

М 16/9

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт Фундаментальной биологии и Биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

/ Заведующий кафедрой

 Т.Г.Волова

подпись

« 20 » июня 20 16 г.


МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Иммобилизация ферментов на модифицированные наноалмазы детонационного синтеза

06.04.01-Биология

06.04.01.09 Фундаментальная прикладная биология

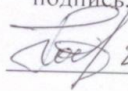
Руководитель

 20.06.16

Доцент, к.м.н. А.В.Барон

подпись, дата

Выпускник

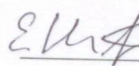
 20.06.16 БФ14-06М 041404559

Е.Д.Посохина

подпись, дата

номер группы, зачетной книжки

Рецензент

 20.06.16

Доцент, к.б.н. Е.В.Инжеваткин

подпись, дата

Красноярск 2016

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Иммобилизация ферментов на модифицированные наноалмазы детонационного синтеза» содержит 54 страниц текстового документа, 17 иллюстраций, 4 таблицы, 66 использованных источников.

НАНОАЛМАЗ, МОДИФИЦИРОВАННЫЙ НАНОАЛМАЗ, ФЕРМЕНТ, ИММОБИЛИЗАЦИЯ

В последнее время все активней ведутся работы, связанные с созданием новых лекарственных средств или созданием новых лекарственных форм уже известных препаратов на основе ферментов. Одним из путей модификации лекарственных средств является их иммобилизация на носители. В ряде случаев такая иммобилизация позволяет либо усилить терапевтический эффект целевой молекулы, либо замедлить ее распад. Целью данной работы являлось изучение возможности применения наноалмазов детонационного синтеза в качестве носителя для иммобилизации ферментов, применяемых с медицинскими целями.

Для того, что бы достичь поставленной цели, были поставлены следующие задачи:

1. Осуществить ковалентную сорбцию лизоцима на модифицированные наноалмазы детонационного синтеза.
2. Осуществить ковалентную сорбцию гиалуронидазы на модифицированные наноалмазы детонационного синтеза.
3. Произвести проверку активности полученных наноалмаз-ферментных комплексов.

В ходе проведенных исследований установлено, что наноалмазы детонационного синтеза, поверхность которых предварительно была активирована бензохиноном, могут быть использованы для создания на их основе комплексов МНА-Лизоцим. В результате сравнительной оценки антибактериальной активности свободного и ковалентно связанного с наноалмазами лизоцима с использованием в качестве модельной мишени грамотрицательных светоизлучающих бактерий *Photobacterium phosphoreum* было показано, что лизоцим сохраняет свою активность.

Также удалось провести ковалентную сорбцию на модифицированные наноалмазы детонационного синтеза еще одного фермента – гиалуронидазы.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 Обзор литературы.....	8
1.1 Физико-химические свойства нанодалмазов	8
1.1.1 Нанодалмазы детонационного синтеза	8
1.1.2 Особенности нанодалмазов детонационного синтеза.....	10
1.2 Модифицированные нанодалмазы (МНА)	12
1.2.1 Свойства модифицированных нанодалмазов детонационного синтеза	13
1.3 Иммобилизация ферментов.....	14
1.3.1 Преимущества иммобилизованных ферментов.....	15
1.3.2 Виды иммобилизации ферментов	16
1.4 Лизоцим. Основные свойства	20
1.5 Гиалуронидаза. Основные свойства.....	24
1.6 <i>Photobacterium phosphoreum</i>	28
2 Материалы и методы исследования	30
2.1 Используемые ферменты	30
2.1.1 Лизоцим (Lysozyme).....	30
2.1.2 Гиалуронидаза (Hyaluronidase).....	31
2.2 Используемые модифицированные нанодалмазы	32
2.3 Используемые бактерии	32
2.4 Спектрофотометрия	32
2.5 Получение культуры клеток для эксперимента.....	33
2.6 Активация МНА	34
2.7 Ковалентная иммобилизация фермента на частицы МНА.....	34
2.8 Проверка работоспособности комплекса	35

3	Результаты и обсуждение.....	36
3.1	Проверка восприимчивости <i>Photobacterium phosphoreum</i> к лизоциму Ошибка! Закладка не определена.	
3.2	Проверка функциональной активности лизоцима при различных концентрациях фермента..... Ошибка! Закладка не определена.	
3.3	Получение комплекса МНА-Лизоцим Ошибка! Закладка не определена.	
3.4	Проверка работоспособности комплекса МНА-Лизоцим Ошибка! Закладка не определена.	
3.5	Определение оптимального соотношения фермент/МНА при ковалентной иммобилизации..... Ошибка! Закладка не определена.	
3.6	Получение комплекса МНА-Гиалуронидаза Ошибка! Закладка не определена.	
3.7	Определение количества фермента иммобилизованного на МНА при разных весовых соотношениях фермент : МНА Ошибка! Закладка не определена.	
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	37
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	38

ВВЕДЕНИЕ

В 1959 году Нобелевский лауреат по физике Ричард Фейнман в своей лекции «Внизу полным-полно места» (Feynman, R.P. 1961. There is plenty of room at the bottom. In Miniaturization. New York: Reinhold) рассказывал о перспективах, которые сулит изготовление материалов и устройств на атомном и молекулярном уровне [1]. Однако, только после появления необходимого оборудования в 1980-х годах, стало возможным изучение и создания подобных структур. Одновременно с этим были усовершенствованы вычислительные техники, которые позволили прогнозировать характеристики материалов, имеющих наноразмеры. Все это стимулировало научное общество к изучению свойств и созданию новых наноматериалов [1].

В связи с накоплением за последние десятилетия обширного объема информации о наноматериалах научным обществом было принято понятие «нанонаука». Нанонаука занимается исследованием свойств вещества в нанометровом масштабе, т.е., изучением объектов, размер которых лежит в интервале от 1-100 нм [2,3]. Помимо изучения свойств существующих нанообъектов ученые занимаются созданием новых наноразмерных материалов и систем на основе наноразмерных объектов. Процесс конструирования приборов и систем, свойства которых определяются их формой и размером на нанометровом уровне, получил название нанотехнологии [4].

Нанотехнологии в настоящее время бурно развиваются, так как они позволяют открывать новые возможности для решения широкого спектра задач, возникающих в различных сферах деятельности человека. Новые

наноматериалы и нанотехнологии стремительно вводятся в биологию, биотехнологию, медицину.

В 1992 году был основан первый Международный комитет по наноструктурированным наноматериалам (International Committee on Nanostructured Materials). Под эгидой этого комитета каждые два года проводится Международная конференция по наноструктурированным материалам. Цель конференции заключается в обсуждении последних открытий в области нанотехнологий, глобальных тенденций, обмене новыми идеями, концепциями, методиками и перспективами. В 2014 году конференция проходила в России (NANO 2014) на базе Московского государственного университета (МГУ). Конференция NANO 2016 будет проходить в августе в Канаде [5].

В России в 2008 году была создана Общероссийская общественная организация «Нанотехнологическое общество России» (НОР). Главной целью НОР, по данным с официального сайта, является «развитие творческой активности своих членов, удовлетворение их научных, профессиональных интересов и информационного обеспечения, а также эффективное использование кооперации интеллектуальных и производственных сил, граждан и организаций для развития nanoиндустрии в России, содействие в реализации научных разработок в коммерчески эффективных промышленных проектах». По данным на 2011 год в состав НОР входит 19 членов из Красноярского края [6]. В мире же каждый год проводится большое количество конференций, семинаров, посвященных наноматериалам, нанотехнологиям и с каждым годом интерес становится все больше. Одним из таких наноматериалов являются наноалмазы.

Наибольший интерес для специалистов, работающих в этой области, представляют модифицированные наноалмазы (МНА) детонационного синтеза, образующие в водной среде устойчивые дисперсные системы и легко адаптируемые для медико-биологических исследований [7]. Производство

наноалмазов детонационного синтеза осуществляется в ряде зарубежных стран (например, в Китае, Украине, Болгарии), но первенство в разработке этого метода принадлежит российским и американским ученым.

На протяжении многих лет наноалмазы применяли только для решения технических задач. Однако, физико-химические свойства этих наночастиц позволяют говорить о перспективности их применения в биотехнологии в качестве нового адсорбента для разработки эффективных методов сепарации и очистки биополимеров и конструирования систем индикации и адресной доставки веществ [8]. Но до недавнего времени проведение экспериментов с наноалмазами детонационного синтеза было затруднено, так как они обладают малой коллоидной устойчивостью в гидрозольях и быстро образуют осадок. Это не позволяло получить гидрозоли с точной концентрацией частиц, осуществлять их стерилизацию, хранить в замороженном состоянии и применять в длительных медико-биологических экспериментах [9].

В настоящее время в ИБФ СО РАН разработаны технологии получения модифицированных наноалмазов, обладающих высокой коллоидной устойчивостью в дисперсионных средах, адаптированных для медико-биологических исследований [10,11]. Получение модифицированных наноалмазов, обладающих повышенной коллоидной стабильностью и не требующих применения каких-либо стабилизирующих добавок для получения устойчивых гидрозолей [12], открыло возможность проведения длительных экспериментов медико-биологического характера на лабораторных животных.

В ходе исследований, проводимых в институте биофизики СО РАН, было показано, что МНА могут применяться как полифункциональный адсорбент для экспресс-выделения и очистки целевых белков из рекомбинантных источников и природных объектов и дополнительной очистки белковых препаратов, поставляемых коммерческими фирмами [13].

Ранее было установлено, что ферменты, адсорбированные на наноалмазах, сохраняют свою каталитическую функцию, что позволяет

создавать на основе наноалмазов и ферментов комплексы, которые могут найти применение в таких областях, как медицина и биология [14].

1 Обзор литературы

1.1 Физико-химические свойства наноалмазов

В последние годы наблюдается заметный рост количества исследований, посвященных изучению путей и возможностей применения наноразмерных частиц разной физико-химической природы в биологических и медицинских целях. Исследования, проводимые в данном направлении, позволяют выйти на совершенно новый качественный уровень решения проблем, существующих в различных сферах биологии и медицины [8].

