (2018); <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.11.174>
408. J.J.Morsby, R.L.Thimes, J.E.Olson, H.H.McGarraugh, J.N.Payne, J.P.Camden, B.D.Smith. *ACS Omega*, **7**, 6419 (2022); <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c00139>
409. A.Ingram, B.D.Moore, D.Graham. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 1569 (2009); <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.02.030>
410. F.Soualmia, S.A.Touhar, L.Guo, Q.Xu, M.V.Garland, P.Colomban, A.Percot, C.El Amri. *J. Raman Spectrosc.*, **48**, 82 (2017); <https://doi.org/10.1002/jrs.4995>
411. C.Fu, L.Zhang, M.Bao, Y.Zhang, Y.Li, Y.Wu, Y.M.Jung. *Analyst*, **147**, 5718 (2022); <https://doi.org/10.1039/D2AN01505F>
412. E.G.Evtushenko, E.S.Gavrilina, A.D.Vasilyeva, L.V.Yurina, I.N.Kurochkin. *Molecules*, **29**, 793 (2024); <https://doi.org/10.3390/molecules29040793>
413. A.M.Kudryashova, A.G.Galstian, E.B.Faizuloev, A.Y.Olenin, G.V.Lisichkin, V.V.Zverev, O.V.Borisova. *J. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol.*, **95**, 25 (2018); <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-3-25-31>
414. W.Guo, Y.Hu, H.Wei. *Analyst*, **142**, 2322 (2017); <https://doi.org/10.1039/C7AN00552K>
415. A.G.Bozkurt, G.G.Buyukgoz, M.Soforoglu, U.Tamer, Z.Suludere, I.H.Boyaci. *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, **194**, 8 (2018); <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.12.057>
416. N.Li, H.Chen, M.Zhang, Y.Zha, Z.Mu, Y.Ma, P.Chen. *Sensors Actuators, B: Chem.*, **315**, 128135 (2020); <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128135>
417. W.Wang, Y.Zhang, W.Zhang, Y.Liu, P.Ma, X.Wang, Y.Sun, D.Song. *Anal. Chim. Acta*, **1183**, 338989 (2021); <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338989>
418. J.Feng, H.Lu, Y.Yang, W.Huang, H.Cheng, H.Kong, L.Li. *Microchim. Acta*, **188**, 280 (2021); <https://doi.org/10.1007/s00604-021-04928-5>
419. T.Pan, D.-W.Sun, J.Paliwal, H.Pu, Q.Wei. *J. Agric. Food Chem.*, **66**, 11180 (2018); <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03985>
420. J.Liang, H.Liu, C.Huang, C.Yao, Q.Fu, X.Li, D.Cao, Z.Luo, Y.Tang. *Anal. Chem.*, **87**, 5790 (2015); <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01011>
421. Y.Zeng, J.-Q.Ren, S.-K.Wang, J.-M.Mai, B.Qu, Y.Zhang, A.-G.Shen, J.-M.Hu. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **9**, 29547 (2017); <https://doi.org/10.1021/acsami.7b09336>
422. X.-H.Pham, E.Hahm, T.H.Kim, H.-M.Kim, S.H.Lee, S.C.Lee, H.Kang, H.-Y.Lee, D.H.Jeong, H.S.Choi, B.-H.Jun. *Nano Res.*, **13**, 3338 (2020); <https://doi.org/10.1007/s12274-020-3014-3>
423. B.Sharma, R.R.Frontiera, A.I.Henry, E.Ringe, R.P.Van Duyn. *Mater. Today*, **15**, 16 (2012); [https://doi.org/10.1016/s1369-7021\(12\)70017-2](https://doi.org/10.1016/s1369-7021(12)70017-2)
424. Y.S.Yamamoto, Y.Ozaki, T.Itoh. *J. Photochem. Photobiol. C*, **21**, 81 (2014); <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2014.10.001>
425. K.Ge, Y.Hu, G.Li. *Biosensors*, **12**, 941 (2022); <https://doi.org/10.3390/bios12110941>
426. M.Ceballos, A.Arizmendi-Morquecho, M.Sánchez-Domínguez, I.López. *Mater. Chem. Phys.*, **240**, 122225 (2020); <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2019.122225>
