



ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ

ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЧНО И СИСТЕМНО ИНЖЕНЕРСТВО

КАТЕДРА „БИОТЕХНОЛОГИИ“

инж. Рая Николова Райкова

ТЕМА

**„Синтез и кинетични свойства на биологично активни
инхибитори на ензимни системи“**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

за придобиване на образователната и научна степен „доктор“
по научна специалност 5.11. Биотехнологии

(Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните съединения)

Научен ръководител: проф. д-р инж. Любов Йотова
доц. д-р инж. Данчо Даналев

Научно жури: 1. проф. д-р инж. Емилия Найденова – председател
2. доц. д-р инж. Данчо Даналев
3. доц. д-р Иванка Стойнева - рецензент
4. доц. д-р Иванка Станкова - рецензент
5. доц. д-р Тамара Пайпанова

София, 2015

Дисертационният труд е написан на 136 страници, съдържа 81 фигури и 19 таблици. Цитирани са 118 литературни източника.

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет за защита на заседание на разширен катедрен съвет на катедра „Биотехнология” при Химикотехнологичен и металургичен университет-София, състояло се на 29.04.2015 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 09.07.2015 г. от 11⁰⁰ часа в зала 424, сграда „А” на ХТМУ.

Материалите са на разположение на интересующите се на интернет страницата на ХТМУ и в отдел „Научни дейности”, стая 406, етаж 4, сграда „А” на ХТМУ.

Изказвам искрените си благодарности на своите ръководители проф. д-р инж. Любов Йотова и доц. д-р инж. Данчо Даналев за оказаната помощ и подкрепа, на целия колектив за проявения ентусиазъм, приятелство и колегиалност. Също така благодаря на семейството ми и по-специално на един човек, който повярва в мен - баща ми, инж. Никола Райков Колев, заради когото съм тук и правя това, което обичам. Поклон!

ВЪВЕДЕНИЕ

1. Мултиензимни системи

Специфична група от ензими с една и съща функция, които вземат участие в протичането на една и съща ензимно катализирана реакция, могат да се означат като „мултиензимни системи”.

Основен приоритет на учените е изолирането и пречистването на ензими, участващи във всеки от етапите на ензимно катализираната реакция. Предизвикателство за съвременния учен, както е предложено от Катчалски и колеги (1971 г.), е да се поясни как ензимите функционират в подходяща среда. Повече от 70 години, клетката се счита "от метаболитна гледна точка" за съвкупност от ензими – каталитични агенти, под формата на колоидна система. Всеки един от ензимите може да се изолира и да работи сам *in vitro*.

Мултиензимният комплекс се разглежда като съвкупност от елементи, всеки от които е способен да съществува в едно от трите качествено различни състояния: инициране (ензимът се свързва със субстрата); активиране (каталитичното превръщане на субстрата), терминиране (отделяне на продуктите на реакцията от активния център). Свързване на субстрата към ензима означава преход от свободно в активно състояние. Последователността на действие на ензимите се определя от структурата на мултиензимния комплекс.

Голям интерес представляват ЛГ, като участници в мултиензимните системи в организма. ЛГ участва в каталитичните цикли на аеробни и анаеробни реакции:

- ✓ диоксигенирането на липиди - в клетката ЛГ спомага за въвеждане на молекула кислород в молекулата на полиненаситена мастна киселина.
- ✓ биосинтеза на левкотриени, като участници във възпалителните процеси.

В резултат на инхибирането на ЛГ – форми се блокира клетъчната пролиферация на раковите образувания.

Друга област на интерес представляват ензимите от кръвната коагулационна каскада за осъществяване на процеса хомеостаза в организма.

В кръвната коагулация участват няколко зимогенни форми на серинови протеинази, последователното активиране на които води в крайна сметка до превръщането на

неразтворимия белтък фибриноген в разтворима форма – фибрин. Фибринът е много важен и основен компонент в образуването на кръвния съсирек.

За изследване механизма на сериновите протеинази в кръвната коагулационна каскада са използвани редица инхибитори. Последните имат два основни недостатъка:

- ✓ Голям брой синтетични инхибитори имат слаба специфичност;
- ✓ Трудности възникват при трансмембранните преходи на молекулата на инхибитора;
- ✓ Инхибиторите притежават известна нестабилност в клетката.

Поради изброените по – горе причини усилията се насочват към създаване на нови инхибитори с висока специфичност и стабилност за осъществяване на контрол и регулация на сериновите протеинази от кръвната коагулационна каскада и цялостното поддържане на хомеостазата в организма.

Ето защо като обект на настоящия дисертационен труд бяха подбрани моделни системи на оксидоредуктази и серинови протеинази за осъществяване на биохимичен контрол на клетъчните процеси.

2. Хомеостазата и нейното място и роля в човешкия организъм

Понятието кръвоспиране (гръцкото хемостаза) обхваща поредица от физиологични процеси и механизми с определена последователност, които в своята цялост от една страна преустановяват кръвозагубата от наранена телесна повърхност, кухини и съдове, а от друга – осигуряват течното състояние на кръвта и нормалното поддържане на кръвообращението. Хемостазата е сложна, динамична и саморегулираща се система, която включва няколко подсистеми, обединени от нервни и хуморални механизми.

Най-добре проучената подсистема на хемостазата е кръвосъсирването.

Главната функция на кръвосъсирването е превръщане на разтворимия фибриноген в неразтворима фибринова мрежа. Този процес представлява каскада от мултиензимни реакции, описани през 1964 г. като каскада на кръвната коагулация. Редица изследвания са показали, че три са ключовите стъпки в тази мултиензимна каскада:

- ✓ превръщането на протромбина в тромбин, катализирано от активирания фактор Ха;
- ✓ превръщането на фибриногена в разтворим фибрин катализирано от тромбин;
- ✓ трансформиране на разтворимия фибрин в неразтворима фибринова мрежа, катализирано от сериновата протеиназа плазмин.

С оглед казаното по-горе целта на настоящата дисертационна работа е *да се изследва кинетиката на инхибиране на природни и синтетични инхибитори на мултиензимни системи с участието на липоксигеназа и серинови протеинази.*

Във връзка с изпълнението на тази цел си поставихме следните конкретни задачи:

1. Изолиране и пречистване на ЛГ от соев и микробиален източник и определяне на $pH_{\text{опт}}$, температурен оптимум ($T_{\text{опт}}$) и активираща енергия (E_a) на свободна ЛГ от соя.
2. Определяне на кинетичните параметри на ЛГ от соя и от шам на *Penicillium sp.* с използване на различни полиненаситени мастни киселини (линолова, линоленова и арахидонова киселини).
3. Синтез на нови инхибитори на ЛГ, структурни аналози на рибавирин. Изследване кинетиката на инхибиране на ЛГ от соя с участието на природни (рибавирин и галантамин) и синтетичен (2,3,5 – триацетил – 1 – β – рибофуранозил тиокарбамид) инхибитори.
4. Да се определят кинетичните параметри K_m , V_{max} и K_i и типа на инхибиране върху моделен ензим трипсин и ензимите от кръвнокоагулационната каскада-фактор Ха, тромбин и плазмин, в присъствие на скъсени аналози на изоформа 2 и 3 на антистазин: Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-NH₂, Phe-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-NH₂ и Arg-Pro-Lys-Arg-NH₂ (скъсени аналози на изоформа 3) Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂; Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂; D-Arg-Gly-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂ и D-Phe-Pro-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂ (скъсени аналози на изоформа 2).
5. Имобилизирание на липоксигеназа от соя и от шам на *Penicillium sp.* върху матрици на основата на полиакрилонитрил акриламид (PAAN) и нови матрици с дендримерна структура и сравняване свойствата на имобилизирания ензим от микробиален източник със свойствата на свободен ензим.
6. Изследване имобилизацията на ЛГ от соя върху хибридни материали (дендримерни носители), различаващи се по количеството на функционални групи в структурата си и сравняване свойствата на имобилизираната ЛГ със свободна ЛГ от соев източник. Определяне на $pH_{\text{опт}}$, температурен оптимум ($T_{\text{опт}}$) и активираща енергия (E_a) на имобилизирана ЛГ от соя върху дендримерен носител.

РЕЗУЛТАТИ

*I. Изолитране, пречистване и изследване на ЛГ от соя и *Penicillium sp.**

Изолитрането и пречистването на ЛГ бе извършено от изходни източници соево брашно и микробиален източник – щам на *Penicillium sp.*

Процедурата за изолитране бе извършена двукратно за всеки от посочените източници.

Използвани бяха два различни микробиални източника от *Penicillium sp.*, които условно се означават като М 1 и М 2.

Използвано бе соево брашно от две партии на соя, които притежават различни качествени показатели по отношение на периода на съхранение на материала. Условно последните се означават като „соя 1” и „соя 2”.

Използвана бе процедурата за изолитране и пречистване на ЛГ от соя и *Penicillium sp.* посочена в раздел “Методи”, I.

Посредством процеса ултрафилтрация, под действието на налягане в ултрафилтрационната клетка, ензимните разтвори бяха десетократно концентрирани и пречистени.

Ензимните разтвори бяха изследвани по отношение на белтъчното съдържание, съгласно метода на Лоури.

За изолитрана ЛГ от микробиални източници М1 и М2 отчитаме белтъчно съдържание 0,50 mg/ml.

За изолитраната ЛГ от соево брашно (соя 1) получаваме белтъчно съдържание на препаратa 0,70 mg/ml.

1. Изследвания върху ЛГ кинетика

ЛГ кинетика за ензимен препарат от соя 1 и микробиален източник бе изследвана спектрофотометрично при λ 234 nm при използване на субстратни разтвори с различна концентрация.

Изследван бе ходът на кинетичната крива за определяне на ЛГ активност от микробиален източник с един от изследваните субстрати - лиолова киселина.

Началната абсорбция на свободния ензим (М 1) спрямо таблица 5 и фиг. 18 започва от 0.335 и достига до 0.355.

Изследван бе ходът на кривата за определяне на ЛГ активност от микробиален източник с един от изследваните субстрати линоленова киселина.

Линейният диапазон се забелязва при 45-50 секунда с абсорбция 0.422, при измерване хода на реакцията в рамките на 5 min.

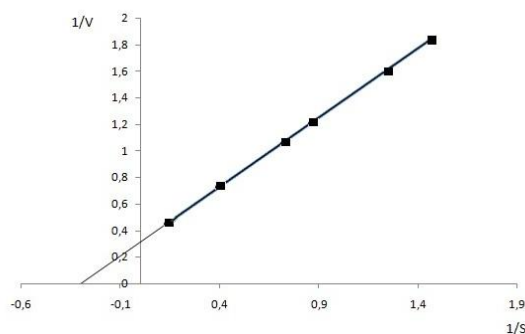
При изследване на кинетиката на реакцията в присъствие на ензимен препарат от соя 1 и линолова киселина, линейност се наблюдава при първата минута с достигане на абсорбция 0.546, след което кривата експоненциално нараства до стойност на абсорбцията 0.552.

Линейният диапазон за кинетиката на соя 1 в присъствие на линоленова киселина, се забелязва до 45-50 секунда с абсорбция 0.458, след което зависимостта нараства нелинейно до петата минута.

2. Кинетични параметри на ЛГ от соя и *Penicillium sp.*

Бяха изчислени константата на Михаелис (K_m) и максималната скорост за протичане на ЛГ катализираната реакция (V_{max}), въз основа на графичния израз на уравнението на Лайнуивър–Бърк, за съответно ЛГ от микробиален и растителен източник (соя 1).

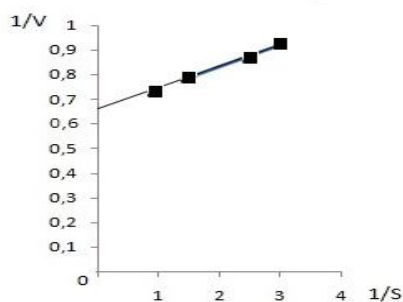
2.1. Кинетика на ензимно катализирана реакция с ЛГ/М1



Фиг.1. Графичен израз на уравнението на Лайнуивър – Бърк за микробиална ЛГ при субстрат линолова киселина

Въз основа на уравнението на Лайнуивър – Бърк бяха изчислените стойностите на K_m и V_{max} съответно $3.4137 \cdot 10^{-6}$ М и $3.2573 \cdot 10^{-6}$ М/mg.min.

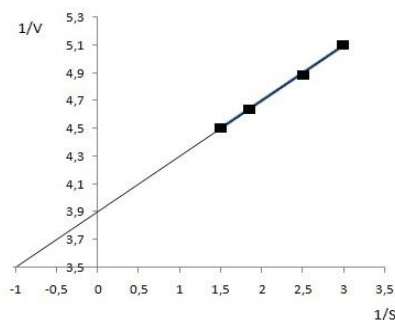
2.2. Кинетика на ензимно катализирана реакция на ЛГ/М2



Фиг.2. Графичен израз на уравнението на Лайнуивър – Бърк за микробиална ЛГ при субстрат линоленова киселина

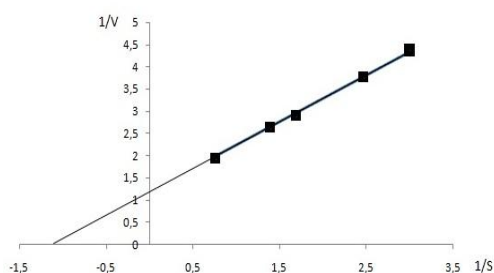
Бяха изчислени стойностите на K_m и V_{max} съгласно фиг. 2 както следва $0.1303 \cdot 10^{-6}$ М и $1.5152 \cdot 10^{-6}$ М/мг.мин.

2.3. Кинетика на ензимно катализирана реакция на ЛГ/соя 1



Фиг.3. Графичен израз на уравнението на Лайнуивър – Бърк за ЛГ от соя 1 при субстрат линолова киселина

От фиг. 3 бяха изчислени кинетичните параметри за ЛГ от соя 1 (K_m $0.1026 \cdot 10^{-6}$ М ; V_{max} $0.2564 \cdot 10^{-6}$ М/мг.мин).



Фиг.4. Графичен израз на уравнението на Лайнуивър – Бърк за ЛГ от соя 1 при субстрат линоленова киселина

От фиг. 4 стойностите за K_m и V_{max} бяха получени както следва: $0.8849 \cdot 10^{-6}$ М и $0.8403 \cdot 10^{-6}$ М/мг.мин.

