

МОДИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПРИ СВЕРХВЫСОКИХ РАЗВЕДЕНИЯХ СУБСТРАТА

© 2023 г. Г.Ю. Ломакина*,#, Н.Н. Угарова*

*Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
Ленинские горы, 1/3, Москва, 119991, Россия

#E-mail: nugarova@gmail.com

Поступила в редакцию 25.07.2022 г.

После доработки 03.10.2022 г.

Принята к публикации 19.10.2022 г.

Исследовано влияние ряда сверхвысоких разведений люциферина (в диапазоне разведений от 10^{10} до 10^{102} раз) на люциферин-люциферазную реакцию светлячков. Концентрацию субстрата люциферина варьировали от 0.0025 до 2.5 нМ, концентрация АТФ оставалась постоянной. Оценка интенсивности биолюминесценции после добавления в биолюминесцентную систему люциферина или воды в сверхвысоких разведениях показала наличие существенных разнонаправленных отличий. Количество сверхвысоких разведений из исследуемого ряда, при добавлении которых обнаруживались достоверные отличия, резко увеличивалось при снижении концентрации субстрата до 0.0025 нМ. Аналогичное сравнение влияния сверхвысоких разведений неспецифического контроля имидазола и сверхвысоких разведений воды на интенсивность свечения не выявило различий. Можно сделать вывод, что присутствие сверхвысоких разведений люциферина специфически ингибирует люциферин-люциферазную реакцию.

Ключевые слова: супрамолекулярные взаимодействия, биолюминесценция, фермент-субстратные взаимодействия, сверхвысокие разведения, люциферин-люциферазная реакция светлячков.

DOI: 10.31857/S0006302923020035, EDN: BZYXIY

Ферменты являются природными биологическими катализаторами, необходимыми для обеспечения многих процессов жизнедеятельности. Благодаря их каталитической активности специфические субстраты способны связываться с активным центром ферментов и образовывать фермент-субстратный комплекс. В дальнейшем субстрат подвергается ряду модификаций с превращением в продукт реакции, который обладает важными биологическими функциями. Варьируя концентрацию субстрата, можно менять скорость фермент-субстратных взаимодействий, которые обеспечивают работу многих биологических систем, в том числе и человеческого организма. Помимо этого, фермент-субстратные взаимодействия принимают участие в патогенезе и являются мишенями при лечении многих заболеваний [1]. Ферментативные реакции широко используются в медицине, применяются в биоаналитических системах, геной инженерии, при исследовании активных центров ферментов [2–6], а так-

же в текстильной и бумажной промышленности [7, 8]. В связи с этим поиск новых способов оптимизации фермент-субстратных взаимодействий всегда будет являться приоритетной задачей.

Вода в стационарном состоянии представляет собой открытую неравновесную систему, способную депонировать дополнительную свободную энергию [9]. К настоящему времени показано, что внешнее воздействие (оптическое, плазменное, механическое и т.п.) способно сильно изменить макроскопические свойства водных растворов [10–18]. Частным случаем образования таких систем является сочетание внешнего воздействия и последовательного многократного разбавления исходного вещества. Сверхвысокие разведения (СВР) веществ, полученные по этой технологии, имеют ряд особенностей, характерных для нелинейной системы. Например, относительно недавно применение современных методов исследований позволило установить, что полученные в ходе этого процесса разведения приобретают специфические долговечные физико-химические и биологические свойства, отличные как от свойств исходного вещества, так и от свойств растворителя (воды) [12, 19, 20]. Было показано, что образ-

Сокращения: СВР — сверхвысокие разведения, RLU — относительные световые единицы, LOD — предел качественного обнаружения, LOQ — предел количественного обнаружения.

цы, полученные в результате последовательного разведения, могут модифицировать функциональную активность молекул исходного вещества [21–23]. Все больший интерес вызывают исследования СВР в качестве модификаторов межмолекулярных взаимодействий [24–26], в связи с чем изучение влияния СВР на ферментативные реакции представляется весьма актуальным вопросом.

Физико-химические исследования СВР показали, что в процессе последовательного разведения с интенсивным встряхиванием на каждом этапе, снижение концентрации исходного вещества происходит нелинейно, что противоречит теоретически ожидаемому [27]. При встряхивании, сопровождающем каждую стадию разбавления, образуются нанопузырьки, способные адсорбировать на своей поверхности молекулы исходного вещества [28, 29]. Такие нанопузырьки преимущественно переносятся в следующее разведение за счет эффекта флотации [11, 27–31], что, в свою очередь, может привести к возможному присутствию молекул исходного вещества в СВР. В то же время есть вероятность, что спонтанно образующиеся наноассоциаты или кластеры являются «носителем» той активности, которая определяет особые физико-химические и биологические свойства СВР [19, 32]. Такие наноассоциаты могут воздействовать на клеточные мишени — ферменты, рецепторы, ионные каналы и пр., влияя на их физические, химические и биологические свойства [24, 33–37].