Список исследуемых объектов и задач, которые пытаются решить с помощью наноразмерных частиц, весьма широк. При этом особый интерес для специалистов, работающих в области биологии и медицины, представляют частицы наноалмаза, получаемые детонационным способом [15].

Наноалмазы имеют классическую углеродную кристаллическую решётку типа алмаза. Наноалмазы, или ультрадисперсные алмазы, можно рассматривать как специфический наноуглеродный материал, входящий в обширное и все более популярное семейство наноуглеродных кластеров [16]. Одной из особенностей наноалмазов является то, что их физико-химические свойства существенным образом зависят от метода получения. В настоящее время широкое распространение получил метод детонационного синтеза.

1.1.1 Наноалмазы детонационного синтеза

Наноалмазы, или ультрадисперсные алмазы (УДА), детонационного синтеза получают путем взрыва конденсированного взрывчатого вещества в замкнутом пространстве при условии отрицательного кислородного баланса

[17]. Их синтез осуществляется при давлении от 16 до 23 ГПа и температуре выше 300 К, т.е., в условиях термодинамической стабильности алмаза [18]. Наноалмазы детонационного синтеза представляют собой наночастицы со средним размером от 4-6 нм (Рисунок 1) [19], преимущественно имеющих сферическую форму [18,21].

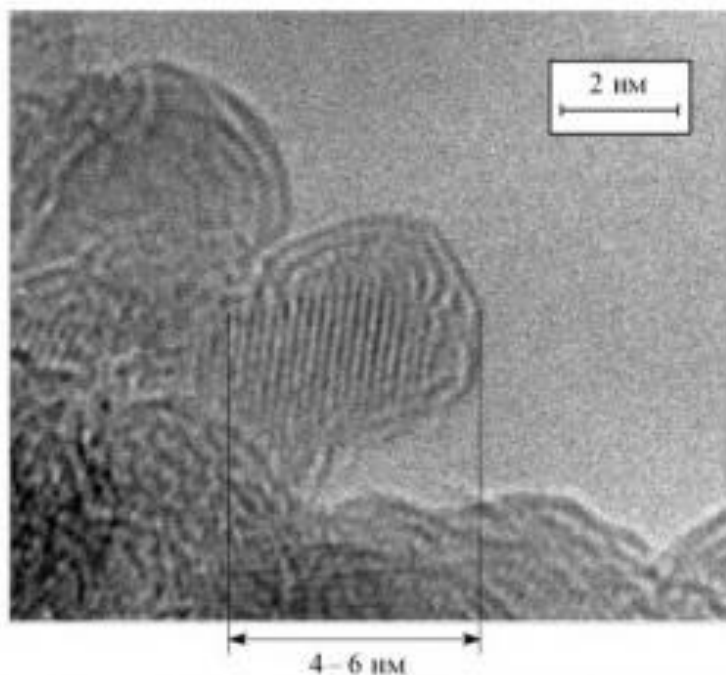


Рисунок 1 – Микрофотография индивидуальной частицы наноалмаза

Каждая частица НА является надмолекулой, имеющей монокристаллическое алмазное ядро и покров из функциональных групп, связанных с ним. Функциональные группы, образующие покров, определяют химическое состояние поверхности частицы [20,21]. Состав функциональных групп может быть различен и зависит от условий синтеза, методов очистки и последующей обработки. Это могут быть углеводородные группы – метиновые, метиленовые, метильные, кислородосодержащие – гидроксильные, карбонильные и альдегидные, карбоксильные, эфирные и ангидридные, серосодержащие и азотосодержащие группы – сульфогруппы, нитрогруппы, аминные, амидные и многие другие [18].

Наноалмазы детонационного синтеза склонны к образованию агрегатов, что обусловлено высокой поверхностной энергией частиц и наличием полифункционального слоя на их поверхности. Причем, происходит образование агрегатов как первого (более прочные), так и второго (менее прочные) порядка (Рисунок 2) [17, 18].

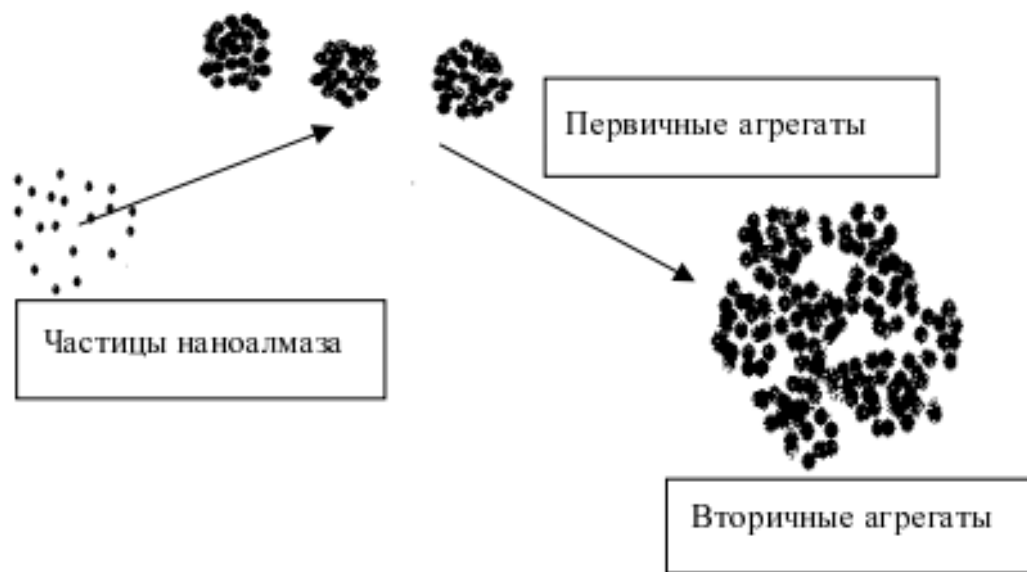


Рисунок 2 – Схема агрегации частиц наноалмаза

Помимо функциональных групп, которые являются неотъемлемой частью НА, на его поверхности может находиться ряд трудноудаляемых летучих и твердофазных примесей [18,19,20]. Поэтому перед работой с наноалмазами необходимо проведение очистки. Очистку наноалмазов проводят различными способами (это может быть очистка водой, кислотами, ионообменными солями или термообработка и др.), но полностью удалить все примеси не представляется возможным [21,22,23]. В настоящее время методы очистки позволяют удалить порядка 95% примесей [18].

1.1.2 Особенности наноалмазов детонационного синтеза

Интерес именно к наноалмазам детонационного синтеза вызван тем, что они обладают рядом необычных свойств, позволяющим говорить о перспективе их применения в нетрадиционных областях - биологии и медицине [24,25]. К таким свойствам относят адсорбционную способность наноалмазов, их каталитическая активность, биосовместимость и нетоксичность для организма. [26, 27].

Благодаря исследованиям, проводимым последние 15 лет в Институте биофизики СО РАН, были получены важные результаты, свидетельствующие о возможности создания на основе детонационных наноалмазов новых нанотехнологий и наноматериалов биолого-медицинского назначения [15].

Высокие адсорбционные свойства наноалмазов по отношению к соединениям биологической и небиологической природы позволяют говорить о перспективности их применения в медицинских целях в качестве нового адсорбента и энтеросорбента для связывания и нейтрализации нежелательных и токсичных соединений, а также как носителя лекарственных препаратов [15,25].

Установлено, что наноалмазы проявляют каталитическую активность в органических реакциях [25], благодаря чему появляется возможность использовать данный материал не только как адсорбент, но и как катализатор дезактивации, например, микотоксинов [24].

Результаты исследований на разных видах животных свидетельствуют о высокой биосовместимости и малой токсичности наноалмазов. Показано, что при длительном пероральном введении гидрозолей наночастиц мышам не происходит их гибели, не наблюдается физиологических и морфологических изменений отдельных органов и организма в целом. Гидрозоли НА не влияют на репродуктивную функцию, но приводят к заметным изменениям биохимического и клеточного состава крови подопытных животных [28]. Наблюдаемые эффекты могут быть обусловлены действием наноалмазов как энтеросорбента и, вероятно, неспецифическим иммунным ответом организма животных на наночастицы [26, 27, 29]. При подкожных и

внутримышечных инъекциях стерильных зольей наноалмазов мышам и крысам не происходит гибели животных, не наблюдается признаков воспалительного процесса (по результатам визуальных наблюдений и гистологических исследований), не отмечается деструкция клеток (данные электронной микроскопии); частицы были длительно локализованы непосредственно в местах инъекций и не подвергались заметному рассасыванию [14,27,30].

При внутривенном введении кроликам и собакам стерильных зольей наноалмазов в растворе глюкозы с различными вариациями концентраций наночастиц и объемов вводимых препаратов показано, что животные не погибают. Исследования с помощью ЭКГ и УЗИ существенных изменений в характере сердечной деятельности и состоянии внутренних органов животных не выявили [15]. При этом НА способны адсорбировать на себя белковые фракции крови, билирубин, ионы кальция и магния, креатин, мочевую кислоту, но не адсорбируют глюкозу и мочевины [29].

Приведенные выше результаты свидетельствуют о широте новых возможных применений наноалмазов детонационного синтеза и свидетельствуют о перспективности их использования как основы для разработки и создания новых материалов, технологий и методов биологического и медицинского назначения [14].

1.2 Модифицированные наноалмазы (МНА)

На поверхности наноалмазов всегда имеется покров из функциональных групп природа которых зависит от условий и способа синтеза наноалмазов, способов их выделения и очистки [21]. Именно эти поверхностные группы определяют основные физико-химические свойства наноалмазов [31]. Изменение физико-химических свойств наноалмаза посредством модификации алмазного ядра фактически невозможно. Поэтому для придания определенных свойств алмазным наночастицам проводят модификацию функциональных

групп, образующих покров наноалмаза [21]. В результате изменения поверхности НА исследователям удалось получить модифицированные наноалмазы (МНА), лишенные ряда недостатков [12].