Получените кинетични параметри от направените изследвания бяха обобщени в табл.1.

Табл. 1. *Стойности на кинетичните параметри на ензимните препарати*

Източник за изолиране/Субстрат	Km, [10^{-6} M]	Vmax, [10^{-6} M/mg.min]
М 1/Линолова киселина	3.4137	3.2573
М 2/Линоленова киселина	0.1303	1.5152
Соя 1/Линолова киселина	0.1026	0.2564
Соя 1/Линоленова киселина	0.8849	0.8403

Максимална скорост Vmax се постига при пълно насищане на ензима, т. е. липса на свободни ензимни молекули. От направените измервания се вижда, че максимална скорост на реакцията се наблюдава при М 1 в присъствие на линолова киселина като субстрат (Vmax $3.2573 \cdot 10^{-6}$ M/mg.min) и М 2 с линоленова киселина (Vmax $1.5152 \cdot 10^{-6}$ M/mg.min). Ниски стойности на Vmax има при ЛГ от соя 1 с линолова и линоленова киселина.

Константата на Михаелис-Ментен (K_m) е показател за сродството на ензима към неговия субстрат в рамките на ензим-субстратния комплекс - колкото по голяма е тя, толкова по-лесно ензима се освобождава от своя субстрат. Следователно, най-ниско сродство се наблюдава при М1 с линолова киселина ($K_m 3.4137 \cdot 10^{-6}$ M). Висок ензимен афинитет има при соева ЛГ със субстрат от линоленова киселина ($K_m 0.1026 \cdot 10^{-6}$ M).

3.Процедура за изолиране и пречистване на ЛГ от соя 2

Използвана бе процедурата за изолиране и пречистване на ЛГ от соя. Посредством процеса ултрафилтрация, под действието на налягане в ултрафилтрационната клетка, ензимните разтвори бяха десетократно концентрирани и пречистени.

4.Определяне на белтъчното съдържание по метода на Лоури

Ензимният препарат бе изследван по отношение на белтъчното съдържание, съгласно класическия метод на Лоури.

След извършени спектрофотометрични изследвания 1 ml ензимен препарат от соя 2, след извършена процедура на ултрафилтрация, показва белтъчно съдържание 5.3272 mg/ml.

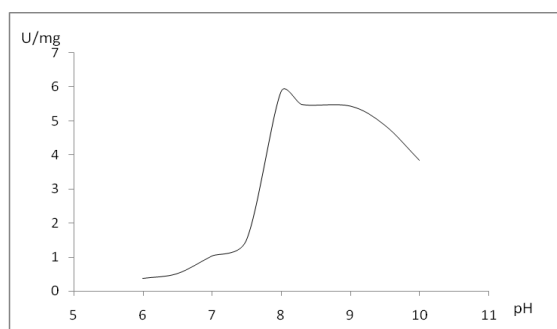
5.Изследване ефекта на субстратната концентрация върху ЛГ от соя 2 активност

Линейният диапазон от кинетичната крива за определяне на ензимна активност от соя 2 в присъствие на линоленова киселина ($6.47 \cdot 10^{-4}$ M) се наблюдава в рамките на първата минута със стойности на абсорбция 0.242, след което зависимостта нараства експоненциално третата минута в рамките на 5 min за протичане на ензимно катализираната реакция с достигане стойност на проследяваната абсорбция 0.255.

При изследване на кинетиката на реакцията в присъствие на ЛГ от соя 2 и линоленова киселина ($16.15 \cdot 10^{-4}$ M) линейност се наблюдава при първата минута с достигане на абсорбция 0.225, след което кривата експоненциално нараства до стойност на абсорбцията 0.255.

6.Ефект на рН върху ензимната активност

Измерването на ензимната активност при различно рН на средата и отчитатено на характерната абсорбция за протеклата реакция бе извършено спектрофотометрично на UV – спектрофотометър (λ 234 nm), с предварително инкубиране на субстратния разтвор с различни рН стойности на 0.2 M боратен буфер.

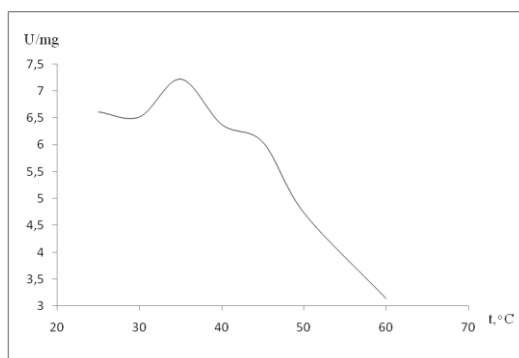


Фиг. 5. Ефект на рН върху ЛГ активност

В резултат на експериментално получения рН профил на ЛГ от фиг.5 ясно се забелязва, че характерният pH_{opt} на ензима е 8.0.

7. Ефект на температурата върху ензимната активност

Ефектът на температурата свободна ЛГ бе определен спектрофотометрично чрез измерване активността на ЛГ при седем различни температурни стойности за интервала от 20 °С до 65 °С и предварително инкубиране на разтворите на термостатираща вана. Измерванията бяха проведени чрез UV – спектрофотометър при λ 234 nm.

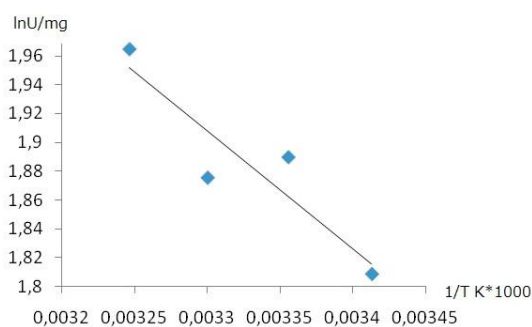


Фиг.6. Ефект на температурата върху ЛГ активност

От проследения температурен профил, изобразен на фиг. 6 ясно се забелязва, че характерният $T_{\text{опт}}$ за ЛГ от соя 2 е 35.0 °С.

8. Определяне на активиращата енергия за ЛГ кинетика

Бе проследен графичният израз на активиращата енергия за ЛГ от соя 2, съгласно методиката, посочена в раздел “Методи”.



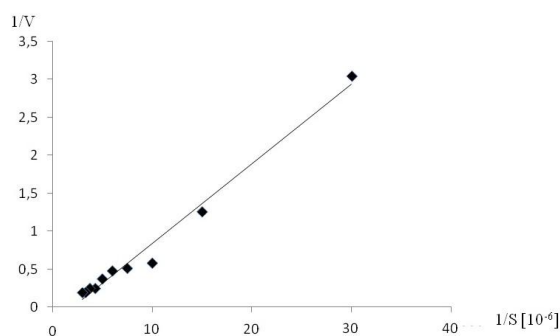
Фиг.7. Графичен израз за активираща енергия на ЛГ от соя

От фиг. 7 бе получена стойността на E_a , а именно 6.82 kJ/mol, необходими за прескачане на енергийната бариера на ЛГ катализирана реакция.

9. Кинетични параметри на ЛГ от източник соя 2

Кинетиката на ЛГ от соя 2 бе проследена спектрофотометрично на UV – спектрофотометър (λ 234 nm) в присъствие на субстратни разтвори с различна концентрация.

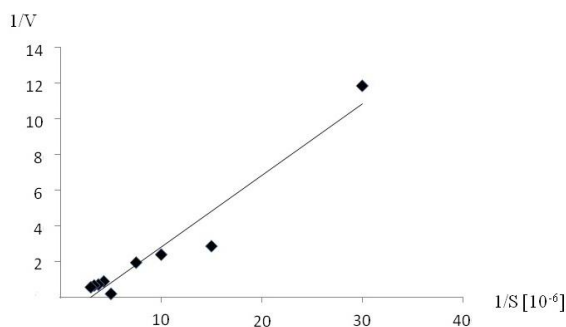
9.1. ЛГ активност на ензимен препарат от соя 2 в присъствие на линолова киселина ($6.47 \cdot 10^{-4} \text{ M}$)



Фиг.8. Графичен израз на уравнението на Лайнуивър – Бърк за ЛГ от соя 2 в присъствие на линолова киселина

От фиг. 8, въз основа на уравнението на Лайнуивър – Бърк бяха изчислени стойностите на кинетичните параметри K_m и V_{max} за ЛГ от соя 2 съответно $0.472 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ и $4.717 \cdot 10^{-6} \text{ M/mg.min}$.

9.2. ЛГ активност на ензимен препарат от соя 2 в присъствие на линоленова киселина ($16.15 \cdot 10^{-4} \text{ M}$)



Фиг.9. Графичен израз на уравнението на Лайнуивър – Бърк за ЛГ от соя 2 в присъствие на линоленова киселина

От фиг. 9 получихме следните стойности за K_m и V_{max} съответно $0.323 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ и $0.008 \cdot 10^{-6} \text{ M/mg.min}$.

Получените след изчисления стойности на кинетичните параметри K_m и V_{max} за ЛГ от източник соя 2 бяха обобщени в табл.2.

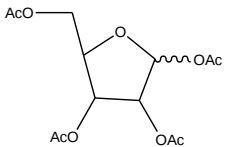
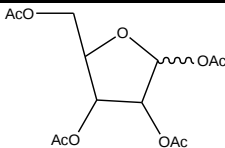
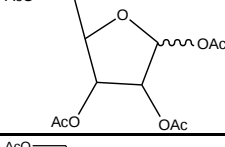
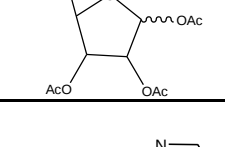
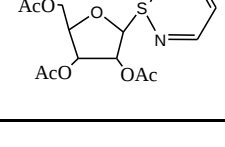
Табл.2. Кинетични параметри за ЛГ от соя. pH и $T_{опт}$ за ензима

Ензим	Белтъчно съдържание mg/g	Активност U/mg	K_m , $10^{-6}M$	V_{max} , 10^{-6} M/mg.min	E_a , kJ/mol	$T_{опт}$, ° C	pH $_{опт}$
Свободна ЛГ от соя 2	5,3272	5,3499	0,472	4,716	6,82	35	8,0

10. Синтетични подходи за получаване аналози на рибавирин като потенциални инхибитори на ЛГ от соя

Изследвани бяха различни условия на синтез на инхибитори, които са посочени на таблицата по – долу (табл.3).

Табл.3. Експериментирани условия на синтез на инхибитори на ЛГ от соя 2

Гликозиден донор	eq. (mmol)	Акцептор	eq. (mmol)	Люисова киселина	eq. (mmol)	Условия	Добив %
	1	Карбамид Карбамид	1.5 2	$Cu(OTf)_2$ TMXC	2 0.5	1 час, стайна температура; 0°C, 24 часа;	48.03 3.01
	1	Карбамид	2	$AgOTf$	0.5	1 час, стайна температура	23.84
	1	Тиокарбамид	1	TMSOTf	2	1 час, стайна температура	50.00
	1 0.8 0.94	Карбамид	2 1.6 1.89	$BF_3 \cdot OEt_2$	2 1.6 1.89	24 часа, стайна температура	7.04 8.4 4.7
	1	Карбамид	2	$TiCl_4$	2	24 часа, стайна температура	9.0

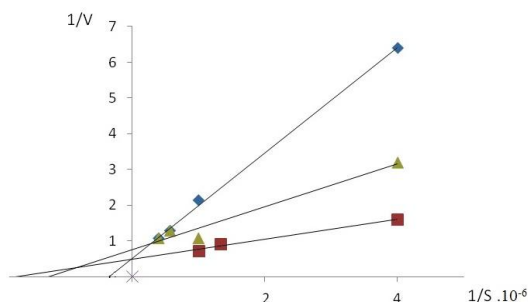
11. Изследване кинетиката на инхибиране на ЛГ от соя

Като начало реакцията на инхибиране на ЛГ от соя 2 беше изследвана в присъствие на две природни съединения, известни със своята висока инхибиторна активност спрямо различни ензимни системи в човешкия организъм - рибавирин и галантамин. По-късно кинетиката на инхибиране беше изследвана и в присъствие на новосинтезирания синтетичен инхибитор, 2,3,5 – триацетил – 1 – β – рибофуранозил – тиокарбамид (^1H – ЯМР (CDCl_3) – 5.27 (1H, ^1H , m); 5.08 (1H, ^2H , m); 5.06 (1H, ^3H , m); 4.97 (1H, ^aNH , m); 4.37 (1H, ^bNH , m); 4.26 (1H, ^4H , m); 4.12 (1H, ^{5a}H , m); 3.73 (1H, NH, m); 3.78 (1H, ^{5b}H , m); 2.04 (9H, $^3\text{CH}_3$, m)).

Предварително бяха инкубирани 2.1 ml петкратно разреден инхибиторен разтвор с 0.1 ml петкратно разреден с 0.1 M боратен буфер с pH 9.0 субстрат и непосредствено преди измерването бе добавен 0.04 ml ензимен препарат с концентрация 20 $\mu\text{g/ml}$. Измерването бе извършено на UV – спектрофотометър (234 nm) за 3 min на кинетичен режим на апарата.

11.1. Определяне кинетиката на инхибиране на ЛГ с участието на природни инхибитори

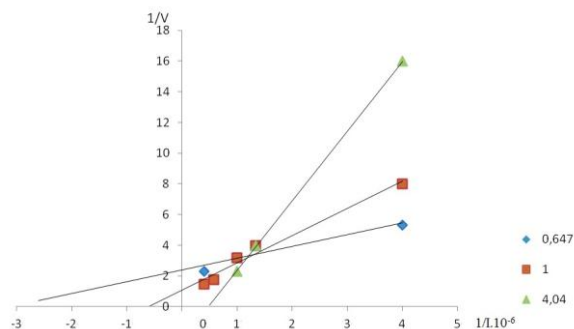
- Рибавирин



Фиг.10. Графичен израз на уравнението на Лайнуивър – Бърк при различни концентрации на линоленова киселина ($x \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $x=1; 4.04; 8.08$)

От фиг.10 ясно се забелязва, че типът на инхибиране е смесен.

Бяха извършени три серии измервания върху кинетиката на инхибиране на ЛГ с молекулата на рибавирин.