427. N.K.Gushiken, G.T.Paganoto, M.L.A.Temperini, F.S.Teixeira, M.C.Salvadori. *ACS Omega*, **5**, 10366 (2020); <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00133>
428. O.Gusel'nikova, H.Lim, H.J.Kim, S.H.Kim, A.Gorbulova, M.Eguchi, P.Postnikov, T.Nakanishi, T.Asahi, J.Na, Y.Yamauchi. *Small*, **18**, 2107182 (2022); <https://doi.org/10.1002/sml.202107182>
429. L.M.Almehmadi, S.M.Curley, N.A.Tokranova, S.A.Tenenbaum, I.K.Lednev. *Sci. Rep.*, **9**, 12356 (2019); <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48650-y>
430. N.Schwenk, B.Mizaikoff, S.Cárdenas, Á.I.López-Lorente. *Analyst*, **143**, 5103 (2018); <https://doi.org/10.1039/C8AN00804C>
431. X.Gu, Y.Yan, G.Jiang, J.Adkins, J.Shi, G.Jiang, S.Tian. *Anal. Bioanal. Chem.*, **406**, 1885 (2014); <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7587-5>
432. W.Ruan, W.Ji, X.Xue, Y.Cui, L.Chen, T.Zhou, L.Niu, X.Li, J.Zhang, B.Zhao. *J. Raman Spectrosc.*, **42**, 1492 (2011); <https://doi.org/10.1002/jrs.2892>
433. I.Boginskaya, M.Sedova, A.Baburin, K.Afanas'ev, A.Zverev, V.Echeistov, V.Ryzhkov, I.Rodionov, B.Tonanaiskii, I.Ryzhikov, A.Lagarkov. *Appl. Sci.*, **9**, 3988 (2019); <https://doi.org/10.3390/app9193988>
434. I.A.Boginskaya, E.A.Slipchenko, M.V.Sedova, J.Y.Zvyagina, A.D.Maximov, A.S.Baburin, I.A.Rodionov, A.M.Merzlikin, I.A.Ryzhikov, A.N.Lagarkov. *Chemosensors*, **11**, 321 (2023); <https://doi.org/10.3390/chemosensors11060321>
435. I.Boginskaya, N.Nechaeva, V.Tikhomirova, O.Kryukova, V.Evdokimov, N.Bulaeva, E.Golukhova, I.Ryzhikov, O.Kost, K.Afanasev, K.Vereshchagin, I.Kurochkin. *J. Raman Spectrosc.*, **52**, 1529 (2021); <https://doi.org/10.1002/jrs.6068>
436. I.Boginskaya, R.Safiullin, V.Tikhomirova, O.Kryukova, N.Nechaeva, N.Bulaeva, E.Golukhova, I.Ryzhikov, O.Kost, K.Afanasev, I.Kurochkin. *Biomedicines*, **10**, 1389 (2022); <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061389>
437. E.A.Slipchenko, I.A.Boginskaya, R.R.Safiullin, I.A.Ryzhikov, M.V.Sedova, K.N.Afanasev, N.L.Nechaeva, I.N.Kurochkin, A.M.Merzlikin, A.N.Lagarkov. *Chemosensors*, **10**, 520 (2022); <https://doi.org/10.3390/chemosensors10120520>
438. S.D.Varfolomeev, I.V.Berezin. *J. Mol. Catal.*, **4**, 387 (1978) [https://doi.org/10.1016/0304-5102\(78\)80009-1](https://doi.org/10.1016/0304-5102(78)80009-1)
439. *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry.* (Ed. P.R.Ortiz de Montellano). (New York: Springer, 2015); <https://doi.org/10.1007/978-3-319-12108-6>
440. L.Mi, Z.Wang, W.Yang, C.Huang, B.Zhou, Y.Hu, S.Liu. *Trends Anal. Chem.*, **158**, 116791 (2023); <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116791>
441. S.Krishnan. *Curr. Opin. Electrochem.*, **19**, 20 (2020); <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2019.09.004>
442. V.A.Kostin, V.A.Zolottsev, A.V.Kuzikov, R.A.Masamrekh, V.V.Shumyantseva, A.V.Veselovsky, S.V.Stulov, A.Y.Misharin, R.A.Novikov, V.P.Timofeev. *Steroids*, **115**, 114 (2016); <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2016.06.002>
443. V.V.Shumyantseva, T.V.Bulko, P.I.Koroleva, E.V.Shikh, A.A.Makhova, M.S.Kisel, I.V.Haidukevich, A.A.Gilep. *Processes*, **10**, 383 (2022); <https://doi.org/10.3390/pr10020383>