1.2.1 Свойства модифицированных наноалмазов детонационного синтеза

МНА имеют ряд очень важных для работы с ними свойств:

1. Они обладают высокой коллоидной устойчивостью частиц и образуют стабильные гидрозолы, что позволяет готовить препараты с определенной весовой концентрацией частиц.

2. В гидrozолях МНА не образуют осадок или агрегаты после автоклавирования, что позволяет использовать их в исследованиях, требующих стерильных условий.

3. Гидрозолы МНА сохраняют коллоидную устойчивость после замораживания-оттаивания, что очень удобно для создания запасов и их длительного хранения.

4. Многочисленные функциональные группы на поверхности МНА позволяют ковалентно связывать с этими частицами самые разнообразные органические молекулы, включая ферментативные белки.

Все эти свойства позволяют проводить с МНА биологические исследования наравне с другими реагентами [9,12, 32].

Но МНА не являются идеальными. Об этом, например, свидетельствует снижение их коллоидной устойчивости при многократном высушивании гидрозолей [9,12].

Одним из перспективных направлений, применения МНА является конструирование на их основе новых средств биохимической индикации (включая системы многоразового использования), расширяющих арсенал методов лабораторной диагностики [13,32].

1.3 Иммобилизация ферментов

Ферменты (энзимы) – это биокатализаторы белковой природы, которые принимают участие в химических реакциях в организме. Ферменты принимают участие в катализе большинства процессов происходящих в организме – 1) реакциях синтеза и распада веществ, 2) процессах переваривания и всасывания, 3) освобождения энергии, 4) обеспечивают координацию биохимических реакций. Нарушение синтеза или активности ферментов приводит к возникновению болезней [33].

Ферменты - вещества белковой природы и поэтому неустойчивы при хранении, главным образом, из-за чувствительности к тепловым воздействиям, изменениям pH и химического состава среды. Кроме того, ферменты не могут быть использованы многократно из-за трудностей в отделении их от субстратов и продуктов реакции. В ряде случаев, решить такие проблемы помогает применение иммобилизованных ферментов. Начало методу иммобилизации ферментов было положено в 1916 году, когда впервые удалось адсорбировать на угле инвертазу, и было показано, что после этого фермент сохраняет каталитическую активность. Сам термин “иммобилизованные ферменты” узаконен в 1971 году, и означает любое ограничение свободы передвижения белковых молекул в пространстве [33,34]. В России исследованиям в области иммобилизованных ферментов как новому научному направлению стало уделяться повышенное внимание с начала 1970-х годов.

Сущность иммобилизации ферментов — прикрепление их в активной форме к нерастворимой основе или заключение в полупроницаемую мембранную систему [35,36]. Прикрепление фермента к носителю осуществляется адсорбционно, химической связью, или путем механического включения фермента в органический или неорганический гель (в капсулу, и т. п.). При

этом допускается прикрепление фермента только за счет функциональных групп, не входящих в активный центр фермента и не участвующих в образовании фермент-субстратного комплекса [37]. Носитель фермента, или матрица, может иметь вид зернистого материала, волокнистой структуры, пластинчатой поверхности, пленок или тканей, полых волокон, трубочек, капсул и т.д. [38]. Имеет значение размер частиц носителя. Важно иметь большую суммарную поверхность носителя, поэтому рекомендуются небольшие частицы диаметром 0,1—0,2 мм. Носитель фермента может быть как природное вещество, так и синтетический полимер [11].

1.3.1 Преимущества иммобилизованных ферментов

Преимущества иммобилизованных ферментов перед нативными предшественниками:

1. Гетерогенный катализатор легко отделим от реакционной среды, что дает возможность остановить реакцию в любой момент, использовать фермент повторно, а также получать чистый от фермента продукт.

2. Ферментативный процесс с использованием иммобилизованных ферментов можно проводить непрерывно, регулируя скорость катализируемой реакции и выход продукта.

3. Модификация фермента целенаправленно изменяет его свойства, такие как специфичность (особенно в отношении макромолекулярного субстрата), зависимость каталитической активности от рН, ионного состава и других параметров среды, при этом возможно повышение стабильности к денатурирующим воздействиям.

4. Можно регулировать каталитическую активность иммобилизованных ферментов путем изменения свойств носителя действием физических факторов, таких, как свет, температура, интенсивность магнитного поля, звук. Иммобилизовать ферменты можно как путем связывания на нерастворимых

носителях, так и путем внутримолекулярной или межмолекулярной сшивки белковых молекул низкомолекулярными бифункциональными соединениями, а также путем присоединения к растворимому полимеру [38].

1.3.2 Виды иммобилизации ферментов

Существуют две группы методов закрепления ферментов на носителе (Рисунок 3) [39,60].

1. Физические методы иммобилизации – без возникновения ковалентных связей между ферментом и носителем.
2. Химические методы иммобилизации – с образованием ковалентной связи между ферментом и носителем.

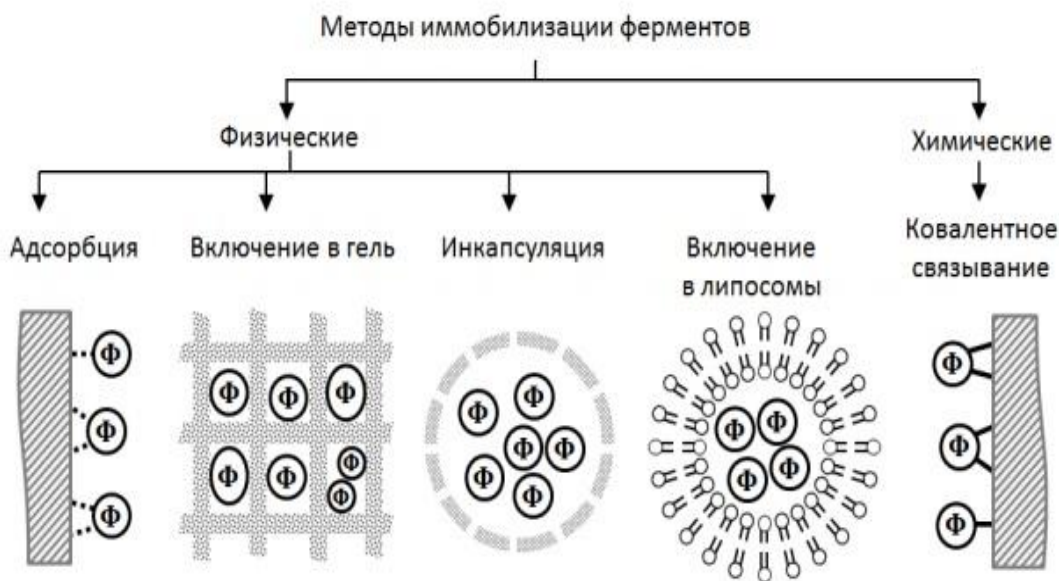


Рисунок 3 – Методы иммобилизации ферментов

1. Метод иммобилизации путем *адсорбции*.

Адсорбционная иммобилизация является самым простым способом иммобилизации. Уже в 1916 году Дж.Нельсон (G.Nelson) и Э. Гриффин

(E.Griffin) провели успешную иммобилизацию инвертазы на активированный уголь и гель гидроксида алюминия, используя этот метод [40].

Этот метод основан на фиксировании фермента на поверхности различных материалов. Носителями могут быть: неорганические материалы (стекло, силикагель, бентонит, оксид алюминия, диоксид титана и др.); природные полимеры (целлюлоза, коллаген); синтетические полимеры (нейлон, полиэтилен, полипропилен) [40].

Удержание адсорбированной молекулы ферменты на носителе может осуществляться неспецифическим Ван-дер-Ваальсовым взаимодействием, электростатическими взаимодействиями, водородными связями и гидрофобным взаимодействием между носителем и поверхностными группами белка [40].

Адсорбция - это самый простой метод иммобилизации ферментов на поверхности нерастворимого носителя [40,39]. К числу основных преимуществ метода адсорбционной иммобилизации относится доступность и дешевизна сорбентов, простота применяемых методик. Также этот метод позволяет решить проблему очистки фермента, т.к. в большинстве случаев связывание белка с носителем специфично.

К недостаткам данного метода можно отнести недостаточно высокую плотность и прочность связывания между белком и носителем.

2 Ковалентное связывание с носителем.

При такой иммобилизации новые ковалентные связи образуются между активированными группами носителя и реакционно-способными группами боковой цепи белка [34, 33]. Препараты, полученные таким методом иммобилизации, обладают рядом очень важных свойств. Во-первых, ковалентная связь, образовавшаяся между носителем и ферментом, обеспечивает высокую прочность образовавшегося комплекса. Во-вторых,

химическая модификация фермента способна приводить к изменениям таких свойств, как субстратная специфичность, каталитическая активность и стабильность [40]. Именно ковалентное связывание позволяет получить комплекс, в котором фермент обладает наибольшей стабильностью.

Процесс образования ковалентных связей обычно идет между функциональными группами на носителе и активными группами на ферменте. Чаще всего на ферменте используется аминогруппа. Обусловлено это тем, что аминогрупп на ферменте достаточно много, они обладают высокой реакционной способностью и, обычно, играют второстепенную роль в поддержании структуры и функции ферментов [40]. Как правило, перед проведением ковалентного вида пришивки носители сначала активируют (активацию аффинных носителей проводят, например, бромцианом) [35, 36].

3 Включение фермента в гелевые структуры.

Суть этого метода иммобилизации заключается во включении молекулы фермента в трехмерную сетку из тесно переплетенных полимерных цепей, образующих гель [40, 41]. Расстояние между полимерными цепями позволяет субстрату подходить к ферменту и уходить продукту реакции, но не позволяет молекулам ферментов выйти в среду.