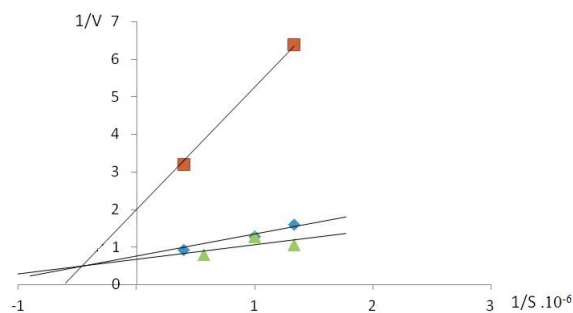


Фиг. 11. Графичен израз на уравнението на Лайнуивър – Бърк при различни концентрации на инхибитора рибавирин

От фиг. 11 бяха определени инхибиторните константи при съответните концентрации на инхибитора.

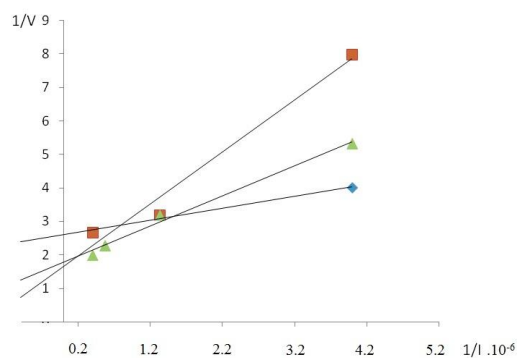
От фигурата по – горе за белазваме, че незначителни промени на инхибиторната концентрация водят до незначителни смущения при определяне стойностите на константата на инхибиране, което вероятно се дължи на допълнителни пространствени пречки, дължащите се на влиянието на мицелни струпвания.

- *Галантамин*



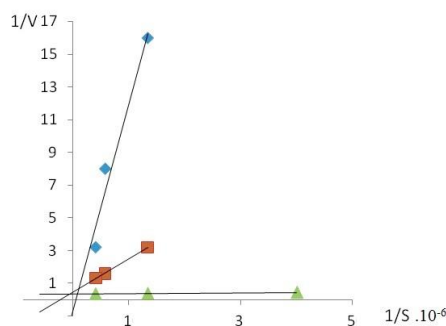
Фиг.12. Графичен израз на уравнението на Лайнуивър – Бърк при различни концентрации на линоленова киселина ($x \cdot 10^{-4} M$, $x=0.647; 1.0; 4.04$)

От графиката може да се определи типа на инхибиране, което в случая е смесено.



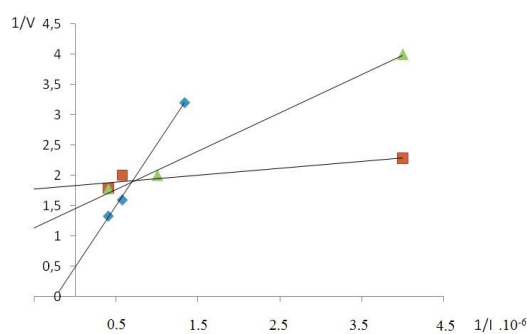
Фиг.13. Графичен израз на уравнението на Лайнуивър – Бърк при различни концентрации на галантамин ($x \cdot 10^{-6} M$, $x=0.081; 0.162; 0.324$)

11.2. Определяне кинетиката на инхибиране на ЛГ с участието на синтетични инхибитори



Фиг.14. Графичен израз на уравнението на Лайнуивър – Бърк при различни концентрации на субстрата линоленова киселина ($x \cdot 10^{-4} M$, $x=0.647; 1.0; 4.04$)

От фиг. 14 може да се определи типа на инхибиране. В случая инхибирането е смесено.



Фиг.15. Графичен израз на уравнението на Лайнуивър – Бърк при различни концентрации от инхибитора 2,3,5 – триацетил – 1 – β – рибофуранозил – тиокарбамид ($0.472 \cdot 10^{-6} M; 0.787 \cdot 10^{-7} M; 4.04 \cdot 10^{-6} M$)

От фиг. 15 бе определена константата на инхибиране на ЛГ с участие на новополучения синтетичен инхибитор, аналог на рибавирин.

Експериментално получените стойности за константите на инхибиране за природните и синтетича форма на инхибиторите са обобщени в таблицата по – долу (табл. 4).

Табл.4. *Константи на инхибиране за природните и синтетични инхибитори на ЛГ*

Инхибитор		Концентрация на инхибитор, 10^{-6} М	Концентрация на линоленова киселина, 10^{-4} М	Константа на инхибиране, K_i , 1×10^{-4} М
Природен	Рибавирин	0,647	$4,04 \cdot 10^{-4}$ М	2,6851
		1,000		7,5832
		4,040		0,3111
	Галантамин	0,081	$0,647 \cdot 10^{-4}$ М	34,4260
		0,162		1,4002
		0,324		8,6115
Синтетичен	2,3,5–триацетил – 1– β -рибофуранозил–тиокарбамид	4,040	$1 \cdot 10^{-4}$ М	0,3627
		0,472		8,8607
		0,786		0,4305

II.Изследване кинетиката на инхибиране на ензими от кръвната коагулационна каскада в присъствие на синтетични пептидни инхибитори, скъсени амидни аналози на изоформа 2 и 3 на антистазин

По - нататък нашата работа по настоящия дисертационен труд продължи върху изследване на кинетиката на инхибиране на ензимите от кръвната коагулационна каскада в присъствие на синтетични пептидни инхибитори, скъсени амидни аналози на изоформа 2 и 3 на антистазин. За целта бяха използвани следните предварително синтезирани инхибитори: Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-NH₂, Phe-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-NH₂ и Arg-Pro-Lys-Arg-NH₂ (скъсени аналози на изоформа 3) Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂; Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂; D-Arg-Gly-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂ и D-Phe-Pro-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂ (скъсени аналози на изоформа 2)

Тези скъсени аналози на изоформа 2 и 3 на антистазин бяха подбрани поради факта, че предварителни изследвания върху тяхното антикоагулантно действие показва

изключително висока активност в моделна кръвна плазма (данните са представени в табл. 5).

Табл. 5. IC_{50} стойности на амидни аналози на изоформа 2 и 3 на антистазин

№	Peptide amide	IC_{50} [nM]
1	Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-NH ₂	86.4
2	Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH ₂	1.19
3	Phe-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-NH ₂	326.4
4	Phe-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH ₂	1.32
5	D-Arg-Gly-Arg-Pro-Lys-Arg-NH ₂	4.15
6	D-Arg-Gly-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH ₂	3.55
7	D-Phe-Pro-Arg-Pro-Lys-Arg-NH ₂	1.08
8	Arg-Pro-Lys-Arg-NH ₂ *	639.0
9	Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH ₂ *	738.7

**амидни форми на природните изоформи 2 и 3 на антистазин*

От таблицата е видно, че повечето от фрагментните аналози на антистазин използвани в настоящото изследване показват над 200 пъти по-висока активност по отношение на природните изоформи 2 и 3 на антистазин.

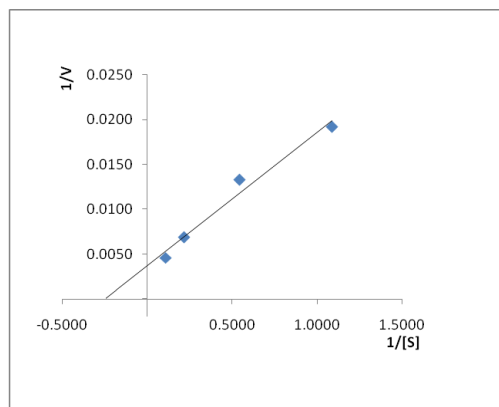
Ето защо ние си поставихме за цел да изследваме кинетиката на инхибиране на ензимите от каскадата на кръвната коагулация на тези аналози с цел да определим наличието на селективност по отношение на някой от ензимите, което би показало възможност за инхибиране на процеса на коагулация на кръвта на точно определен стадий от неговото протичане.

1. Определяне на кинетичните параметри (K_m и V_{max}) на моделния ензим трипсин

Поради хиперболичния характер на кривата $V=f(S)$ се налага линеаризация на уравнението на Михаелис-Ментен. За целта се прилага уравнението на Лайнуивър-Бърк:

$$1/V = 1/V_{max} + K_m/V_{max} \times 1/S$$

От получената графична зависимост се определят K_m и V_{max} . Графичната зависимост за реакцията на хидролиза на BAPNA от трипсин в отсъствие на инхибитор е представена на фиг. 16.



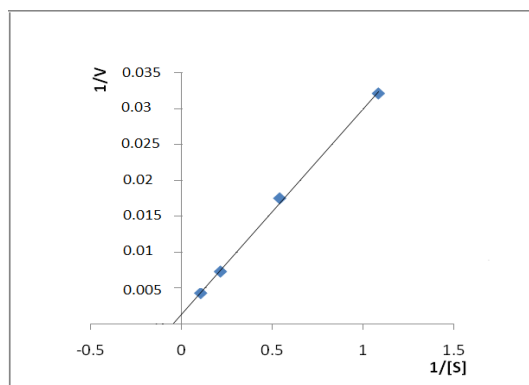
Фиг. 16. Графичната зависимост на реакцията на хидролиза на BAPNA от трипсин в отсъствие на инхибитор

Изчислените от получената графична зависимост кинетични параметри на реакция със субстрат BAPNA без инхибитор са: $K_m = 3.894 \cdot 10^{-4}$ M ; $V_{max} = 263.16$ mol/min.mg.

2. Определяне на кинетични параметри на трипсин в присъствието на инхибитор

По аналогичен на описания по-горе начин се определят и кинетичните параметри на реакциите, катализирани от трипсин със субстрат BAPNA, проведени в присъствието на инхибитор. Получените графични зависимости са представени на фигури 17-19.

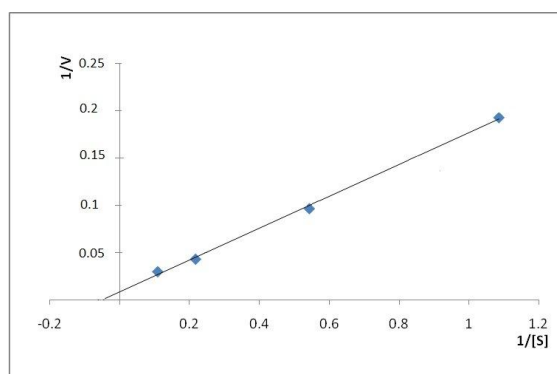
2.1. Хидролиза на BAPNA от трипсин в присъствие на инхибитор D-Phe-Pro-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂



Фиг. 17. Графичната зависимост на реакцията на хидролиза на BAPNA от трипсин в присъствие на инхибитор D-Phe-Pro-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂

Определените от графиката кинетичните параметри на тази реакция са: $K_m = 28 \cdot 10^{-4}$ M; $V_{max} = 100$ mol/min.mg.

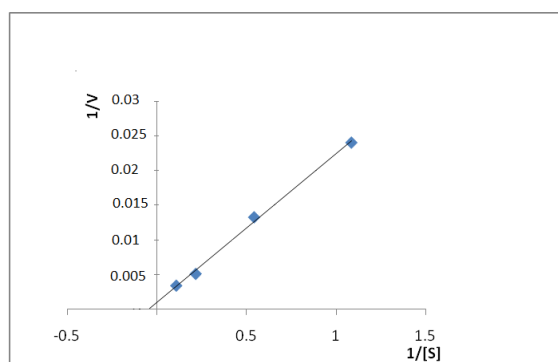
2.2.Хидролиза на BAPNA от трипсин в присъствие на Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂



Фиг. 18. Графичната зависимост на реакцията на хидролиза на BAPNA от трипсин в присъствие на инхибитор Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂

Изчислените от графиката кинетичните параметри на реакцията са: $K_m = 21 \cdot 10^{-4}$ M; $V_{max} = 125$ mol/min.mg.

2.3.Хидролиза на BAPNA от трипсин в присъствие на инхибитор Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂



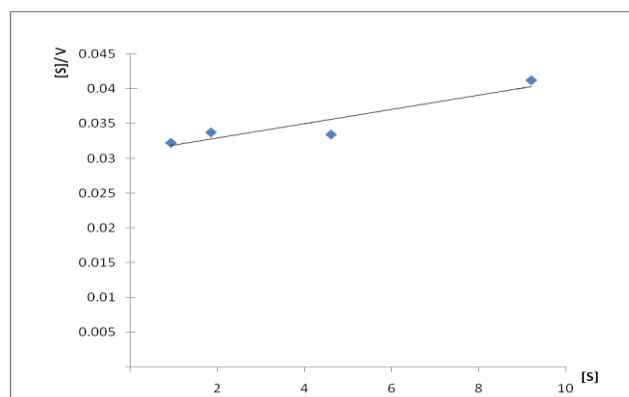
Фиг. 19. Графичната зависимост на реакцията на хидролиза на BAPNA от трипсин в присъствие на инхибитор Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂

Изчислените от графичната зависимост кинетични параметри на тази реакция са: $K_m = 21 \cdot 10^{-4}$ M ; $V_{max} = 100$ mol/min.mg.

2.4.Хидролиза на BAPNA от трипсин в присъствие на D-Arg-Gly-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂ представена в координати на Hanes

За реакцията на хидролиза в присъствие на инхибитор D-Arg-Gly-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂ се налага линеаризиране на уравнението на Михаелис-Ментен с използване на уравнението на Hanes за получаване на достоверно уравнение на права.

Разликата между двата метода е в използваната координатна система. Добре известно е, че при метода на Лайнуивър-Бърк се използва $1/V=f(1/[S])$, докато при метода на Hanes използваните координати са $[S]/V = f([S])$. Получените графични резултати са представени на фиг. 20.



Фиг. 20. Графичната зависимост на реакцията на хидролиза на BAPNA от трипсин в присъствие на инхибитор $D\text{-Arg-Gly-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH}_2$ представена в координати на Hanes

Изчислените от графиката кинетичните параметри на реакцията са: $K_m = 0.0333 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $V_{\max} = 33.333 \text{ mol/min.mg}$.

Изчислените кинетични параметри K_m и $V_{\max}$ на реакцията на хидролиза на субстрат BAPNA от трипсин в отсъствие и в присъствие на инхибитор са представени в табл. 6.