В настоящем исследовании мы проверяли гипотезу о том, может ли присутствие СВР изменить ход взаимодействия фермента с субстратом. В качестве исследовательской модели использовали высокочувствительный люциферин-люциферазный биолюминесцентный анализ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты. Люциферин (ООО «Люмтек», Россия) реконструировали в фосфатно-солевом буфере (0.15 M NaCl + 0.01 M Na-фосфатный буфер, pH 7.4). Далее аликвоту исходного раствора разбавляли в 40 раз в 0.5 M Na-карбонатном буфере (pH 11.5) и определяли концентрацию люциферина путем измерения оптической плотности при 385 нм на спектрофотометре Lambda 35 (Perkin-Elmer, Великобритания) с использованием молярного коэффициента экстинкции $18200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [38]. pH фосфатно-солевого буфера или раствора люциферина определяли с помощью pH-метра MP220 (Mettler Toledo, Испания) и корректировали по мере необходимости. Реагент для определения люциферина (LH₂-реагент [39]) содержал рекомбинантную люциферазу светлячков *Luciola mingrelica* и АТФ (Sigma-Aldrich, США). В каче-

стве контроля использовали имидазол (Sigma-Aldrich, Германия, чистота 99%) или деионизированную воду. Деионизированная вода высокой чистоты (вода I типа с удельным сопротивлением 18.2 МОм/см при 25°C) была получена с помощью системы очистки воды WaterPro PS Polishing System/UF Life Science Model (Labconco, США).

Приготовление образцов. Растворы люциферина готовили с концентрациями 10 нМ (10^{-8} М), 1 нМ (10^{-9} М) и 0.1 нМ (10^{-10} М) путем последовательного разведения исходного раствора люциферина в деионизированной воде при объемном соотношении 1:99. Для исследования биолюминесценции растворы люциферина разводили в четыре раза реакционной смесью (см. параграф «Регистрация биолюминесценции»). Таким образом, конечные концентрации люциферина в смеси составили 2.5 нМ, 0.25 нМ и 0.025 нМ.

СВР люциферина, имидазола и воды были приготовлены и предоставлены ООО «НПФ МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ» (Москва, Россия). Кратко процедуру приготовления СВР можно описать следующим образом: исходный раствор люциферина с концентрацией 10 нМ смешивали с очищенной водой в соотношении 1:100, после чего энергично встряхивали до получения первого 100-кратного разведения. Для приготовления каждого последующего разведения брали сотую часть объема от предыдущего разведения и добавляли к 99 частям воды. Образец при каждом последующем разведении также подвергали энергичному вертикальному встряхиванию с частотой 4.4 Гц в течение 4.8 с [40, 41]. Данную процедуру выполняли в соответствии с жестким протоколом: в стерильных условиях в ламинарном боксе (класс чистоты D по классификации международного стандарта ISO 14644-1:2015), стерильными автоматическими пипетками и стерильными наконечниками для пипеток. Все образцы были приготовлены в один день одним сотрудником и в одинаковых условиях. Диапазон разведения люциферина, использованного в данной работе, составлял от 10^{10} до 10^{102} , шаг разведения составлял 10^2 . Процедура приготовления СВР имидазола (концентрация исходного раствора 1 нМ) и воды была идентична процедуре приготовления СВР люциферина. Теоретическая концентрация люциферина или имидазола в СВР составляла от 10^{-18} до 10^{-110} М, однако этот расчет не учитывает нелинейное снижение концентрации растворенного вещества, описанное во введении [19, 27–29].

Все растворы готовили в стеклянных флаконах в стерильных условиях, они были защищены от длительного воздействия света и хранились при комнатной температуре. Исследование СВР образцов проводили на следующий день после при-

- 1) $\text{LH}_2 + \text{ATP} + \text{E} \xrightarrow{\text{Mg}^{2+}} \text{E} \cdot \text{LH}_2\text{-AMP} + \text{PP}_i$
- 2) $\text{E} \cdot \text{LH}_2\text{-AMP} + \text{O}_2 \rightarrow \text{E} + \text{LO}^\cdot + \text{CO}_2 + \text{AMP} + \text{light}$

Рис. 1. Реакции, катализируемые люциферазой. Обозначения: LH_2 — люциферин, ATP — аденозинтрифосфат, AMP — аденозинмонофосфат, E — фермент (люцифераза светлячков), PP_i — неорганический пирофосфат, O_2 — кислород, $\text{LO}^\cdot$ — оксилуциферин (продукт реакции), CO_2 — диоксид углерода, light — свет. Схема адаптирована из работы [45].