Существует два основных способа такой иммобилизации. При одном из них фермент помещают в водный раствор мономера, а затем проводят полимеризацию, в результате чего образуется полимерный гель с включенными в него молекулами фермента [35,41]. В другом случае фермент вносят в раствор готового полимера, который затем каким-либо образом переводят в гелеобразное состояние. Способ иммобилизации ферментов путем включения в полимерный гель позволяет создавать препараты любой геометрической конфигурации, обеспечивая при этом равномерное распределение биокатализатора в объеме носителя, что важно для сохранения максимальной каталитической активности [37, 40].

Способ иммобилизации посредством включения фермента в гель отличается простотой технологии, позволяет создавать ферментные комплексы любой геометрической конфигурации. Кроме того, применение некоторых носителей позволяет создавать системы многократного использования.

Основной недостаток этого способа заключается в том, что полимерные цепи затрудняют процесс диффузии субстрата к ферменту. Если в роли субстрата выступает высокомолекулярное соединение, то данный метод не может быть применен [40].

4 Инкапсулирование.

Способ был разработан в 1964 году Т.Чангом (Thomas Chang). Суть метода заключается во включении фермента внутрь микрокапсулы, имеющей тонкую полимерную стенку. Достоинства этого метода – простота, универсальность, возможность многократного использования нативного фермента (фермент может быть отделен от непрореагировавшего субстрата и продуктов реакции процедурой простого фильтрования). Недостаток – невозможность инкапсулированных ферментов осуществлять превращения высокомолекулярных субстратов [40].

5 Включение в липосомы.

Впервые этот метод был использован в 1970 году Дж.Сессом (G. Sessa) и Вайсманом (G. Weissmann). Метод заключается во включении водного раствора ферментов в липосомы, т.е. липидные шарики. Оставшуюся тонкую плёнку липидов выдерживают в водном растворе, содержащем фермент. В процессе выдержки происходит самовпитывание (самосборка) липидных структур липосомы, содержащих данный раствор фермента. Ферменты, иммобилизованные путём включения в структуру липосом, используют преимущественно в медицинских и биотехнологических целях [40,34].

1.4 Лизоцим. Основные свойства

Лизоцим открыт Александром Флемингом (Alexander Fleming) в 1922 г., в кристаллическом виде получен в 1937 г. Абрахэмом (E.P. Abraham) и Робинсоном (R. Robinson). К 1963 г. установлена его первичная структура [42,43]. В 1965 была сконструирована первая полная модель молекулы лизоцима с использованием метода рентгеноструктурного анализа. На рисунке 4 можно увидеть трехмерную структуру лизоцима.

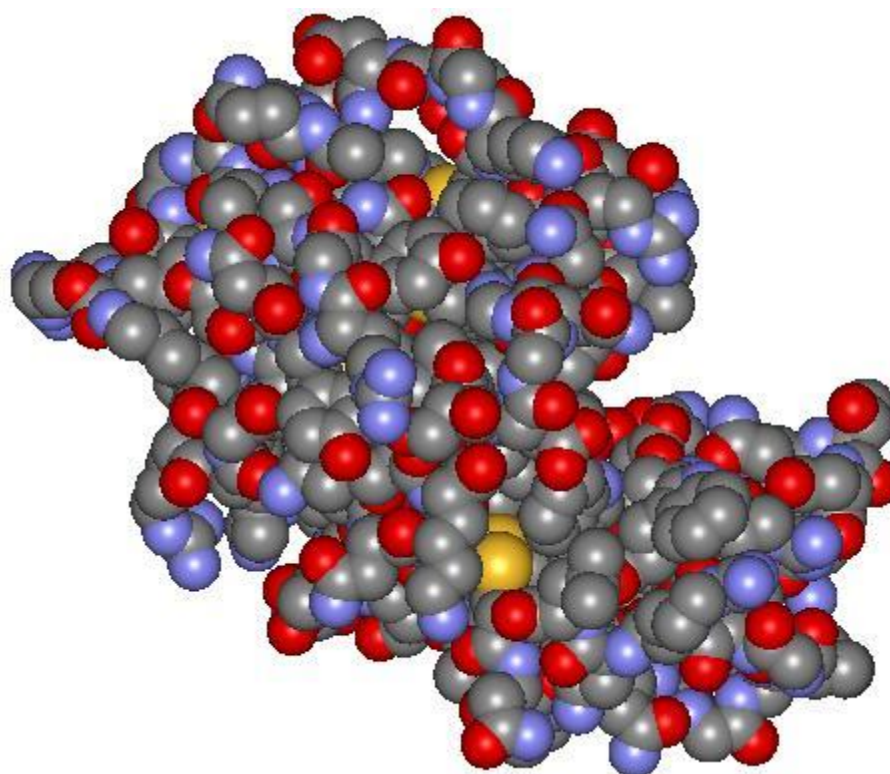


Рисунок 4 – Трехмерная структура лизоцима

Лизоцим - энзим (КФ 3.2.1.17), разрушающий клеточную стенку бактерий за счет гидролиза 1,4-бета-связей между остатками N-ацетилмурановой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина в составе цепи пептидогликана [44]. Молекула лизоцима состоит из одной полипептидной цепи, в которую входят

129 аминокислотных остатков (Рисунок 5). В молекуле имеется четыре внутрицепочечных дисульфидных мостика, которые обеспечивают устойчивость фермента[42].

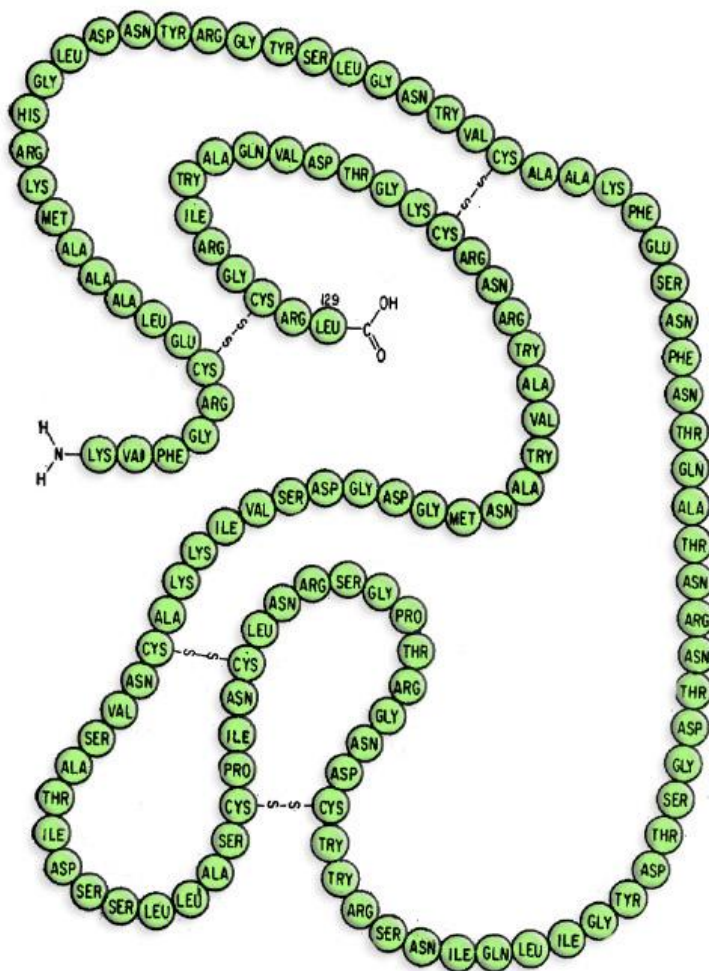
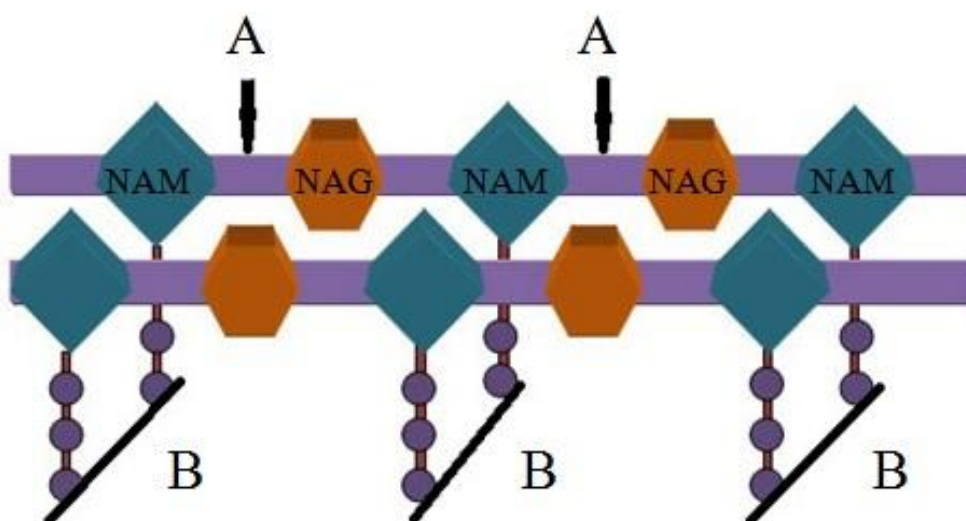


Рисунок 5 – Последовательность аминокислот в молекуле лизоцима и расположение дисульфидных мостиков.

Молекула лизоцима состоит из двух частей, разделённых щелью; в одной части большинство аминокислот (лейцин, изолейцин, триптофан и др.) содержит гидрофобные группы, в другой половине белковой глобулы преобладают аминокислоты (лизин, аргинин, аспарагиновая кислота и др.) с полярными группами [39]. Щель представляет собой активный центр фермента.

Молекулярная масса лизоцима составляет 14 kDa. Он растворим в воде, но не растворим в органических соединениях. Сохраняет свою активность при низких температурах и при конвективном высушивании [41, 45].