Табл. 6. Изчислени кинетичните параметри K_m и $V_{\max}$ за реакциите катализирани от трипсин

-	Без инхибитор	I ₁ <i>D-Phe-Pro-Arg-Pro- Lys-Arg-Lys-NH₂</i>	I ₂ <i>D-Arg-Gly-Arg-Pro-Lys- Arg-Lys-NH₂</i>	I ₃ <i>Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys- Arg-Lys-NH₂</i>	I ₄ <i>Arg-Pro-Lys-Arg- Lys-NH₂</i>
$K_m [\cdot 10^{-4} \text{ M}]$	3.894	28	0.0333	21	21
$V_{\max}$ [mol/min.mg]	263.16	100	33.333	125	100

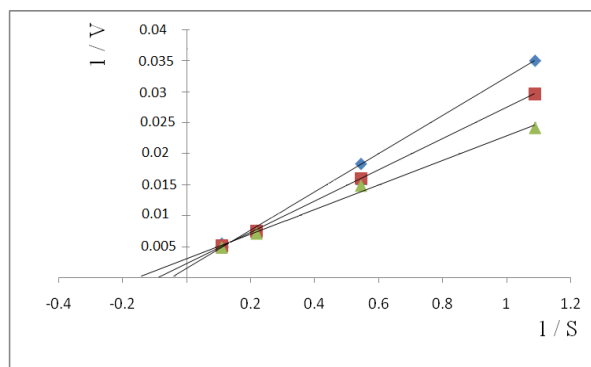
От горната таблица се вижда, че в присъствие на инхибитор максималната скорост намалява приблизително два пъти, а константата на Михаелис се увеличава приблизително седем пъти, т.е. намалява сродството на ензима към субстрата.

Следваща задача в нашата работа беше да се определи типът на инхибиране по отношение на инхибитори I_3 (Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂) и да се сравни с този за амидния аналог на природната изоформа 2 на антистазина I_4 (Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂). За тази цел при три различни концентрации на инхибитора и четири различни концентрации на субстрата се определя скоростта на ензимокатализираната реакция. приблизително седем пъти, т.е. намалява сродството на ензима към субстрата.

3. Определяне на типа на инхибиране в присъствие на инхибитор

3.1. I_3 : Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂ спрямо моделен ензим трипсин

Определянето на типа на инхибиране става съгласно описаната в материали и методи методика. Получените резултати са представени на фиг. 21.

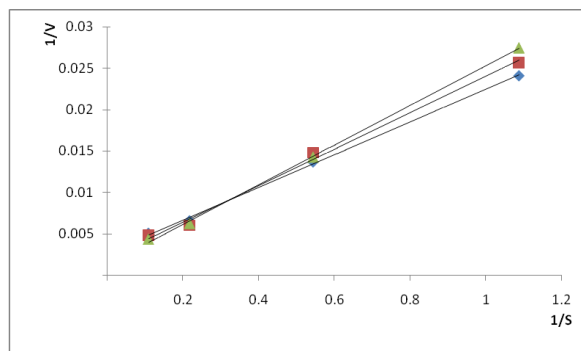


Фиг. 21. Графична зависимост на скоростта на ензимокатализираната реакция от субстратната концентрация при различни стойности на концентрацията на инхибитора Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂

Както се вижда от горната графика, трите прави не се пресичат нито на абсцисната, нито на ординатната ос, от което следва, че инхибирането е от смесен тип. Фактът, че правите се пресичат над ординатата, означава, че инхибирането е смесено конкурентно-неконкурентно.

3.2. Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂

Получената графична зависимост за определяне типа на инхибиране за амидния аналог на природната изоформа 2 на антистазина Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂ (I_4) е представена на фиг. 22:

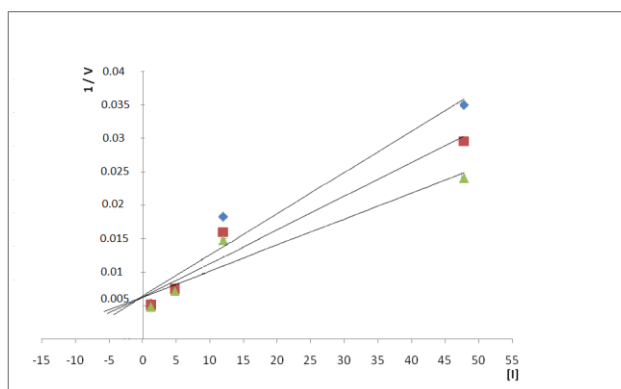


Фиг. 22. Графична зависимост на скоростта на ензимокатализираната реакция от субстратната концентрация при различни стойности на концентрацията на инхибитора Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂

От графиката се вижда, че трите прави не се пресичат нито на абсцисната, нито на ординатната ос, от което следва да се заключи, че инхибирането е от смесен тип. И в този случай пресечната точка на експерименталните прави е над абсцисната ос. Смесеното инхибиране отново е конкурентно-неконкурентно.

3.3. Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂

Беше определена графично и константата на инхибиране K_i за същите два инхибитора I_3 и I_4 . За целта при четири различни концентрации на инхибитора и три различни концентрации на субстрата се определя скоростта на ензимокатализираната реакция. Получените графични резултати са представени съответно на фигури 23 и 24.

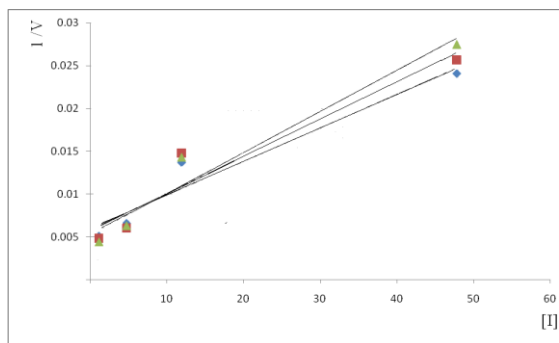


Фиг. 23. Графична зависимост на скоростта на ензимокатализираната реакция от концентрацията на инхибитора I_3 (Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂) при различни стойности на концентрацията на субстрата BAPNA

Константата на инхибиране $K_i = 60 \cdot 10^{-6}$ М е определена графично от проекцията на пресечната точка на трите прави върху абсцисата.

4. Определяне константата на инхибиране в присъствие на Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂

Графичната зависимост за определяне на константата на инхибиране на amidния аналог на природната изоформа на антистазина е представена на фиг. 24.



Фиг. 24. Графична зависимост на скоростта на ензимокатализираната реакция от концентрацията на инхибитора I₄ (Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂) при различни стойности на концентрацията на субстрата BAPNA

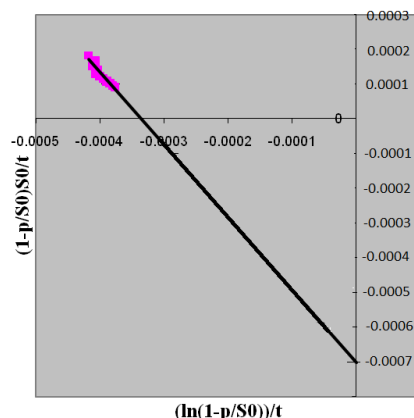
От проекцията на пресечната точка на трите прави върху абсцисата е определена K_i = 800.10⁻⁶ M.

Следваща стъпка в нашата работа беше да се определят кинетичните параметри K_m и V_{max} за реакцията на хидролиза на субстрата BAPNA в присъствие на инхибитора I₃ катализирана от сериновата протеиназа от каскадата на кръвната коагулация фактор Ха. При настоящото изследване беше използван инхибитор Тур-Пе-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂ с концентрация 1.195.10⁻³ M.

4.1. Интегрален метод на Михаелис – Ментен в координати $(1-p/S_0)S_0/t = f(\ln(1-p/S_0))/t$

Използваният интегрален метод на Михаелис-Ментен дава възможност да се построи графика с координати $(1-p/S_0)S_0/t = f(\ln(1-p/S_0))/t$.

В получената графична зависимост отреза от ординатата е равен на -V_{max}, а наклонът на получената права дава -K_m:



Фиг. 25. Графична зависимост за определяне на стойностите на K_m и V_{max} на фактор Ха в присъствието на инхибитор Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂ (I₃)

От полученото от графиката уравнение на права се вижда, че $K_m = 20.89 \cdot 10^{-4}$ M, а $V_{max} = 0.0007 \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$

В табл. 6 са систематизирани данните за кинетичните параметри на реакции, катализирани от фактор Ха в отсъствие на инхибитор, в присъствие на инхибитор амиден аналог на изоформа 3 на антистазина (Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-NH₂) и в присъствие на амиден аналог на изоформа 2 (Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂):

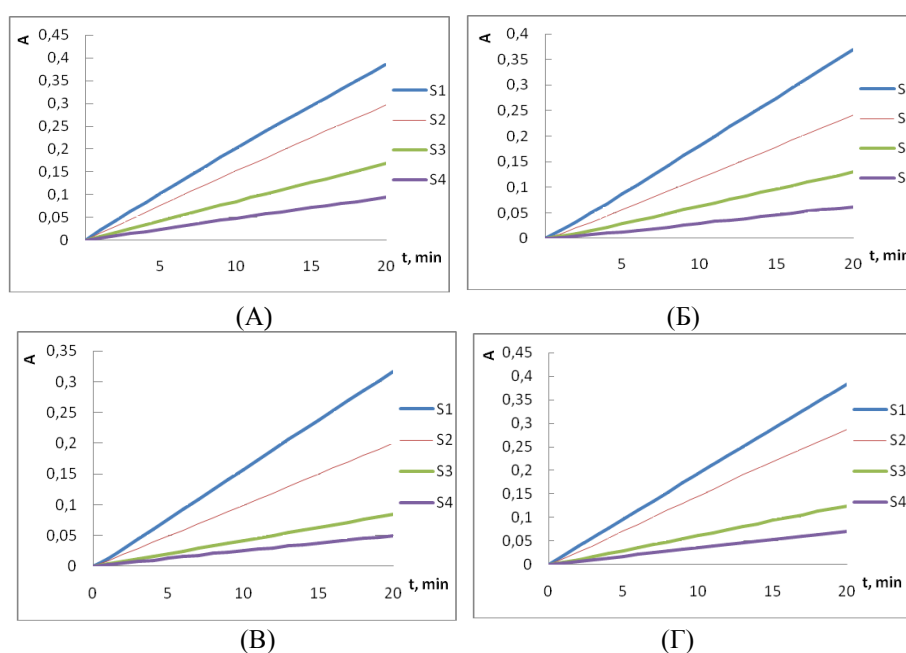
Табл. 6. Кинетични параметри на фактор Ха в реакции без инхибитор и с инхибитори I₃ (аналог на изоформа 2 на антистазина) и I₃' (аналог на изоформа 3 на антистазина)

Фактор Ха	Без инхибитор	*Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-NH ₂ (I ₃ ')	Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH ₂ (I ₃)
K_m [$\cdot 10^{-4}$ M]	9.02	9.15	20.89
V_{max} [$\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$]	0.033	0.019	0.0007

От таблицата ясно се вижда, че в присъствието на аналогът на изоформа 3, Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-NH₂, максималната скорост и константата на Михаелис се изменят незначително в сравнение с реакцията без инхибитор. В присъствието на аналога на изоформа 2 (Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂), обаче, K_m се увеличава двойно, а V_{max} намалява с два порядъка. Това е свидетелство за по-силните инхибиторни свойства на амидните аналози на изоформа 2 на антистазина.

5. *Определяне на кинетичните параметри със субстрат BAPNA на ензимите трипсин, тромбин, плазмин и фактор Ха.*

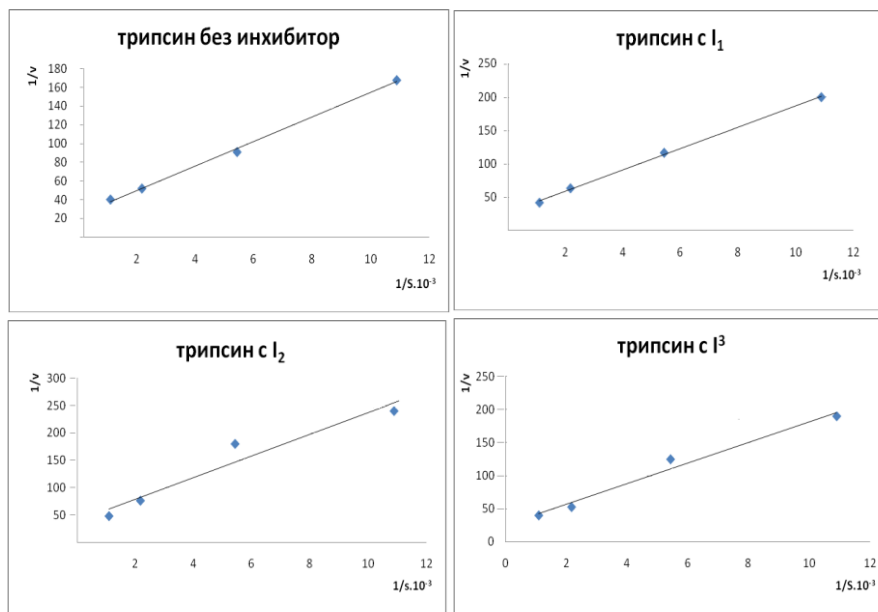
Изследванията за определяне на амидазна активност бяха проведени първоначално с моделен ензим трипсин в присъствие на четири различни концентрации на субстрата: $9.2 \cdot 10^{-4}$ М (S_1), $4.6 \cdot 10^{-4}$ М (S_2), $1.8 \cdot 10^{-4}$ М (S_3) и $0.9 \cdot 10^{-4}$ М (S_4) и в присъствие на инхибиторите: I_1 – Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-NH₂, I_2 – Phe-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-NH₂, I_3 – Arg-Pro-Lys-Arg-NH₂ с концентрация $1.87 \cdot 10^{-4}$ М. На фиг. 26 са представени резултатите от тези изследвания.



Фиг. 26. *Кинетична зависимост на абсорбцията на ензимно катализираната реакция на трипсин без инхибитор (А) и с инхибиторите: I_1 (Б), I_2 (В) и I_3 (Г).*

6. *Изчисляване на кинетичните параметри K_m и V_{max} на трипсин в присъствие на амидни аналози на изоформа 3 на антистазин*

За изчисляване на V_{max} и K_m се построява зависимостта $1/v=f(1/[S])$ (графичен модел на Лайнуивър-Бърк).