444. V.V.Shumyantseva, A.A.Makhova, T.V.Bulko, A.V.Kuzikov, E.V.Shikh, V.G.Kukes, A.I.Archakov. *RSC Adv.*, **5**, 71306 (2015); <https://doi.org/10.1039/c5ra09998f>
445. П.И.Королева, А.В.Кузиков, Р.А.Масамрех, Д.А.Филимонов, А.В.Дмитриев, М.Г.Завьялова, С.М.Рыкова, Е.В.Ших, А.А.Махова, Т.В.Булко, А.А.Гилеп, В.В.Шумянцева. *Биомед. химия*, **66**, 241 (2020); <https://doi.org/10.18097/PBMC20206603241>
446. V.V.Shumyantseva, P.I.Koroleva, T.V.Bulko, G.V.Sergeev, S.A.Usanov. *Drug Metab. Pers. Ther.*, **37**, 241 (2022); <https://doi.org/10.1515/dmpt-2021-0116>
447. V.V.Shumyantseva, T.V.Bulko, A.V.Kuzikov, R.A.Masamrekh, A.Yu.Konyakhina, Iu.Romanenko, J.B.Max, M.Köhler, A.A.Gilep, S.A.Usanov, D.V.Pergushov, F.H.Schacher, L.V.Sigolaeva. *Electrochim. Acta*, **336**, 135579 (2020); <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2019.135579>
448. A.V.Kuzikov, T.A.Filippova, R.A.Masamrekh, V.V.Shumyantseva. *J. Electroanal. Chem.*, **904**, 115937 (2022); <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.115937>

449. V.V.Shumyantseva, P.I.Koroleva, A.A.Gilep, K.S.Napolskii, Y.D.Ivanov, S.L.Kanashenko, A.I.Archakov. *Dokl. Biochem. Biophys.*, **506**, 215 (2022) [*Докл. АН*, **506**, 62 (2022)]; <https://doi.org/10.1134/S1607672922050131>
450. P.I.Koroleva, A.A.Gilep, S.V.Kraevskiy, T.V.Tsybruk, V.V.Shumyantseva. *Biosensors*, **13**, 457 (2023); <https://doi.org/10.3390/bios13040457>
451. V.V.Shumyantseva, P.I.Koroleva, T.V.Bulko, T.V.Shkel, A.A.Gilep, A.V.Veselovsky. *Bioelectrochemistry*, **149**, 108277 (2023); <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108277>
452. V.V.Shumyantseva, P.I.Koroleva, T.V.Bulko, L.E.Agafonova. *Processes*, **11**, 1801 (2023); <https://doi.org/10.3390/pr11061801>
453. P.I.Koroleva, T.V.Bulko, L.E.Agafonova, V.V.Shumyantseva. *Biochemistry (Moscow)*, **88**, 1645 (2023) [*Биохимия*, **88**, 1985 (2023)]; <https://doi.org/10.1134/S0006297923100176>
454. V.D.Nikitushkin, M.O.Shleeva, A.I.Zinin, K.A.Trutneva, D.N.Ostrovsky, A.S.Kaprelyants. *FEMS Microbiol. Lett.*, **363**, 19 (2016); <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw206>
455. I.A.Gligonov, D.I.Bagaeva, G.R.Demina, G.N.Vostroknutova, D.S.Vorozhtsov, A.S.Kaprelyants, A.P.Savitsky, M.O.Shleeva. *BBA: Biomembranes*, **1866**, 3 (2024); <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2024.184270>
456. I.D.Solovyev, A.V.Gavshina, A.S.Katti, A.I.Chizhik, L.M.Vinokurov, G.D.Lapshin, T.V.Ivashina, M.G.Khrenova, I.I.Kireev, I.Gregor, J.Enderlein, A.P.Savitsky. *Sci. Rep.*, **8**, 15542 (2018); <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33250-z>
457. I.D.Solovyev, L.G.Maloshenok, A.P.Savitsky. *Materials*, **15**, 4962 (2022) <https://doi.org/10.3390/ma15144962>
458. A.Xiao, A.E.Gibbons, K.E.Luker, G.D.Luker. *Tomography*, **1**, 115 (2015); <https://doi.org/10.18383/j.tom.2015.00163>
459. A.P.Savitsky, A.L.Rusanov, V.V.Zherdeva, T.V.Gorodnicheva, M.G.Khrenova, A.V.Nemukhin. *Theranostics*, **2**, 215 (2012); <https://doi.org/10.7150/thno.3885>
460. A.B.Kononov, V.V.Vlasov, S.I.Samarin, I.D.Soloviev, A.P.Savitsky, V.V.Tuchin. *J. Biomed. Opt.*, **27**, 12 (2022); <https://doi.org/10.1117/1.JBO.27.12.126001>