Лизоцим действует на один из основных компонентов бактериальной стенки — сложный полисахарид пептидогликан, состоящий из двух типов аминокислот NAM — N-ацетилмурамовая кислота, и NAG — N-ацетил глюкозамин (Рисунок 6).



NAM - N-ацетилмурамовая кислота, NAG- N-ацетил глюкозами.

A – места рестрикции лизоцимом, B – пептидные связи

Рисунок 6 - Структура стенки бактериальной клетки.

Поперечная пептидная связь соединяет гликановые молекулы полисахарида. Отсюда и происходит название этого полимера - пептидогликан. Основной структурной единицей являются тетрапептиды, состоящие из чередующихся L- и D-аминокислот, например, L-аланин - D-глутаминовая кислота - мезодиаминопимелиновая кислота - D-аланин. В пептидогликане грамположительных бактерий вместо мезодиаминопимелиновой кислоты часто

содержится LL-диаминопимелиновая кислота или лизин. Элементы гликана (ацетилглюкозамин и ацетилмурамовая кислота) и аминокислоты тетрапептида (мезодиаминопимелиновая и D-глутаминовая кислоты, D-аланин) являются отличительной особенностью бактерий, поскольку отсутствуют у животных и человека [39,40].

Лизоцим присутствует практически во всех живых организмах. К настоящему времени этот фермент обнаружен у фагов, актиномицетов, насекомых, морских беспозвоночных, рыб, млекопитающих, включая человека, а также в соке растений, например, репы, хрена, капусты, папайи [42,45]. У позвоночных его можно найти в слезах, слюне, селезенке, легких, почках, лейкоцитах [41,43]. Лизоцимы различного происхождения – полученные из белка куриного яйца, молока, плаценты, сыворотки крови или клеток крови человека и животных, – близки по химическому строению, но обладают некоторыми физико-химическими и антигенными различиями, а также отличаются по биологической активности в отношении как бактериальных клеток, так и клеток организма [41, 45,46].

Основная функция лизоцима - разрушение внешней оболочки грамположительных бактерий, так называемого «муреинового мешка». К дополнительным функциям фермента относятся:

1. Способность вызывать деградацию бактерий приводит к снижению активности воспалительного процесса при инфекционных заболеваниях.

2. Лизоцим является естественным неспецифическим иммуномодулятором: расщепляя муреиновую стенку бактерий, энзим высвобождает мурамилдипептид – мощный стимулятор иммунитета, который входит в состав пептидогликана клеточной стенки практически всех известных грамположительных и грамотрицательных бактерий [43].

Спектр практического применения лизоцима весьма широк:

1. В медицине лизоцим применяют для лечения хронических септических состояний и гнойных процессов, при ожогах, отморожениях, конъюнктивитах, эрозиях роговицы, стоматитах и других инфекционных заболеваниях. Препарат не токсичен, не раздражает ткани и может использоваться при плохой переносимости других антибактериальных средств [42, 43].

2. Успешно используют данный фермент и в современной иммунобиотехнологии при производстве иммуностимулирующих лекарственных средств.

3. Являясь антибактериальным ферментом, лизоцим применяется в пищевой промышленности при герметической упаковке пищевых продуктов, для увеличения срока хранения мясных продуктов. В молочной промышленности лизоцим используется при производстве сыров и молока [47,48].

1.5 Гиалуронидаза. Основные свойства

Гиалуронидаза – фермент, катализирующий реакции гидролитического расщепления и деполимеризации гиалуроновой кислоты (ГК) и кислых мукополисахаридов, являющихся важными компонентами основного вещества соединительной ткани, выполняющего роль цементирующего агента, скрепляющего отдельные тканевые элементы и клетки [39] .

В истории открытия гиалуронидазы можно выделить два важных события. Во-первых, в 1928 году Ф.Дуран-Рейнальс (F.Duran-Reynals) открыл способности экстракта из семенников быка увеличивать проницаемость тканей. Действующий агент получил название «фактор распространения» (spreading factor) [39]. Это вещество, которое облегчает всасывание и проникновение антивирусных вакцин, токсинов, красителей при подкожном

введении [49]. В 1931 году аналогичный фактор был выделен из сперматозоидов [39].

Во-вторых, в 1934 году Карл Мейер (К. Meyer) выделил и описал характеристики гиалуроновой кислоты из стекловидного тела глаза. В последствие гиалуроновая кислота была выделена из многих других источников (петушиных гребней, пупочных канатиков, глаз крупного рогатого скота, синовиальной жидкости, микроорганизмов др.). Как оказалось, гиалуроновая кислота представляет собой биополимер, состоящий из дисахаридов, включающих в себя N-ацетилглюкозамин и глюкуроновую кислоту (Рисунок 4). Молекулярный вес нативной ГК обычно составляет несколько миллионов. Каждый дисахаридный мономер гиалуроновой кислоты содержит три возможных участка для модификации: гидроксильную, карбоксильную группы и ацетамидогруппу (Рисунок 7) [49,50].

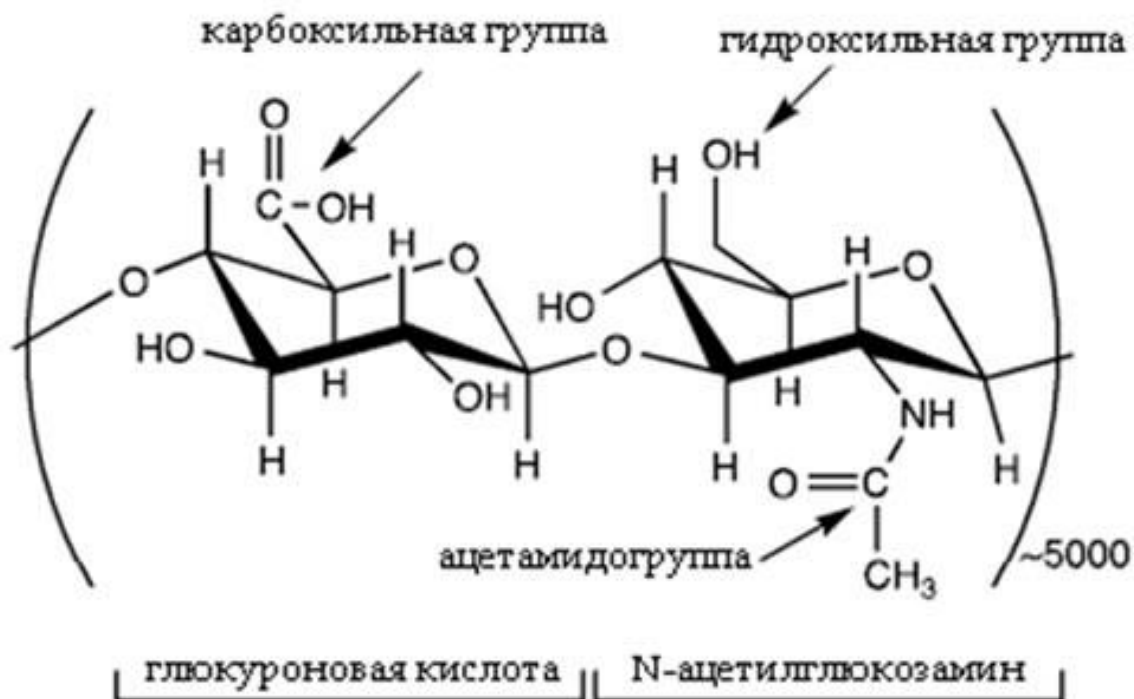


Рисунок 7 - Структура гиалуроновой кислоты.

В дальнейших исследованиях было показано, что так называемый «фактор распространения» может оказывать деградирующее влияние на гиалуроновую кислоту [49].

В 1940 вместо термина «фактор распространения» Карл Мейер (K. Meyer) ввел термин «гиалуронидаза», для обозначения группы ферментов различного происхождения, способных расщеплять кислые мукополисахариды [49].

По современной классификации гиалуронидазы можно разделить на три типа [49, 51]:

1. Гиалуронидазы тестикулярного типа

(гиалуронат-эндо- β -N-ацетилгексозаминидазы, КФ 3.2.1.35)

Содержится в семенниках и в сперме млекопитающих, молоках рыб, в лизосомах клеток различных тканей, в некоторых физиологических жидкостях (сыворотка крови, синовиальная жидкость), в слюне и слюнных железах млекопитающих, в пчелином и змеином ядах.

2. Гиалуронидаза слюны пиявок

(гиалуронат-эндо- β -глюкуронидаза, КФ 3.2.1.36)

Содержится в слюне и слюнных железах пиявок. Впервые была обнаружена в слюне медицинской пиявки.

3. Микробные гиалуронидазы

(гиалуронат-лиазы; элиминирующие гиалуронат-эндо- β -N-ацетилгексозаминидазы, КФ 4.2.99.1)

В данной работе была использована гиалуронидаза текстулярного типа (КФ 3.2.1.35), выделенная из семенников крупнорогатого скота.

Фермент гидролизует β -1,4-гликозидные связи между повторяющимися дисахаридными звеньями гиалуроновой кислоты (Рисунок 8) [49,51].