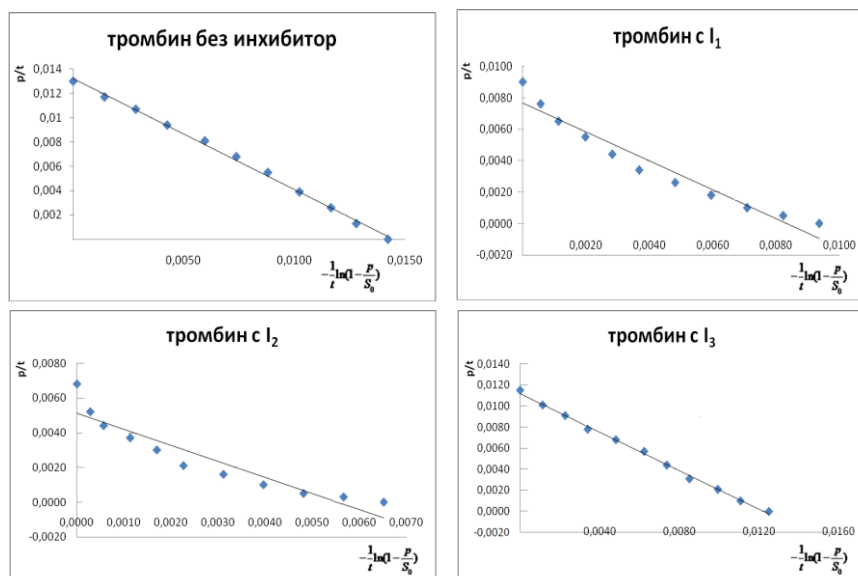
Фиг.27. Демонстрационна графика на определяне на кинетичните параметри на трипсин без инхибитор и с инхибиторите: I_1 , I_2 и I_3 с прилагане на метода на Лайнуивър-Бърк

Резултатите, получени от изчисленията са обобщени в табл.7.

Табл. 7. Кинетични параметри на ензимно катализираните реакции на трипсин без инхибитор и с инхибиторите: I_1 , I_2 и I_3 , определени по метода на Лайнуивър-Бърк

трипсин	без инхибитор	с I_1 (Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-NH ₂)	с I_2 (Phe-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-NH ₂)	с I_3 (Arg-Pro-Lys-Arg-NH ₂)
$K_m \cdot 10^{-4}$, [M]	5,6	6,0	5,8	6,1
V_{max} , [$\mu\text{mol/min.mg}$]	0,042	0,038	0,025	0,039

По-нататък беше проследена кинетиката на ензимно катализираната реакция със субстрат BAPNA с концентрация $9.2 \cdot 10^{-4}$ M и ензимите от каскадата на кръвната коагулация тромбин, плазмин и фактор Ха. Определянето на техните параметри беше направено, използвайки интегралната форма на уравнението на Михаелис-Ментен съгласно посочената методика в материали и методи. Получените графични зависимости от обработките на пълните кинетични криви са представени на фиг. 28, фиг. 29 и фиг. 30.

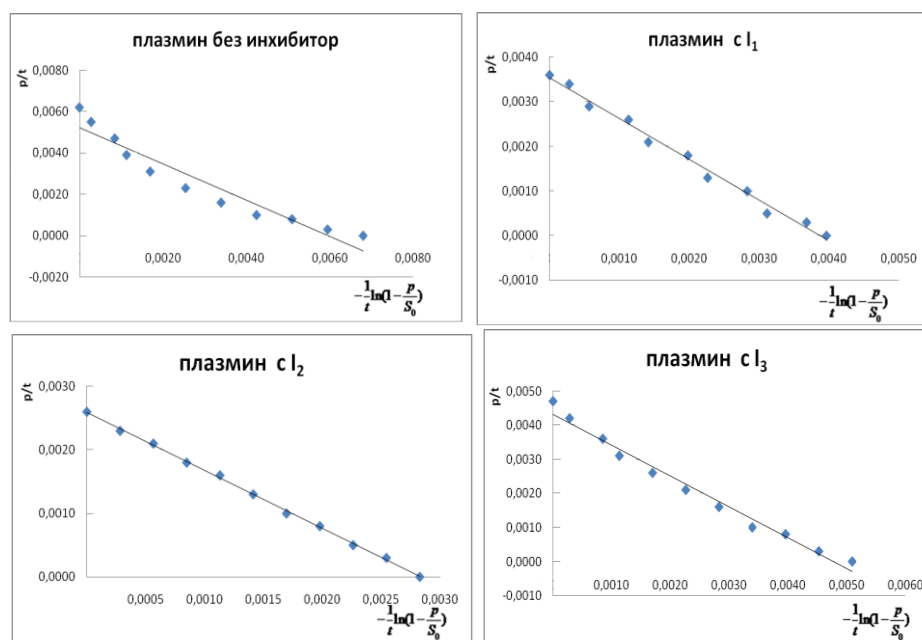


Фиг. 28. Демонстрационна графика на кинетични зависимости на тромбин без инхибитор и с инхибитор.

От обработката на кинетичните криви съгласно методичната част бяха изчислени стойностите за константата на Михаелис-Ментен (K_m) и за максималната скорост (V_{max}) на реакциите без и с инхибитор. Резултатите са представени в табл. 8.

Табл. 8. Кинетични параметри на ензимно катализираните реакции на тромбин без инхибитор и с инхибиторите: I_1 , I_2 и I_3 .

тромбин	без инхибитор	с I_1 (Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-NH ₂)	с I_2 (Phe-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-NH ₂)	с I_3 (Arg-Pro-Lys-Arg-NH ₂)
$K_m \cdot 10^{-4}$, [M]	9,14	9,17	9,22	9,16
V_{max} , [μmol/min.mg]	0,051	0,029	0,019	0,043



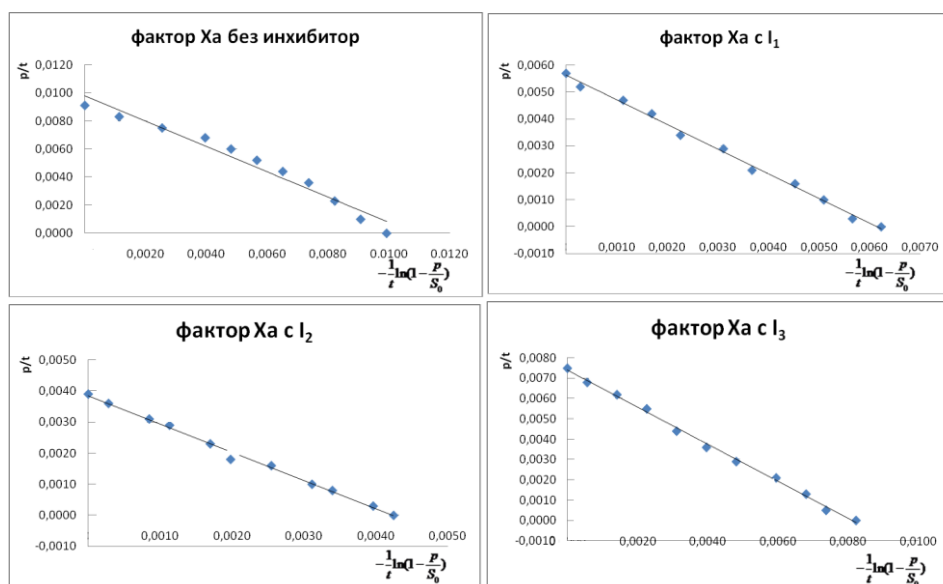
Фиг.29. Демонстрационна графика на кинетични зависимости на плазмин без инхибитор и с инхибитор.

От обработката на кинетичните криви съгласно методичната част бяха изчислени стойностите за константата на Михаелис-Ментен (K_m) и за максималната скорост (V_{max}) на реакциите без и с инхибитор. Резултатите са представени в табл. 9.

Табл. 9. Кинетични параметри на ензимно катализираните реакции на плазмин без инхибитор и с инхибиторите: I_1 I_2 и I_3 .

плазмин	без инхибитор	с I_1 (Tyr-Ile-Arg-Pro- Lys-Arg-NH ₂)	с I_2 (Phe- Ile-Arg-Pro- Lys-Arg-NH ₂)	с I_3 (Arg-Pro-Lys-Arg- NH ₂)
$K_m \cdot 10^{-4}$, [M]	8,79	9,14	9,13	9,08
V_{max} , [μ mol/min.mg]	0,022	0,014	0,010	0,017

Намерените стойности за константата на Михаелис-Ментен (K_m) се променят незначително, като по-високи са тези за инхибираните реакции в сравнение с неинхибираната реакция. Стойностите за максималната скорост (V_{max}) намаляват при реакциите на инхибиране.



Фигура.30. Демонстрационна графика на кинетични зависимости на фактор Ха без инхибитор и с инхибитор.

От обработката на кинетичните криви съгласно методичната част бяха изчислени стойностите за константата на Михаелис-Ментен (K_m) и за максималната скорост (V_{max}) на реакциите без и с инхибитор. Резултатите са представени в табл.10.

Табл. 10. Кинетични параметри на ензимно катализираните реакции на фактор Ха без инхибитор и с инхибиторите: I_1 , I_2 и I_3 .

фактор Ха	без инхибитор	с I_1 (Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-NH ₂)	с I_2 (Phe-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-NH ₂)	с I_3 (Arg-Pro-Lys-Arg-NH ₂)
$K_m \cdot 10^{-4}$, [M]	9,02	9,15	9,10	9,14
V_{max} , [μ mol/min.mg]	0,033	0,019	0,013	0,025

Намерените стойности за константата на Михаелис-Ментен (K_m) се променят малко, като по-високи са тези за инхибираните реакции в сравнение с неинхибираната реакция. Стойностите за максималната скорост (V_{max}) намаляват при реакциите на инхибиране.

Въз основа на проведените изследвания за действието на синтетичните инхибитори: I_1 - Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-NH₂, I_2 – Phe-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-NH₂, I_3 – Arg-Pro-Lys-Arg-NH₂ върху кинетиката на сериновите протеинази, участващи в кръвосъсирването беше установен вида на инхибиране. Константата на Михаелис-

Ментен (K_m) при всички разгледани ензимно катализирани реакции е без съществена промяна спрямо случая без инхибиране. От тук може да се направи изводът, че имаме случай на неконкурентно инхибиране.

Сравнение на инхибиторите константи върху трипсина, тромбина, плазмина и фактор Ха може да се направи, изхождайки от стойностите за K_i , обобщени в табл. 11.

Табл. 11. *Инхибиторни константи спрямо изследваните серинови протеинази*

Ензими	K_i за I_1	K_i за I_2	K_i за I_3
Трипсин	$14.3 \cdot 10^{-4}$	$2.59 \cdot 10^{-4}$	$18.23 \cdot 10^{-4}$
Тромбин	$2.47 \cdot 10^{-4}$	$1.11 \cdot 10^{-4}$	$10.05 \cdot 10^{-4}$
Плазмин	$3.27 \cdot 10^{-4}$	$1.56 \cdot 10^{-4}$	$6.34 \cdot 10^{-4}$
Фактор Ха	$2.54 \cdot 10^{-4}$	$1.22 \cdot 10^{-4}$	$5.84 \cdot 10^{-4}$

Както може да се види, за всички ензимно катализирани реакции най-ниски стойности за инхибиторната константа са изчислени за I_2 – Phe- Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-NH₂, а най-високи за I_3 – Arg-Pro-Lys-Arg-NH₂.

III. Иммобилизация на ЛГ върху носители с различна природа

1. Иммобилизация на ЛГ от Penicillium sp. върху носител

Микробна ЛГ (1% разтвор) беше иммобилизирана ковалентно на съполимер от акрилонитрил, акриламид и титанов бутоксид (фиг. 31).



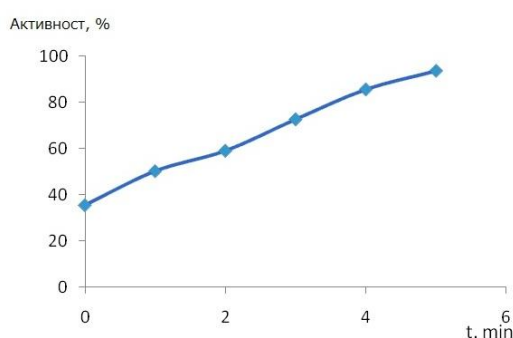
Фиг.31. *Носител от съполимер на акрилонитрил, акриламид и титаниев бутоксид*

1.1. Определяне активността на иммобилизиран ензим

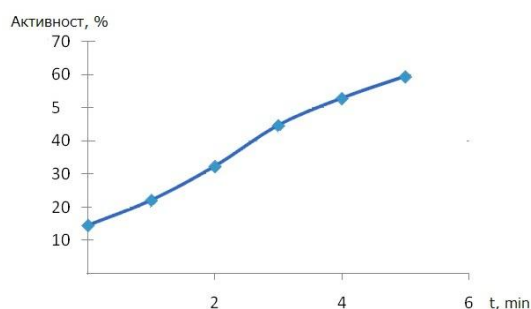
Активността на иммобилизиранения ензим бе определена спектрофотометрично (λ 234 nm). Измерванията се правят през интервал от 15 секунди при непрекъснато

разбъркване на разтвора с имобилизираният ензим. Приготвена бе контрола, съдържаща 1 ml боратен буфер (pH 9.0) и 2 ml субстратен разтвор с определена концентрация, срещу проба, съдържаща 1ml аликвот от разтвора на имобилизирания ензим и 2 ml субстратен разтвор.

1.2. Активност и остатъчна активност на имобилизиран микробиален ензим (М3)



Фиг. 32. *Кинетика на реакцията на имобилизиран микробиален ензим при субстрат линолова киселина*



Фиг.33. *Кинетика на реакцията на имобилизиран микробиален ензим при субстрат линоленова киселина*

При сравнение на графиките от фиг. 32 и 33 се забелязва, че по-висока активност на ензима (М3) има при наличие на линолова киселина в средата.

На фиг. 33 относителната активност на ензима започва от 35 % и достига до 92-93 %. В случая на консумация на линоленова киселина началната активност на М3 е 15 % и достига до ниво от 60 %.