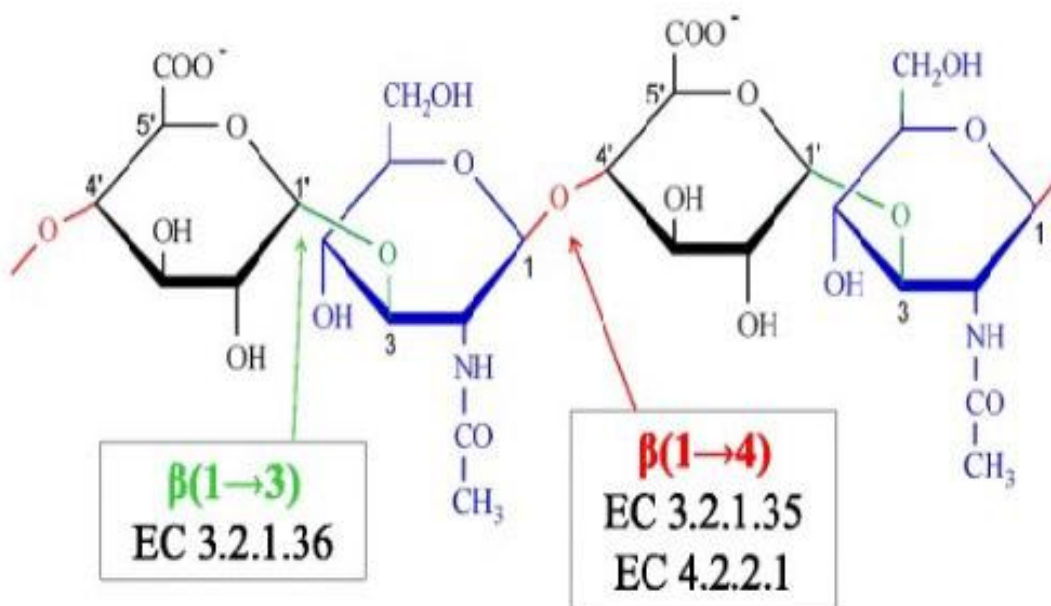


Рисунок 8 – Схема строения гиалуроновой кислоты и места действия гиалуронидаз различного типа.

Процесс действия гиалуронидазы на гиалуроновую кислоту идет в два этапа. Первый этап – это быстро протекающая деполимеризация. Степень деполимеризации может быть оценена по изменению вязкости гиалуроновой кислоты. На втором этапе происходит гидролиз с образованием глюконовой кислоты и N-ацетилглюкозамина. Этот этап идет немного медленней, чем деполимеризация [49,52].

Сейчас в медицине активно используются лекарственные препараты на основе гиалуронидазы. Гиалуронидаза вызывает распад гиалуроновой кислоты и тем самым уменьшает ее вязкость, увеличивает проницаемость тканей, облегчает движение жидкостей в межтканевых пространствах, уменьшает отечность тканей, размягчает рубцы, увеличивает объем движений в суставах, уменьшает контрактуры и предупреждает их формирование [48,49,53,54].

Медицинские показания к применению гиалуронидазы весьма обширны. В частности, к ним относятся [49,54,55,56]:

- ожоговые, травматические, послеоперационные рубцы (келлоидные, гипертрофические);
- длительно незаживающие раны и язвы;
- тугоподвижность и контрактуры суставов (после воспалительных процессов, травм), остеоартроз, анкилозирующий спондилоартрит, тяжелые заболевания поясничных дисков;
- гематомы мягких тканей поверхностной локализации;
- профилактика образования грубого рубцевания пораженных участков роговицы (в офтальмологии).
- терапия гиалуронидазой проводится при подготовке к пластическим операциям по коррекции рубцов.

Еще одна сфера применения препаратов гиалуронидазы – повышение биодоступности лекарственных препаратов (антибиотиков, цитостатиков, антигистаминных, радиоконтрастных соединений, местных анестетиков и вакцин), которые вводятся подкожно или внутримышечно [46,50,56].

1.6 Photobacterium phosphoreum

Царство:	Bacteria
Тип:	Proteobacteria
Класс:	Gammaproteobacteria
Отряд:	Vibrionales
Семейство:	Vibrionaceae
Род:	<i>Photobacterium</i>
Вид:	<i>P. phosphoreum</i>

Photobacterium phosphoreum – это грамм-отрицательная биOLUMИНИСЦИРУЮЩАЯ бактерия. Подвижна, температурный диапазон для роста бактерии от 4 °С до 35 °С, но оптимальный рост наблюдается при температуре от 18 °С до 25 °С [57]. В процессе окислительной реакции с участием фермента люциферазы, который преобразует химическую энергию в световую, бактерия излучает мягкое сине-зеленое свечение. Свечение бактерий рода *Photobacterium phosphoreum* является самым ярким из всех известных представителей светящихся бактерий [58].

Данный вид был выделен в 1880 году голландским микробиологом М. Бейринком (M. Beijerinck).

Бактерии широко распространены в мировом океане. Они живут в глубинах океана, в морской воде, морских отложениях, в кишечнике морских животных, на поверхности разлагающейся рыбы и, как считают некоторые исследователи, входят в состав светящегося органа некоторых глубоководных рыб, вступая с ними в симбиотические отношения [58,59]. Для культивирования этих бактерий в лабораторных условиях используется среда с повышенным содержанием хлорида натрия [59].

2 Материалы и методы исследования

2.1 Используемые ферменты

2.1.1 Лизоцим (Lysozyme)

В экспериментах использовался лизоцим яичного белка (Serva, Germany). Основные свойства лизоцима, выделенного из яичного белка, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Свойства лизоцима яичного белка

Свойства	Характеристика
Молекулярная масса	Около 14400 Da
Состав	Белок с исключительно высоким содержанием триптофана (7,8 %), представляет собой полипептид, состоящий из 129 аминокислот
Безопасность	Лизоцим яичного белка признан безопасным (CAS Per. № 9001-62-2)
Ферментная активность	Пептидогликан, N-ацетилмурамоил гидролаза, катализирует гидролиз пептидогликана клеточных стенок некоторых бактерий
Органолептические свойств	Белый порошок без запаха со слегка сладковатым вкусом
Физико-химические свойства	<ul style="list-style-type: none">- стабилен примерно до 55 °С;- изоэлектрическая точка 10,7;- хорошо растворим в воде;- не растворим в органических растворителях;- стабильность лизоцима снижается при рН выше 7,0;- лизоцим сохраняет свою активность при низких температурах и при конвективном высушивании;- чувствителен к воздействию ультрафиолетовых лучей, гамма-излучения и импульсного электрического поля;- не снижает своей активности в присутствии нитрита натрия, этанола и сорбата калия;- снижает свою активность в присутствии высокой концентрации молочной кислоты, уксусной кислоты и хлора;

Окончание таблицы 1 – Свойства лизоцима яичного белка

Свойства	Характеристика
	- полисахариды, такие, как пектин и альгинат снижают активность лизоцима, но добавление от 1 до 6% хлорида натрия инактивируют их действие на фермент

2.1.2 Гиалуронидаза (Hyaluronidase)

В эксперименте была использована гиалуронидаза текстулярного типа, выделенная из семенников крупнорогатого скота (Sigma,US). Основные свойства гиалуронидазы, используемой в работе, представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Свойства гиалуронидазы

Свойства	Характеристика
Молекулярная масса	Около 60 kDa
Состав	Фермент представляет собой гликопротеин, содержащий 5% маннозы и 2,2% гликозамина
Ферментная активность	Фермент случайным образом осуществляет гидролиз 1,4 – связи между остатками N-глюкозацетиламина и N-глюкуроновой кислотой в составе гиалуроновой кислоты.
Органолептические свойства	Пористая масса от кремового до светло-коричневого цвета.
Физико-химические свойства	<ul style="list-style-type: none"> - стабилен примерно до 50 °С; - изоэлектрическая точка 5,7; - хорошо растворим в воде; - оптимум pH :5 4.5–6.0 - гиалуронидаза сохраняет свою активность при низких температурах; - активность снижается при воздействие следующими соединениями: железом, цинком, медью, гепарином, селями желчных кислот, стероидами и др.

2.2 Используемые модифицированные наноалмазы

Эксперименты выполнены с использованием МНА марки RUDDM 0-250, производимых фирмой ООО «Реал-Дзержинск» (Россия) по технологии, разработанной в ИБФ СО РАН [11, 12, 62], и обладающих высокой коллоидной устойчивостью в дисперсионных средах. Гидрозоль МНА (концентрация 1 мас.%) получали простым добавлением деионизированной воды к навеске порошка наночастиц.

2.3 Используемые бактерии

В работе были использованы светящиеся бактерии рода *Photobacterium phosphoreum* (ш.2015). Бактерии были взяты из коллекции светящихся микроорганизмов Института биофизики СО РАН (IBSO RAS (<http://www.ibp.ru/collection/>)).

2.4 Спектрофотометрия

Спектрофотометрия — оптический метод исследования газообразных, жидких и твердых веществ, основанный на определении интенсивности поглощения света веществом (абсорбционная спектрофотометрия) или интенсивности излучения им света (эмиссионная спектрофотометрия) в зависимости от длины волны. Получаемые при этом (при помощи специальных приборов — спектрофотометров) абсорбционные и эмиссионные спектры являются характерными для каждого данного вещества. Различают спектрофотометрию в ультрафиолетовой (УФ), видимой и инфракрасной (ИК) областях спектра. Спектрофотометрия широко применяется в клинических, биохимических, санитарно-гигиенических, судебно-медицинских и фармацевтических лабораториях для качественного и количественного анализа различного рода

объектов биологического происхождения (сыворотка крови, спинномозговая жидкость, моча и др.), лекарственных средств, продуктов питания и т. д. [63].

В работе спектрофотометрический метод использовался для определения количества иммобилизованного фермента. Сравнивалась оптическая плотность исходного фермента с оптической плотностью фермента после проведения его иммобилизации на наноалмазы детонационного синтеза.

Также метод использовался при изучении восприимчивости бактерий рода *Photobacterium phosphoreum* к лизоциму. Добавление фермента к суспензии бактериальных клеток вызывало снижение ее оптической плотности. Это происходило за счет деградции бактерий что, как следствие, приводило к уменьшению размеров взвешенных частиц (рисунок 4). Об уровне активности лизоцима судили по разнице светопропускания в опытной (после добавления фермента) микробной взвеси микрококка и контрольной (без добавления лизоцима).

Кроме этого спектрофотометрический метод использовали для определения ферментативной активности лизоцима, иммобилизованного на наноалмазах посредством ковалентной пришивки.