Таблица.12. *Каталитични свойства на свободни и имобилизирани ЛГ изолирани от Penicillium sp. и соеви зърна*

Състояние на ЛГ/Източник за изолиране	Белтъчно съдържание, mg/ml, mg/g	Относителна активност, %		Активност, Е/мг		Km, 10 ⁻⁶ М		Vmax, 10 ⁻⁶ М/mg.min	
		ЛК	ЛНК	ЛК	ЛНК	ЛК	ЛНК	ЛК	ЛНК
Свободна ЛГ/М 2	0.5	-	-	2.15	1.34	3.4137	-	3.2573	-
Свободна ЛГ/М 3	0.5	-	-	2.02	1.27	0.1303	0.1303	-	1,5152
Свободна ЛГ/Соя 1	0.7	-	-	0.237	0.251	0.1026	0.8849	0.2564	0.8403
Имобилизирана ЛГ/М3/РАА, AN, TiO2	0.5	16.9	1.38	-	-	-	0.82	-	0.7915
Имобилизирана ЛГ/М3/РАА, AN	5.4	-	6.5	-	-	-	0.89	-	0.8469

От данните за Km в таблица 12 за свободния и имобилизирания микробиален ензим (М 3) отчетохме, че конформационни промени в активният център на ензима не са настъпили.

2.Имобилизация на ЛГ от соя върху новополучени матрици на основата на дендримери

След направените изследвания по отношение на предварителна активация на носителите, установихме, че не е необходима такава предварителна подготовка. По природа дендримерните матрици притежават богатство от функционални групи, които благоприятстват процеса на имобилизация на ензима, като същевременно оказват защитно действие срещу вероятната околност на мицелни струпвания, които пречат на функционалността на ензима, влияейки на активния му център.

2.1.Определяне на влагосъдържание, а.с.в, на имобилизирана матрица

Показателите на имобилизираната матрица (табл.13) бяха проследени с помощта на апарат влагоанализатор на програмен режим.

Таблица.13. Показатели на имобилизираните с ЛГ от соя 2 дендримерни матрици

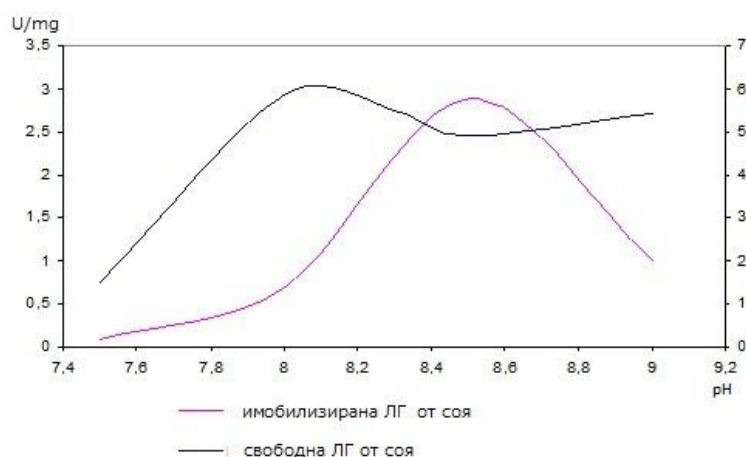
Вид дендримерен носител	Количество влага, %		а.с.в	
	контрола	проба	контрола	проба
MTES/CAP/PAMAM	81,944	64,437	17,507	18,056
TMOS/CAB/PAMAM	71,332	76,127	23,873	34,231

2.2. Определяне ензимната активност на имобилизирания ензим

Съгласно методиката за определяне на ЛГ активност получаваме за имобилизирана ЛГ от соя 2 относителна активност 26.0%.

2.3. Ефект на рН върху имобилизирания ензим

Изчисляването на pH_{opt} за имобилизирана ЛГ от соя 2 бе проведено за рН интервала 7.0 – 9.0.

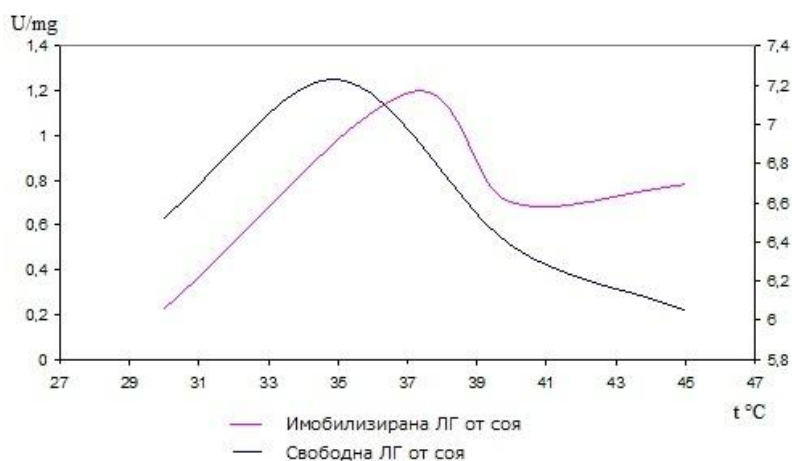


Фиг. 34. pH_{opt} на свободна и имобилизирана ЛГ от соя 2 върху TMOS/CAB/PAMAM

От фиг. 34 ясно се вижда, че pH_{opt} на имобилизирана ЛГ е със стойност 8.5.

2.4. Ефект на температурата върху имобилизирания ензим

Изчисляването на T_{opt} за имобилизирана ЛГ от соя 2 бе извършено в температурен диапазон 30 – 50 °C.



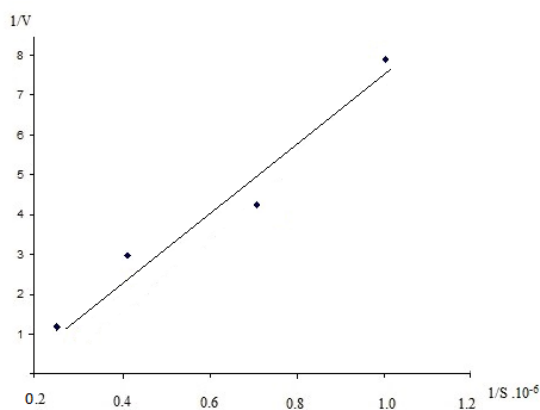
Фиг.35. Температурен оптимум на свободна и имобилизирана ЛГ от соя 2 върху TMOS/CAB/PAMAM

От фиг. 35 става ясно, че температурният оптимум за имобилизирана ЛГ от соя 2 е 37°C.

2.5. Определяне на активиращата енергия на ЛГ кинетика за имобилизиран ензим

След проведените изследвания за стойността на енергийната бариера за протичане на ензимно катализираната реакция за ЛГ от соя 2 върху носител TMOS/CAB/PAMAM получихме, че E_a е със стойност 0.107 kJ/mol.

2.6. Определяне кинетичните параметри на имобилизирана ЛГ



Фиг. 36. Изчисляване кинетичните параметри на имобилизиран ензим съгласно метода на Лайнуивър - Бърк

Съгласно фиг. 36 получената стойност за K_m на имобилизирана ЛГ е $K_m 4.5994 \cdot 10^{-6}$ M, а за V_{max} $0.511 \cdot 10^{-6}$ M/mg.min.

Параметрите за имобилизирана ЛГ от соя 2 върху дендримерен носител TMOS/CAB/PAMAM са обобщени в табл. 14.

Табл.14. Изчислени параметри за имобилизирана ЛГ от соя 2 върху дендримерен носител

Природа на дендримерния носител/ЛГ от соя 2	Белтък, mg/g	Относителна активност, %	pH _{опт}	T _{опт} , °C	Активираща енергия, kJ/mol
TMOS/CAB/PAMAM/ЛГ от соя 2	0.2434	26.0	8.5	37	0.1067

3.Измерване на кислородна консумация на ЛГ от микробиален източник М2 и М3

Консумацията на O₂ за пробите с ензими М 2, М 3 (свободен и имобилизиран) и ЛГ от соеви зърна в присъствието на съответно линолова и линоленова киселина се извършва чрез спектрофотометър Avantes-Spec 2048 (фиг. 37).



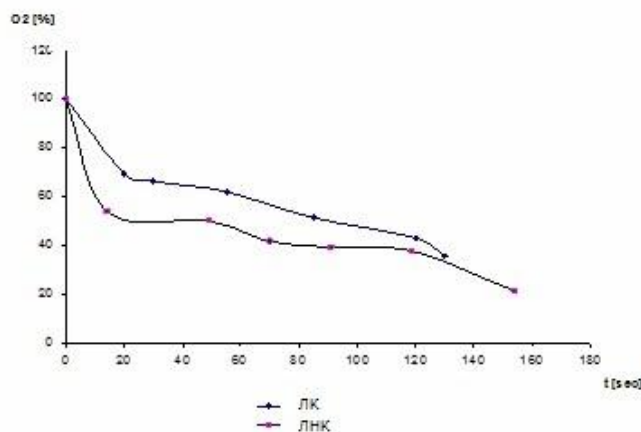
Фиг. 37. Постановка на Avantes-Spec 2048

Измерването се основава на понижаващия ефект на O₂ върху флуоресценцията от рутениев комплекс. Източникът на светлина излъчва вълна с дължина 475 nm. Флуоресценцията се извършва при дължина на вълната 600 nm.

Слаб сигнал отговаря на високи нива на O₂, а силен-ниско кислородно съдържание.

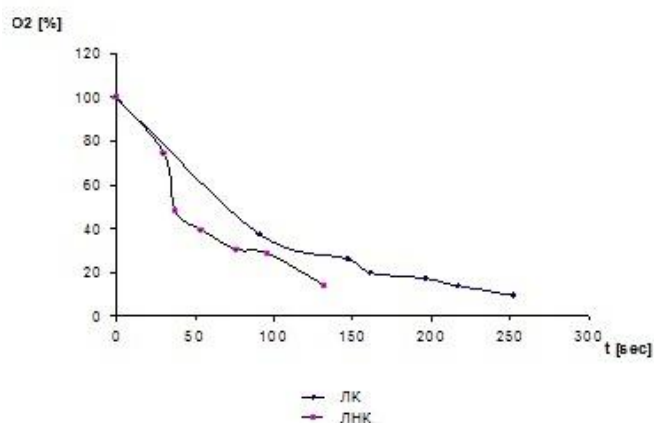
На наличните микробиални ензимни препарати (свободни и имобилизиран), се провежда измерване на кислородната консумация в присъствие на различни субстрати (линолова и линоленова киселина).

Експериментът се провежда като се подготвя следната реакционна среда: 25 μM субстратен разтвор, 1.530 g носител с имобилизирани 2.6 mg ензим/g носител, при непрекъснато разбъркване.



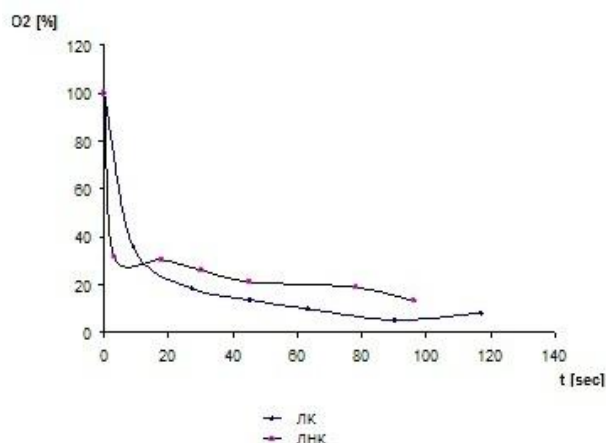
Фиг.38. Намаляване на количеството на кислорода в реакционната среда за свободна ЛГ от М 2

Процентното съдържание на кислорода за ЛГ с участието на линолова киселина показва по-високи стойности в сравнение с реакцията в присъствие на линоленовата киселина.



Фиг.39. Намаляване на количеството на кислорода в реакционната среда за имобилизирана ЛГ от М 3

Отново от фиг.39 се забелязва по – високия афинитет на ензима към линолова киселина.



Фиг.40. Намаляване на количеството на кислорода в реакционната среда за имобилизирана ЛГ от М 2

От фиг. 40 се забелязва, че около десетата секунда количеството на кислорода (%) достига стойности до 40%. Двете зависимости протичат по идентичен начин, поради стационариране на процеса.

След време от 10 с кривите за консумация на кислород за имобилизирания ензим (М 2) в присъствие на субстрати – линолова и линоленова киселина се пресичат. Това се обяснява с наличната хетерогенност в средата.

Процентното съдържание на кислорода за ензимните реакции с участието на линолова киселина показва по-високи стойности в сравнение това на линоленовата киселина, което се дължи на по-високия афинитет на ЛГ към линоловата киселина.

ДИСКУСИЯ

1. Изолране и охарактеризиране на ЛГ от растителен и микробиален произход

Изследвани бяха ЛГ от два различни източника: микробиален (М 2 и М 3) и растителен (соя 1 и соя 2).

Целта бе да се направи сравнение на изолираната суспензия от соев източник с ЛГ от микробиален търговски препарат (*Penicillium sp.*), произведен в Пластхим-Ботевград.

Възникнаха трудности при измерване активността на ЛГ от източник М 2 и М 3, което според нас се дължи на наличните в препаратите допълнителни пигменти. За

разрешаването на този проблем приложихме ултрафилтрация в ултрафилтрационна клетка Amicon, чрез която концентрирахме и пречистихме ензимния разтвор десет пъти.

Белтъчно съдържание, което определихме за микробиалния ензимен препарат е 0.5 mg/ml, а за ЛГ от соя 1 е 0.7 mg/ml. Представената специфична активност на препарата от производителя е 1000 U/mg. Следователно, получената активност на пречистените ензимни препарати М 2 и М 3 е около 500 пъти по – малка от посочената.

Свободната ЛГ от М 2 с участие на линолова киселина показва активност 2.15 E/mg, а с линоленова киселина 1.34 E/mg.

Определени бяха pH_{opt} (8.0), T_{opt} (35 °C) и E_a (0.107 kJ/mol) за свободна ЛГ от соя 2.

Изследвана беше ЛГ кинетика. Изчислихме кинетичните параметри на ензимно катализираните реакции за ЛГ от соя 1 и соя 2 и от щам на *Penicillium sp.* За целта използвахме спектрофотометричен метод. Целта на изследваната ензимна кинетиката е да се определят K_m , V_{max} и инхибиторната константа K_i .

Ензимокатализираните реакции са охарактеризирани с кинетичните параметри V_{max} и K_m , която може да бъде свързана математически със стабилността на ензим-субстратния комплекс (ЕС) и степента на превръщане.

По отношение на кинетиката на ензимните реакции с ЛГ от микробиален източник М2 получихме следните стойности за кинетичните параметри K_m и V_{max} , както следва: с линолова киселина - $3.4137 \cdot 10^{-6}$ М и $3.2573 \cdot 10^{-6}$ М/mg.min, с линоленова киселина - $0.1303 \cdot 10^{-6}$ М и $1.5152 \cdot 10^{-6}$ М/mg.min.

Стойностите на K_m и V_{max} за ЛГ от соя 1 са съответно: с линолова киселина - 0.1026 М и 0.2564 М/mg.min, с линоленова киселина - 0.8849 М, и 0.8403 М/mg.min.

Най-ниско сродство на ензима към субстрата се наблюдава при ЛГ от М 2 с линолова киселина ($K_m 3.4137 \cdot 10^{-6}$ М). Висок ензимен афинитет има при соева ЛГ със субстрат от линоленова киселина ($K_m=0.1026 \cdot 10^{-6}$ М).

Експериментално установихме, че по – високо сродство на ЛГ от соево брашно има субстратът линоленова киселина. Поради тази причина продължихме

изследванията върху ензимната кинетика за ЛГ от соя 2 с участие на линоленова киселина.

Изследвахме кинетиката и определихме кинетичните параметри на ензимокатализираната реакция за ЛГ от соя 2, в присъствие на линоленова киселина, като получихме следните стойности за константите K_m и V_{max} , както следва: $0.472 \cdot 10^{-6}$ М и $4.716 \cdot 10^{-6}$ М/мг.мин.

Изследвахме консумацията на кислород за ЛГ от микробиален източник. Установени бяха по-добри резултати за реакцията на диоксигениране на липиди от соевата ЛГ.

Определени бяха pH_{opt} (8.5), T_{opt} (37 °C) и E_a (0.1067 kJ/mol) за имобилизирана ЛГ от соя върху дендримерен носител. Наблюдава се леко отместване на pH_{opt} на имобилизирания ензим към по – алкално рН на средата, повишение на T_{opt} , което прави ензима по – температуроустойчив. Понижението в стойността на E_a доказва благоприятното влияние на матрицата върху молекулата на ензима по време на каталитичната реакция.

2. Синтез на ЛГ инхибитори, аналози на рибавирин

Молекулата на рибавирин показва добре изразени антивирусни активности *in vitro* и *in vivo* – присъединява се към мутагенен нуклеозид посредством вирусна РНК полимераза, проявява имуномодулиращи и инхибиращи ефекти за инозинмонофосфат дехидрогеназата (ИМФДХ).

За съжаление механизмът на действие на рибавирин е все още не добре изучен.

Известно е, че молекулата на рибавирин оказва своето действие посредством два механизма: директен и индиректен.

При директния механизъм рибавиринът навлиза в клетката, като пролекарство и се превръща последователно в рибавирин 50 - монофосфат (РМФ), - дифосфат (РДФ) и - трифосфат (РТФ) с помощта на три клетъчни кинази. Действията на РМФ, директен конкурентен инхибитор на ИМФДХ, намаляват вътреклетъчните нива на гуанозин трифосфат (ГТФ). Тъй като ГТФ е жизненоважен за транскрипцията на вирусните геноми и репликацията на РНК вирусите, ниски нива на ГТФ се смятат, че потискат

вирусната репликация. Рибавиринът инхибира вирусната гуанилил трансфераза и иРНК (гуанин-N-)-метилтрансферазна активност, поради което се синтезира иРНК с изменени 5'-сара структури и се блокира вирусната транскрипция.

Рибавирин фосфатите инхибират вирусната полимераза, от което следва, че ензимът е неспособен да произвежда главните положително усукани вериги на вирусната РНК.

При индиректния механизъм на действие на рибавирин се извършва силен контрол върху нивата на HCV РНК, посредством интрахепатален Т-хелперен и Т-супресорен клетъчен отговор, преминаване към Th1 цитокин профилна и регулирана активност на клетките "естествени убийци". Този адаптиращ имунен отговор подпомага елиминирането на заразените с вируса клетки.

Според литературни източници, съединения, които съдържат в структурата си първични OH или NH₂ групи, показват добър инхибиторен ефект срещу ЛГ.

Отчитайки този факт, синтезирахме аналог на рибавирин, като заместихме триазиновата база в първа позиция от рибозния остатък с тиокарбамидна група.

Изследвахме различни условия за синтез на аналози на рибавирин с потенциално инхибиторно действие върху ЛГ от соя (табл.3). Използваният подход за синтез на нови аналози на рибавирин включва едновременно прилагане на директна активация и активация през пространството на въглехидратната част (донор) с участие на люисови киселини (табл. 3).

От направените от нас експерименти беше установено, че използването на коя да е люисова киселина за активиране на реакцията на гликозилиране не доведе до получаването на задоволителни добиви от целевите крайни продукти. Ние отчетохме факта, че аминокгрупата в карбамида и тиокарбамида е много слаб нуклеофил и нейната електронна плътност не е достатъчна за да атакува слабо активираната под формата на перацетилирано производно рибоза. Ето защо приложихме комбинирано активиране едновременно на донора с помощта на Cu(OTf)₂ и допълнително активиране на аминокгрупата на гликозидния акцептор с помощта на триметилхлоросилан. Приложената стратегия доведе до получаване на целевия продукт с добив от 48.03 % . За съжаление изключително модерното активиране в пространството с участието на

активиран гликозиден донор под формата на тиопиримидилно производно и допълнителна активация с Люисова киселина в нашия случай дадоха незадоволителен резултат и получихме крайния продукт с добив 9.0 %.

3. Изследване кинетиката на инхибиране и тип инхибиране на ЛГ от соя 2 с участие на природни и синтетични инхибитори

ЛГ има важно значение за биологичните процеси в организма, вземайки участие във възпалителните процеси. Инхибирането на ЛГ, катализиращи левкотриеновата синтеза, потиска левкоцитна активация и това води до намаляване увреждането на тъканите.

Предходни изследвания върху ензима по отношение на субстратно и продуктно инхибиране показват, че инхибиране се наблюдава само върху изолиран от соя ензим. Върху ензим от микробиален източник инхибиране не се наблюдава.

Поради всичко изброено по – горе изследвахме влиянието на условията на средата върху синтезата на нови инхибитори за ЛГ от соя.

Проведени бяха изследвания върху кинетиката на инхибиране, изчислени бяха инхибиторните константи и типът на инхибиране за природни (рибавирин и галантамин) и синтетични (2,3,5 – триацетил – 1 – β – рибофуранозил – тиокарбамид) инхибитори на ЛГ от соя 2.

Ензимното инхибиране може да бъде два типа: пълно или частично в зависимост от това дали зависимостта реципрочна скорост – концентрация на инхибитора е права линия или хипербола.

Разработени са различни графични методи за анализ на пълните инхибитори, които понижават скоростта на ензимната реакция до нула, когато са в излишък.

От друга страна, има аналитични методи за изследване на действието на частичните инхибитори, които свързващи се с ензима водят до променен, но все още функциониращ ензим-субстрат-инхибиторен (ЕСИ) комплекс, от който се отделя по-нисък процент от продукта.

Кинетичните анализи на ензимното инхибиране формират важна и основна част от изследванията върху ензимите.

Ензимния инхибитор се класифицира като пълен, частичен или линеен и хиперболичен, в зависимост от премащабирането на основните двойно - реципрочни графики.

Напълно или пълно инхибиране се наблюдава при образуване на неактивния ензим-инхибиторен (ЕИ) комплекс или непродуктивният ензим-инхибитор-субстратен комплекс (ЕИС) или и при двата; увеличаването концентрацията на пълния инхибитор може да намали активността на ензима до нула.

От друга страна, свързването на частичния инхибитор с ензима не води до образуването на неактивен комплекс, а до комплекса ЕСИ, от който се отделя продукт с по-нисък добив.

Въпреки че, някои графични методи , като координатите на Диксън и Корниш - Боуден, се използват за кинетичен анализ на инхибиторното действие, тези методи са приложими само при пълно или линейно инхибиране, но не и при частичното.

В някои случаи частичното инхибиране се пренебрегва, защото концентрацията на инхибитора е много ниска. Частично инхибиране обикновено се анализира от преоразмеряването на първичните двойно-реципрочни координати.

Въпреки това, при различни трансформации на уравнението на Михаелис - Ментен, двойно - реципрочните графики дават лоши оценки за кинетичните константи: факт е, че тази функция, от двойно-реципрочната координата дава възможност да се отделят точките за ниско субстратните концентрации, така че визуално точките за високо субстратните концентрации да се обединяват в една точка.

Стойностите на K_i и K_i' за ензимния инхибитор и константите на степента на реакцията на ензим-субстрат (ЕС) и ЕИС комплекси могат лесно да се изчислят въз основа на пресечната точка с абсцисната или ординатната ос. Обикновено преобразуването на кривите на инхибиране без вторична графика води до по-малко грешки в изчисленията.

За природните инхибитори на ЛГ от соя установихме експериментално, че типът на инхибиране е смесен. За синтетичният аналог на рибавирин определихме, че инхибирането също е от смесен тип. Стойностите на константите на инхибиране (K_i) на природните (рибавирин и галантамин) и синтетичен (2,3,5 – триацетил – 1 – β – рибофуранозил – тиокарбамид) инхибитори са посочени в табл. 4.

Много добро инхибиторно действие оказва новосинтезираната молекула на 2,3,5 – триацетил – 1 – β – рибофуранозил – тиокарбамид, пет пъти по-добро, което се вижда от получените стойности на K_i .

4. Изчисляване на K_i и определяне типа на инхибиране за инхибитори на изоформа 2 на антистазин

Изследвана бе кинетиката на ензимно - катализирани реакции на моделен ензим - трипсин в присъствие на D-Phe-Pro-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂ ; D-Arg-Gly-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂; Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂; Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂. От реакцията на сериновата протеиназа (фактор Ха) с амидния аналог на изоформа 2 на антистазин (Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂ и Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂) определихме типа на инхибиране, който е от конкурентно-неконкурентен тип.

При сравняването на константите на двата инхибитора ясно се вижда, че Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂ има по-голяма инхибиторна активност в сравнение с амидния аналог на природната изоформа 2 на антистазина Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂.

Намерените стойности за константата на Михаелис-Ментен (K_m), с участието на изоформа 3 на антистазин, се променят незначително, като по-високи са тези за инхибираните реакции в сравнение с неинхибираната реакция. Стойностите за максималната скорост (V_{max}) намаляват при реакциите на инхибиране, като най-слабо е намаляването при природната изоформа 3. Полученият резултат е в съгласие с фактът, че синтетичните аналози на изоформа 3 комбинират два активни фрагмента, а именно изоформа 3 и трипептидите Tyr-Ile-Arg и Phe-Ile-Arg.

От изследваните синтетични амидни аналози на изоформа 3 на антистазин най-висока инхибиторна активност проявява Phe-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-NH₂, следван от Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-NH₂. Най-ниска инхибиторната активност сред трите изследвани съединения проявява Arg-Pro-Lys-Arg-NH₂.

Всички намерени константи на инхибиране са от един и същи порядък, което показва, че нито един от използваните инхибитори не показва селективност по отношение на изследваните три сериови протеинази от каскадата на кръвната коагулация. Все пак разликата в получените стойностите на K_i за трите протеинази от каскадата и тази по отношение на моделния ензим са значителни, което е доказателство за селективността по отношение на сериовите протеинази от каскадата, а не към всички сериови протеинази.

5. *Сравнение между типа на инхибиране за инхибитори на ЛГ и трипсин като съставна част на мултиензимните системи.*

От проведените изследвания за кинетиката на инхибиране на ЛГ и трипсин, като част от мултиензимните системи в организма ясно се вижда, че кинетиката на инхибиране представлява сложен процес. В организма процесите протичат по механизми, далеч по – различни от добре известните и дефинирани типове инхибиране за ензимно – катализираните реакции в присъствие на инхибитор. За изследваната кинетика на инхибиране на ЛГ от соя в присъствие на различни аналози на рибавирин се наблюдава смесен тип на инхибиране, а за моделния трипсин проличава ясен процес на конкурентно – неконкурентно инхибиране, което доказва огромното значение за изследване ролята и приноса на всеки един ензим в състава на мултиензимните системи.

6. *Имобилизация на ЛГ от *Penicillium* sp. и соево брашно върху различни по природа носители*

Извършена беше имобилизация на ЛГ от М 3 върху два носител, съполимери на акрилонитрил, акриламид (РААН, РААН – TiO_2) и беше направено сравнение между активността на свободен и имобилизиран ензим.

За относителната активност на имобилизирания спрямо свободен ензим върху РААН - TiO_2 получихме: с лиолова киселина - 16.9 %, с участие на лиоленова киселина - 1.38 U/mg. Активността на ензима спрямо използвания носител и такъв от РААН с лиоленова киселина изчислихме, че е 6.5 %.

Имобилизирахме ЛГ от соя 2 върху два различни носителя с дендримерна природа (MTES/CAP/PAMAM и TMOS/CAB/PAMAM). По-успешна беше

имобилизацията на ЛГ без предварителна активация на матрицата, което според нас се дължи на огромното разнообразие на функционални групи в структурата на дендримерните носители.

По – успешна също така се оказва имобилизацията на ЛГ върху дендримерен носител в сравнение с матрица от PAAN и PAAN – TiO₂. След провеждане на имобилизацията константата на Михаелис се повишава около десет пъти, което говори за по – ниско сродство на ензима от соя 2, в сравнение със свободната ЛГ. Скоростта за протичане на реакцията е $0.511 \cdot 10^{-6}$ M/mg.min.

Стойностите на кинетичните параметри за ЛГ от източник М 2, сравнени с тези при ЛГ от соя 2 след имобилизация са приблизително аналогични.

В следствие на имобилизацията рН_{опт} на ензима леко се отмества до рН 8.5. Т_{опт} на ензима се увеличава с порядък 0.2°C и достига до стойност 37 °C.

Значителна промяна в активиращата енергия на ЛГ от соя се забелязва след имобилизацията на ензима върху дендримерния носител: от 6.8159 kJ/mol за свободна ЛГ достига до 0.1067 kJ/mol, т.е. шест пъти понижение на Е_a, което доказва благоприятното действие на носителя върху прескачането на енергийната бариера за протичане на ЛГ от соя 2 катализираната реакция.

Тъй като ЛГ намира приложение за процесите на трансформация на различни молекули, опасни за метаболизма на човека в това число например афлатоксини, имобилизираната ЛГ от микробиален произход дава възможност за бъдещата му употреба за определяне на афлатоксини в храни, определяне на арахидонова киселина, като клиничен показател, производство на простагландини.