2.5 Получение культуры клеток для эксперимента

Для выращивания культуры клеток бактерий рода *Photobacterium phosphoreum* была использована жидкая полусинтетическая питательная среда (<http://www.ibp.ru/collection/>) с концентрацией NaCl 30 мг/л. Затем полученную культуру клеток отмывали от среды физраствором. Для этого клетки бактерий собирали центрифугированием при 5000g в течение 5 минут при 20 °C. Надосадочную жидкость отбрасывали, а осадок клеток ресуспендировали в объеме физраствора. Процедуру повторяли дважды. Отмытые клетки ресуспендировали в ДИ-воде.

2.6 Активация МНА

Для проведения опыта были использованы НА, поверхность которых была предварительно активирована с помощью бензохинона по известной методике [60,61]. Активацию проводили следующим образом. К 670 мкл гидрозоля МНА с концентрацией наночастиц 1 масс. % добавляли фосфатный буфер (рН 8.0) до конечной концентрации 20 мМ. В полученную суспензию при постоянном перемешивании добавляли 60 мг гидрохинона, растворенного в 300 мкл 20 %-ного водного этанола. При этом известно [64,65], что при слабощелочных условиях среды (рН 7.5–8.0) гидрохинон окисляется с образованием бензохинона. Суспензию инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч при постоянном перемешивании, после чего МНА собирали центрифугированием при 16000 g в течение 10 мин при температуре 20 °С. Полученный осадок активированных наночастиц промывали до полного удаления несвязавшихся реагентов: сначала деионизованной водой, затем 1 М NaCl и снова водой [66].

2.7 Ковалентная иммобилизация фермента на частицы МНА

Иммобилизацию ферментов проводили в NaH_2CO_3 буфере. Для этого фермент смешивали с активированными наночастицами (1:1 объем:объем). Полученную суспензию при постоянном помешивании инкубировали 1,5-2 часа. После инкубации полученный комплекс фермент/МНА собирали центрифугированием 16000 g в течение 10 мин при температуре 10 °С. Затем комплекс 4 раза промывали 1000 мкл 250 мМ раствором NaCl.

2.8 Проверка работоспособности комплекса

Функциональную активность комплекса МНА-фермент проверяли следующим образом. Гидрозоль, содержащий комплекс МНА-Лизоцим с ковалентно связанным ферментом, добавляли к суспензии отмытых клеток. Концентрация фермента составляла 50 мкг на 1 мл клеточной суспензии. Для того, что бы повысить чувствительность клеток *Photobacterium phosphoreum* к лизоциму в клеточную суспензию добавляли 2 mM ЭДТА. После этого суспензию инкубировали при комнатной температуре при постоянном перемешивание. Периодически из суспензии отбирали пробы по 1 мл для измерения оптической плотности. Оптическую плотность измеряли при длине волны 600 нМ.

3 Результаты и обсуждение

[Изъято 12 страниц]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Даная работа была посвящена изучению возможности создания на основе наноалмазов детонационного синтеза комплексов лизоцима и гиалуронидазы для медицинского и биологического применения. В результате проведенных исследований получены следующие результаты:

- получены комплексы МНА/лизоцим и МНА/гиалуронидаза;
- показана работоспособность комплекса МНА/лизоцим на бактериях *Photobacterium phosphoreum* (ш.2015);
- определено оптимальное весовое соотношение фермент/МНА для максимальной пришивки лизоцима и гиалуронидазы;
- определена концентрация лизоцима, при которой наблюдается его наибольшая активность в отношении бактерий *Photobacterium phosphoreum*;
- отработано применение ЭДТА для усиления эффекта комплекса МНА/лизоцим;

Полученные данные показывают, что может быть получен рабочий комплекс лизоцим/фермент, который может найти свое применение в медицине. Однако, для того, чтобы говорить о возможности применения комплекса МНА/гиалуронидаза в медицине, нужно провести дополнительные исследования.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Дж. Уайтсайдс. Нанотехнология в ближайшие десятилетия. Прогноз направления исследований./ Дж. Уайтсайдс, Д.Эйглер, Р. Андерс; Под ред. М.К.Роко, Р.С. Уильямса, П.Аливисатоса; Пер. с англ.-М.:Мир, 2002. - 292 с.
2. Кобаяси, Н. Введение в нанотехнологию./Н.Кобаяси; Пер. с яп.- М.: БИОНОМ. Лаборатория знаний.- 2005. - 134 с.
3. Штыков, С.Н. Наноматериалы и нанотехнологии в химических и биохимических сенсорах: возможности и области применения/ С.Н.Штыков, Т.Ю. Русанов // Российский химический журнал.-2008.- т.ЛП, №2.-С.92-100.
4. Гусев, А.И. Наноматериалы, наноструктуры, нанотехнологии./А.И. Гусев.-М.:Физматлит, 2005. - 416с.
5. Официальный сайт NANO 2016 (XIII International Conference on Nanostructured Materials).- Режим доступа : <http://www.nano2016.org>
6. Официальный сайт Нанотехнологического общества России (НОР).- Режим доступа : <http://www. ntsr.info>
7. Бондарь, В.С. Многоцветные системы биохимической диагностики на основе наноалмазов / В. С. Бондарь, Н. О. Ронжин, Е. С. Мамаева, А. В. Барон, академик И. И. Гительзон. - Доклады академии наук.-2013.-том 448.- №6.-С.1-4.
8. Ронжин, Н.О. Наноалмазы в биотехнологии: применение для выделения белков и создания индикаторных тест-систем / Н.О. Ронжин, К.А. Харина, А.П. Пузырь, В.С. Бондарь // Журнал Сибирского Федерального университета. Биология.-2010.-№ 4.-С.418-433.
9. Долматов, В.Ю. Наноалмазы. / В.Ю. Долматов, Т.Фуджимура // Сверхтвердые материалы.- 2001.- № 6.- С.34-41.
10. Бондарь, В.С. Наноалмазы для биологических исследований/ В.С. Бондарь, А.П. Пузырь // Физика твердого тела.- 2004.- Т.46.- С.698-701.

11. Puzyr, A.P. Physical and Chemical properties of modified nanodiamonds./ A.P. Puzyr, V.S. Bondar, A.A. Bukayemsky, G.E. Selyutin, V.F. Kargin // NATO Science Series II. Mathematics, Physics and Chemistry.- 2005.- V.92.- P.261-270.
12. Grisham, C.M. Biochemistry / C.M.Grisham, H.G.Redinald.- Philadelphia.- 1999.- 467p.
13. Бондарь, В.С. Возможность и перспективы создания новых нанотехнологий на основе частиц детонационных наноалмазов: медико-биологический и технический аспекты / В.С. Бондарь, А.П. Пузырь // Конструкции из композиционных материалов. - 2005. - В.4. - С. 80-94.
14. Puzyr, A.P. Nanodiamondswith novel properties: a biological study/A.P. Puzyr, A.V. Baron, K.V. Purtoy,E.V. Bortnikov, N.N. Skobelev, O.A. Mogilnaya, B.S. Bondar // Diamond and Related Materials.- 2007.- V.16.- P.2124-2128.
15. В.С. Бондарь, А.П. Пузырь, К.В. Пуртов, О.А. Могильная, А.Г. Дегерменджи, И.И. Гительзон// Наноалмазы с оригинальными свойствами: применение в биологии и медицине// сайт «Информационно-аналитическая система продвижения образовательных продуктов»(<http://nano.fcior.edu.ru>).- 2011.
16. Беленков, Е.А. Наноалмазы и родственные углеродные наноматериалы. Компьютерное материаловедение. / Е.А. Беленков, В.В. Ивановская, А.Л. Ивановский.- Екатеринбург : УрО РАН, 2008.-49с.
17. Сакович, Г.В. Синтез, свойства, применение и производство наноразмерных синтетических алмазов. Часть 1. Синтез и свойства / Г.В. Сакович, В.Ф. Комаров, Е.А. Петров//Сверхтвердые материалы.-2002.-№4.-С.8-23.
18. Байдакова, М.В Тезисы международного симпозиума «Детонационные наноалмазы: получение, свойства и применение».- Санкт-Петербург – 7-9 июля.- 2003.- с.26

19. Долматов, В.Ю. Ультрадисперсные алмазы детонационного синтеза: свойства и применение/ В.Ю.Долматов// Успехи химии.-2001.-№7.- С.687-708.
20. Кулакова, И.И. Модифицирование детонационного наноалмаза: влияние на физико-химические свойства/ И.И.Кулакова // Российский химический журнал (Журнал Российского химического общества им. Д.И. Менделеева).-2004.-т.XLVIII.-№5.-С.97-106.
21. Кулакова, И.И. Химия поверхности наноалмазов/ И.И.Кулакова// Физика твердого тела.-2004.-т.46.-вып.4.-С.621-628.
22. Holt, K.B. Diamond at the nanoscale: Application of diamond nanoparticles from cellular biomarkers to quantum computing / K.B.Holt // Philosophical transactions of the royal society A. Mathematical, physical and engineering sciences.-2007.-V.365.-P. 2844-2861.
23. Schrand, A. Nanodiamond particles: properties and perspectives for bioapplications / Schrand A., Hens S.A.C., Shenderova O.A. // Critical Reviews in Solid State and Material Science.-2009.-V.34.-P. 18-74.
24. Пузырь, А.П. Доклады РАН/ А.П. Пузырь, К.В.Пуртов, О.А. Шендерова, М. Луо, Д.В. Бреннер, В.С.Бондарью.-2007.- Т.417.-С.117-120.
25. Бондарь, В.С. Доклады РАН/ В.С. Бондарь, К.В. Пуртов, А.П. Пузырь, А.В. Барон, И.И. Гительзон.- 2008.-Т.418.-С.267-269.
26. Пузырь, А.П. Результаты исследования возможного применения детонационных наноалмазов в качестве энтеросорбентов / А.П.Пузырь, В.С. Бондарь, З.Ю.Селимханова, Е.В.Инжеваткин, Е.Д.Бортников // Сибирское медицинское обозрение: ежеквартальный медицинский журнал.-2004.-Т.2-3.- С.25-28.
27. Пузырь, А.П. Динамика некоторых физиологических показателей лабораторных мышей при длительном пероральном введении гидрозолей наноалмазов / А.П.Пузырь, В.С.Бондарь, А.Г.Тян, Е.Д.Бортников, Е.В.Инжеваткин. // Сибирское медицинское обозрение: ежеквартальный медицинский журнал.-2004.-Т.4.-С.19-23.