Изследвана беше кинетиката за ЛГ реакция за имобилизирания върху TMOS/CAB/PAMAM ензим. Установена бе, че афинитетът на ензима към субстрата, който се определя от стойността на К_m, значително се увеличава, което от своя страна доказва положителния ефект от структурата на матрицата върху ензима след имобилизация. Ензимно катализираната реакция протича с по – висока скорост, стойността на V_{max} се увеличава, в следствие от процеса на имобилизация на ензима.

ИЗВОДИ

I. Изолирана е ЛГ от два различни по природа източници: растителен (соя) и микробиален (*Penicillium sp.*).

1. Изследвана е ЛГ активност на ЛГ от микробиален източник – 2.15 U/mg и за ЛГ от соя – 5.3499 U/mg. Определени са pH_{opt} (8.0), T_{opt} (35 °C) и E_a (6.82 kJ/mol) за свободна ЛГ от соя.
2. След изследване на кинетиката на ЛГ от соя са изчислени стойностите на кинетичните параметри ($K_m=0.472 \cdot 10^{-6}$ M, $V_{max}=4.716 \cdot 10^{-6}$ M/mg.min), съответно за микробиална ЛГ константата на Михаелис и V_{max} са: $K_m=0.130 \cdot 10^{-6}$ M, $V_{max}=1.5152 \cdot 10^{-6}$ M/mg.min.

II. Синтезирани са нови аналози на рибавирин, като е изследвана кинетиката на инхибиране в присъствие на природни и синтетични потенциални инхибитори на ЛГ от соя.

1. Изследван е ефектът от влиянието на условията на средата за синтез на нови инхибитори за ЛГ от соя с различен брой еквиваленти на донор, акцептор и люисова киселина, участващи в синтетичната реакция.
2. Изследвана е кинетиката на инхибиране, като са изчислени инхибиторните константи и е определен типът на инхибиране. В присъствие на рибавирин, галантамин и 2,3,5 – триацетил – 1 – β – рибофуранозил – тиокарбамид се наблюдава смесен тип на инхибиране.

III. Извършена е имобилизация на ЛГ от микробиален и растителен източник върху матрици на основата на PAAN и PAMAM.

1. Извършена е имобилизация на микробиална ЛГ от соя върху два полимерни носителя на основата на полиакрилонитрил акриламид (PAAN и PAAN – TiO_2) и е сравнена активността на свободна ЛГ от соя 1 (0.237 U/mg) и имобилизирана ЛГ МЗ (за PAAN – 6.5 %; за PAAN – TiO_2 – 1.38 %) в присъствие на субстрат линолова киселина.
2. Извършена е имобилизация на ЛГ от соя върху два различни носителя с дендримерна природа. Поради огромното разнообразие на функционални групи в структурата на дендримерните носители, по – успешна е имобилизацията на ЛГ без предварителна активация на матрицата (TMOS/CAB/PAMAM).

Определени са активността (26.0%), $pH_{\text{опт}}$ (8.5), $T_{\text{опт}}$ (37 °C) и E_a (0.1067 kJ/mol) за имобилизирана ЛГ от соя върху дендримерен носител TMOS/CAB/ПАМАМ. Понижението в стойността на E_a (за сравнение, $E_{a\text{своб. енз.}}=6,82$ KJ/mol) доказва благоприятното влияние на матрицата върху молекулата на ензима. По отношение на кинетиката на имобилизираната ЛГ от соя изчислихме стойностите на кинетичните параметри ($K_m=4.599 \cdot 10^{-6}$ M, $V_{\text{max}}=0.511 \cdot 10^{-6}$ M/mg.min).

IV. Изследвана е кинетиката на ензимно катализираните реакции на моделен ензим трипсин и ензими от кръвната коагулационна каскада (фактор Ха, тромбин и плазмин) в присъствие на аналози на изоформа 2 и 3 на антистазин.

1. Изследвана е кинетиката на ензимно катализираните реакции на моделен ензим - трипсин в присъствие на D-Phe-Pro-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂; D-Arg-Gly-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂; Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂; Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂. Изследвана е кинетиката на ензимно катализираните реакции на серинова протеиназа от каскадата на кръвната коагулация - фактор Ха с амидния аналог на изоформа 2 на антистазин (Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂).

2. Изследван е типа на инхибиране (неконкурентен тип) на амидните аналози на изоформа 2 на антистазина Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂ и Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂ спрямо моделния ензим трипсин.

3. Изчислени са стойностите на константата на инхибиране (K_i) на амидните аналози на изоформа 2 на антистазина Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂ ($14.3 \cdot 10^{-4}$ M) и Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂ ($18.23 \cdot 10^{-4}$ M). При сравняването на константите на двата инхибитора ясно се вижда, че Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂ има по-голяма инхибиторна активност в сравнение с амидния аналог на природната изоформа 2 на антистазина Arg-Pro-Lys-Arg-Lys-NH₂. Изчислени са стойностите за константата на инхибиране за трите синтетични инхибитора. Най-висока инхибиторна активност проявява Phe-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-NH₂ (в присъствие на тромбин, $K_i=1.11 \cdot 10^{-4}$ M), а най-ниска - амидът на природната изоформа 3, Arg-Pro-Lys-Arg-NH₂ (в присъствие на тромбин, $K_i=10.05 \cdot 10^{-4}$ M).

4. От направените от нас изследвания върху кинетиката на ензимно катализираните реакции с трипсин, тромбин, плазмин и фактор X в отсъствие и присъствие на аналози на изоформа 3 на антистазин (Tyr-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-NH₂, Phe-Ile-Arg-Pro-Lys-Arg-NH₂ и Arg-Pro-Lys-Arg-NH₂) е установен неконкурентен тип

инхибиране. Интересен е фактът, че природния антистазин е конкурентен инхибитор, неговите С-крайни изоформи под формата на свободни киселини проявяват псевдоконкурентен тип инхибиране, а амидните аналози неконкурентен тип инхибиране.

ПРИНОСИ

1. Полимерният носител (РААН – TiO_2) осигурява по-голяма повърхност за залавяне на аминокиселинните остатъци от ензимната молекула със съответния субстрат, което се наблюдава като цяло при наночастиците. При последните наличната повърхност е значително по-голяма. Стабилността на имобилизираната ЛГ от соя значително се повишава, което дава основание за многократна употреба на ензима и стабилност на сигнала при измерванията.
2. Имобилизираната ЛГ върху РААН носител, като примерна моделна система, би могла да намери приложение за измерване съдържанието на афлатоксини в храни.
3. Имобилизираната ЛГ от соя върху дендримерния носител демонстрира висока относителна активност, поради равномерното разпределение на функционални групи на матрицата, което благоприятства потискането на мицелните струпвания около активния център на ензима.
4. Имобилизираната ЛГ върху РАМАМ матрица успешно може да бъде използвана за получаването на редица лекарствени препарати, природата на носителя проявява ниска токсичност в човешкия организъм, което придава значителна тежест на проведените изследвания.
5. Успешна е синтезата на нов инхибитор на ЛГ от соя чрез директната активация, в присъствие на Люисова киселина. Синтетичният аналог на рибавирин (2,3,5 – триацетил – 1 – β – рибофуранозил – тиокарбамид) е нова възможност за контрол на ЛГ активност, като участник в мултиензимните системи, формиращи възпалителните процеси в човешкото тяло.
6. Аналозите на изоформа 3 на антистазин, сравнени с тези на изоформа 2, показват по-високи инхибиторни свойства върху моделен трипсин и ензимите от кръвната коагулационна каскада. Изключение е Arg-Pro-Lys-Arg-NH₂ аналогът на изоформа 3, който демонстрира най-ниска инхибиторна активност.

7. Получените стойности на константата на Михаелис в присъствие на синтетични аналози на изоформа 2 и 3 на антистазин се изменят незначително, т. е. селективност спрямо фактор Ха, тромбин и плазмин не се наблюдава. Наблюдава се, обаче селективност на амидните аналози към ензимите от кръвната коагулационна каскада, в сравнение с всички серинови протеинази, което придава тежест на експериментално получените резултати.

Резултатите представени в настоящата дисертация са обобщени в следните публикации в международни и национални специализирани списания:

1. Dancho Danalev, Desislava Marinkova, **Raya Raykova**, Lyubov Yotova, Iren Tsibranska, Konstantin Savov, Galina Obretenova (2014) “Kinetic investigation and anticoagulant activity of amide analogues of isoform 2 and 3 of antistasin”, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 20 (2), 195-200 (**i.f. 1.28**).

2. Danalev, D. L.; **Raykova, R. N.**; Marinkova, D. A.; Yotova, L. K.; Bayryamov, S. G.; Hristova, B.H.; Stoyanova, V. S. (2012) “Synthesis of new hybrid cell penetrating peptides-medical drugs molecules”, *Bulgarian Chemical Communications, Proceeding of 6-th Bulgarian Peptide Symposium*, 44 (3), 238-241 (**i.f. 0.32**).

Научни публикации отпечатани в пълен текст в сборници на научни конференции:

1.R. Raykova, D. Danalev, D. Marinkova, L. Yotova, S. Tchaoushev, N. Mahmoud (2012) “Kinetic investigations on amide analogues of isoform 3 of antistasin”, *Peptides, Proceedings of the 32-nd European Peptide Symposium*, 454-455.

2.R. Raykova, D. Danalev, L. Yotova, N. Lubin-Germain, J. Uziel, N. Mahmoud, B. Hristova (2012) “Ribavirin-cell penetrating peptides hybrid molecules, a promising alternative as inhibitors of multienzyme systems”, *Peptides, Proceedings of the 32-nd European Peptide Symposium*, 468-469.

УЧАСТИЯ В МЕЖДУНАРОДНИ НАУЧНИ ФОРУМИ

1. 33^{-и} Европейски Пептиден Симпозиум, 31.08-05.09.2014 г., София, България

- Spaska Yaneva, Liliya Ilieva, Desislava Marinkova, **Raya Raykova**, Lyubomir Vezencov, Lyubov Yotova, Dancho Danalev „Study of inhibition activity of peptide containing galantamine derivatives towards tyrosinase” (*постер*).

2. 32-ри Европейски Пептиден симпозиум, 01-07.09.2012 г., Атина, Гърция

- **R. Raykova**, D. Danalev, L. Yotova, N. Lubin-Germain, J. Uziel, N. Mahmoud, B. Hristova, „Ribavirin-cell penetrating peptides hybrid molecules, a promising alternative as inhibitors of multienzyme systems” (*постер*).

- **R. Raykova**, D. Danalev, D. Marinkova, L. Yotova, S. Tchaoushev, N. Mahmoud, „Kinetic investigations on amide analogues of isoform 3 of antistasin” (*постер*).

УЧАСТИЯ В НАЦИОНАЛНИ НАУЧНИ ФОРУМИ С МЕЖДУНАРОДНО УЧАСТИЕ

1. 1-ва Национална конференция по Биотехнологии, София, 17-18.10.2014 г.

- **Raya Raykova**, Lachezar Manovski, Dessislava Marinkova, Lyubov Yotova, Dancho Danalev, „Investigations on soybean lipoxygenase” (*доклад*).

2. XI Младежка научна постерна сесия на ХТМУ, 22.05.2014 г.

- **Raykova, L. Manovski, D. Danalev, D. Marinkova, L. Yotova**, „Investigations on new synthetic inhibitors of soybean lipoxygenase” (*постер*).

- **R. Raykova, S. Yaneva, L. Yotova**, „Immobilization of soybean lipoxygenase onto new hybride carriers” (*постер*).

3. Юбилейна научна постерна сесия с международно участие, 04.06 – 05. 06. 2013 г., 60 години ХТМУ

-**R. Raykova, D. Danalev, L. Yotova, B. Hristova**, „Synthesis of analogs of ribavirin with potential inhibitory effect in multienzyme systems” (*постер*).

4.X Юбилейна научна постерна сесия, 17.05.2013 г.

-**D. Marinkova, R. Raykova, D. Danalev, L. Yotova, K. Savov**, „Kinetic investigations of the inhibition of serine proteinases by amide analogues of antistasin”(*постер*).

-**R. Raykova, L. Yotova, D. Danalev, L. Manovski**, „Kinetic investigations on lipoxygenase isolated from soybean and Penicillium species” (*постер*).

5. IX научна постерна сесия, 18.05.2012 г.

- **D. Danalev, R. Raykova, L. Yotova, D. Marinkova, S. Tchaoushev**, „Kinetic investigation on inhibition of multienzyme system from blood coagulation cascade by amide analogues of isoform 3 of antistasin” (*постер*).

НАЦИОНАЛНИ И МЕЖДУНАРОДНИ СЕМИНАРИ:

1. Лятно училище за “Иновационен и технологичен мениджмънт в Медицинската и Фармацевтична Биотехнология” (2013) *Болоня, Италия*.

2. Семинар, „Основни принципи на Високоэффективна течна хроматография (HPLC) иновации при семейството на колони Kinetex® с размер на частиците 1.3 μm и 5 μm -Kinetex” (2013) *гр. София*.

3. (FEBS) Sofia School of Protein Science: „Structure and dynamics of biological macromolecules” (09-14.09.2012) *БАН, гр.София*.

4. Курс по “Инструментални методи в неорганичната химия” (04.06 - 08.06.2012) *Прага, Чехия*.

5. Семинар по “Зелени биотехнологии-здраве и интелектуална собственост” (27.03–28.03.2012) Съвместен геномен център, СУ “Св. Климент Охридски”, гр. София.

ПРОЕКТИ:

1. „Изследване и приложение на β – амилаза“ (2014-2015) НИС при ХТМУ.

2.Фундаментално и приложно обучение на докторанти, постдокторанти, специализанти и млади учени в интердисциплинарни биологични направления и иновационни биотехнологии - BG051PO001-3.3.06-0059 (2013-2014) (обща сума на проекта 764 724.12 лв).

3. „Изследване и приложение в клиничната практика на мултиензимни системи с участие на оксидоредуктази, имобилизирани върху нови хибридни матрици“ (2013-2014) НИС при ХТМУ.

4. „Кинетични изследвания върху липоксигеназа, изолирана от соя и *Penicillium* sp.“ (2012-2013) НИС при ХТМУ.

5. Гликофуранозилпептиди като нови потенциални антипаразитни лекарства, договор ДОО2 – 296 с фонд Научни изследвания (2010-2011). (обща сума на проекта 60 000 лв.).