28. Ботвич, Ю.А. Влияние МНА детонационного синтеза на белковые фракции крови человека / Ю.А.Ботвич, И.А. Ольховский, И.И. Барон, А.П.Пузырь, А.В.Барон, В.С.Бондарь// Клиническая лабораторная диагностика.- 2013.-№11.-С.35-39.

29. Барон, А.В. Влияние МНА детонационного синтеза на биохимический состав крови человека / А.В.Барон, В.С.Бондарь, А.П.Пузырь, И.И.Барон// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.-2012.-№12.- С. 750-753.

30. Пузырь, А.П. Теория и практика технологий производства изделий из композиционных материалов и новых металлических сплавов(ТПКММ) / А.П.Пузырь, В.С.Бондарь, А.Г.Тян, Е.В.Бортников, Е.В.Инжеваткин, А.Г.Дегерменджи// Москва:Изд-во «Знание», 2006.-С.654-658.

31. Чиганова, Г.А. Исследования поверхностных свойств ультрадисперсных алмазов / Г.А. Чиганова // Коллоидный журнал.-1994.-Т56, №2.-С.266-268.

32. Burleson, T. Surface modification of nanodiamonds for biomedical application and analysis by infrared spectroscopy / T.Burleson, W.Yusuf, A. Stanishevsky // Journal of Achievements in Material and Manufacturing Engineering.-2009.-V.37.-P.258-263.

33. Осипова Т.А. Краткая история создания и развития научного направления «Иммобилизованные ферменты» в России / Т.А.Осипова, В.И.Тишкова, С.Д.Варфаломеев // Вестн. Моск. у-та. Сер. 2. Химия.- 2014.-Т.2.- С. 59-70.

34. Березин, И.В. Биотехнология. Инженерная энзимология / И.В.Березин, А.А.Клесов, В.К.Швядас, Н.Н.Угарова, С.Д.Варфаломеев, А.И.Ярополов.-Москва, 1990.-Т.8.-62с.

35. Биохимия и молекулярная биология. Версия 1.0. [Электронный ресурс]: конспект лекций (Н.М.Титова, А.А.Савченко, Т.Н.Замай и др.- электронные данные (10 мб).-Красноярск: ИПК СФУ, 2008.- (Биохимия и

молекулярная биология: УМКД № 174-2007/руководитель творческой группы Н.М.Титова).-Режим доступа: files.lib.sfu-kras.ru/ebibl/umkd/175/u_lectures.pdf

36. John M.Walker. Methods of biotechnology/Jose M.Guisan//Immobilization of Enzymes and Cells.-Humana Press Inc, 2006.-V.22.

37. Кёстенер, А.И. Иммуобилизованные ферменты / А.И. Кёстенер // Успехи химии.- 1974.-Т.XLIII, В.8.-С.1480-1499.

38. Введение в биотехнологию. Версия 1.0. [Электронный ресурс]: электронное учебное пособие (Т.Г.Волова.-электронные данные (2 мб).- Красноярск: ИПК СФУ, 2008.- (Введение в биотехнологию: УМКД № 143-2007/руководитель творческой группы Т.Г.Волова).-Режим доступа: files.lib.sfu-kras.ru/ebibl/umkd/143/u_course.pdf

39. Бисвангер, Х. Практическая энзимология / Х.Бисвангер; перевод с английского: - Москва: БИНОМ Лаборатория знаний, 2010.- 328 с.

40. Березин И.В. Биотехнология : учебное пособие для вузов / И.В.Березин, Н.Л.Клячко, А.В.Левашов и др.- Москва : Высш.шк., 1987.- 159 с.

41. Крякунова, Е.Д. Иммуобилизация микроорганизмов и ферментов/ Е.Д.Крякунова, А.В.Канарский //Вестник Казанского технологического университета.- 2012.-Т.15, №17.-С.189-194.

42. Мецлер Д. Биохимия. Химические реакции в живых клетках/ Д. Мецлер; перевод А.Е. Браундштейн, Е.С. Северин.- Москва: Мир, 1980.- Т.3.- 408 с.

43. Солецкая А.Д. Перспективы применения лизоцима в производстве мясных продуктов/ А.Д. Солецкая // Харчова наука і технологія.-2013.-Т.2, № 23.- С. 64-67.

44. Большой энциклопедический словарь медицинских терминов/под ред.проф.Э.Г.Улумбекова.-М.:ГЭОТАР-Медиа,2012.-2263с.

45. Богатырева, Т.Г. Современные методы диагностики болезней хлеба / Т.Г. Богатырева // Хлебопродукты. – 2008. – №3. – С. 50-52.

46. Декина С.С. Иммобилизация лизоцима в криогель поливинилового спирта/ С.С.Декина, И.И.Романовская, А.М.Овсебян, А.Л.Молодая, И.И.Пашкин // *Biotechnologia Acta*.-2014.-Т.7, № 3.- С. 69-73.
47. Grasselli, M. *Journal of the Science of Food and Agriculture*/ M. Grasselli, A. Silvia, Navarro del Canizo, A. Agustin. Oscaldo, 1999. –P.333-339.
48. Ghosh, R. *Biotechnology and Bioengineering*/ R. Ghosh, Z.F. Cui.- 2000. -P. 191-203.
49. Овчинников, Ю.А. Иммуностимулирующая активность мурамилдипептида и его производных / Ю.А. Овчинников // *Микробиология*.- 1999. - №3. -С. 19-23.
50. Заинкова, Н.В. Получение и сравнительный анализ гиалуронидаз из различных источников : диссертация канд.биол.наук : 03.00.04 / Заинкова Наталья Вячеславовна.- Санкт-Петербургу.- 1998.- 142 с.
51. Бахрен, Б.А. Гиалуронидаза : от молекулярно-клеточных механизмов к клиническому применению / Б.А. Бахрен, Х.Шрамп, Н.П.Хофф, Э.Белькс // *Инъекционные методы в косметологии*.-2016.- №2.- С.48-54.
52. Lacoste, C. Use of hyaluronidase to correct hyaluronic acid injections in esthetic medicine / C.Lacoste, B.Hersant, R.Basc, W.Noel, J.P.Meninguad // *Rev Stomatol Cher Maxillofac Chir Orale*.- 2016.- V.117, № 2.- P.96-100
53. Пат. Российская Федерация, 2114862 С 08 В 37/ 08 Способ получения гиалуроновой кислоты / Антипова Л.В., Плянский С.В., Алексюк М.П.; заявитель и патентообладатель Воронежская государственная технологическая академия.- № 96111091/04; заявл. 31.05.1996; опубл. 10.07.1998.
54. Синяйкина, О.А. Иммуномодулирующее действие гликозамингликанов и гликозидов при тепловом порожении / О.А. Синяйкина, Н.А.Быстрова, И.Л.Бровкина // *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»*.- 2006.- №3.-С.18-23.

55. Stern, R. The hyaluronidases: their genomics , structures, and mechanisms of action / R.Stern, M.J. Jedrzejas // *Chem.Rev.*- 2006.- №103(3).- P.818-839.
56. Caithin, O. Emerging roles for hyaluronidase in cancer metastasis and therapy / O. Caitin, J. Barycki, A.Simpson // *Advancer in cancer research.*-2014.- V.123.- P.1-334.
57. Thompson, F.L. Biodiversity of Vibrios / F.L. Thompson, T. Iida, J. // *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004.- V. 68, Issue 3.- P. 403-431.
58. Jennifer, C. Phylogenetic resolution and habitat specificity of members of the *Photobacterium phosphoreum* species group/ C. Jennifer, Paul V. Dunlap // *Environmental microbiology*, 2005.- V.7, № 10.- P. 1641-1654.
59. Грецкий И.А. Исследование физиологических особенностей светящихся бактерий *Photobacterium phosphoreum* ИМВ В-7071/ И.А. Грацкий // *Микробиология*, 2014.- Т.76, № 3.- с 42-47.
60. Ронжин, Н.А. Индикаторные тест-системы с использованием наноалмазов детонационного синтеза: дис. канд. биол. наук: 03.01.06 / Ронжин Никита Олегович. - Красноярск, 2015. -125 с.
61. Пузырь, А.П. Способ получения наноалмазов взрывного синтеза с повышенной коллоидной устойчивостью / А.П. Пузырь, В.С. Бондарь // Пат. РФ №2252192 С2, С01 В31/06, опубл. 20.05.2005 Бюл. № 14.
62. Brandt J. Covalent attachment of proteins to polysaccharide carriers by means of benzoquinone /J. Brandt, L.O. Andersson, J. Porath // *Biochimica et Biophysica Acta*, 1975.- V. 386.- P. 196–202.
63. Ленсон, И.А. Спектрофотометрия. Методическая разработка к спецпрактики «Экспериментальные методы химической кинетики»/И.А.Ленсон.- Москва, 2006.-10с.
64. Mateescu M.-A. Ready to use p-benzoquinone-activated supports for biochemical coupling, with special applications for laccase immobilization / M.-A. Mateescu, G. Weltrowska, E. Agostinelli, R. Saint-Andre, M. Weltrowski, B. Mondovi // *Biotechnol. Tech.*, 1989.- V. 3.- P. 415–420.

65. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот / Л.А. Остерманю- М.: Наука, 1985.- 536с.

66. Пуртов К.В. Модельная система адресной доставки лекарственных веществ на основе наноалмазов / К.В. Пуртов, А.И. Петунин, А.П. Пузырь, А.Е. Буров, В.С. Бондарь // Российские нанотехнологии, 2001.- Том 6.- №3–4.- С. 97-102.