готовления и заканчивали не позже, чем через 24 ч с момента приготовления. В работе [19] было показано, что активность СВР сохраняется около суток после приготовления образца.

Регистрация биолюминесценции. Биолюминесцентные методы имеют высокую чувствительность, которая превышает фемтомольный уровень [42]. В связи с этим в качестве исследовательской модели была выбрана биолюминесцентная люциферин-люциферазная реакция светлячков, основанная на взаимодействии фермента люциферазы и двух субстратов — люциферина и АТФ (см. рис. 1).

Интенсивность биолюминесценции регистрировали на микропланшетном мультidetекторе Spectramax M5 (Molecular Devices, США) в белых 96-луночных планшетах высокой сорбционной емкости (Agilent Technologies, Германия, No. 6610022400) в диапазоне длин волн от 250 до 850 нм. Внесение разведений люциферина в 96-луночные планшеты проводили в ламинарном шкафу GS (Babcock, Germany). Уровень фонового шума измеряли в образцах, полученных смешиванием 100 мкл деонизированной воды и 100 мкл LH_2 -реагента.

Анализ данных. Статистическая обработка данных была проведена в программе RStudio Version 1.2.1335 (RStudio Inc., США) с использованием пакета R версии 3.6.0. Нормальность распределения оценивали по тесту Шапиро–Уилка, гомогенность дисперсий — по тесту Бартлетта. Для экспериментов с добавлением в систему разных концентраций люциферина сравнение групп проведено с использованием U-критерия Манна–Уитни и t-критерия Стьюдента (приближение Уэлча в случае отсутствия гомогенности дисперсий).

Для оценки результатов измерений образцов, содержащих СВР имидазола, сравнение групп проведено с использованием дисперсионного анализа (при необходимости попарного сравнения групп использовалась поправка Тьюки) или теста Краскела–Уоллиса (при необходимости попарного сравнения групп — тест Данна с поправкой Холма). В случае нормального распределения переменных и отсутствия гомогенности диспер-

сий использовали попарное сравнение групп с помощью t-критерия Стьюдента с поправкой Холма, так как при соблюдении требований к данным, он имеет наибольшую мощность.

Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Ход эксперимента. Для оценки линейности зависимости интенсивности биолюминесценции от концентрации люциферина были проведены четыре независимых исследования с различными концентрациями (0, 0.025, 0.25 и 2.5 нМ). Измерение интенсивности биолюминесценции повторяли четыре раза для каждой концентрации люциферина, а также без него. После этого полученные данные аппроксимировали линейным трендом с указанием трехкратного и десятикратного стандартного отклонения для каждой экспериментальной точки, которые считались пределами качественного и количественного обнаружения соответственно.

Для изучения влияния СВР люциферина, имидазола или воды на люциферин-люциферазную реакцию в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли 50 мкл раствора люциферина одной концентрации. В зависимости от эксперимента конечная концентрация люциферина в образцах составляла 0, 0.025, 0.25 или 2.5 нМ. Затем добавляли 50 мкл СВР люциферина, СВР имидазола или СВР воды (контроль) и перемешивали содержимое лунок при помощи пипетирования. Образцы и контроли располагали рядом друг с другом, уменьшая разницу в температурном градиенте. Далее реакцию инициировали добавлением в каждую лунку 100 мкл LH_2 -реагента. Полученный раствор перемешивали пипетированием, после чего регистрировали биолюминесцентный сигнал в трех временных точках — сразу, через 10 с и через 20 с после перемешивания. При обработке результатов величины биолюминесцентных сигналов по всем трем временным точкам усредняли, среднее значение в дальнейшем считали за одно измерение. Результат после усреднения обладает большей точностью за счет минимизации уровня шумов.

Измерения выполняли на двух планшетах, по два повтора (по две лунки) одного и того же СВР образца на каждом планшете. Таким образом, для каждого разведения было проведено по четыре измерения в каждой временной точке. Измерение биолюминесцентного сигнала выражали в относительных световых единицах (RLU). Отсутствие краевого эффекта планшета и влияния расположения образца на измерения было подтверждено на этапе разработки методики.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Качественная и количественная характеристика зависимости интенсивности биолюминесценции от различных концентраций люциферина. Мы определили предел качественного (LOD) и количественного (LOQ) обнаружения люциферазы. LOD рассчитывали как среднее значения фоновой интенсивности плюс трехкратное стандартное отклонение измерения, а LOQ — как среднее значение фоновой интенсивности плюс десятикратное стандартное отклонение [43, 44]. Таким образом, средняя фоновая интенсивность в исследовании составила 21.08 RLU, LOD — 58.81 RLU и LOQ — 146.86 RLU.

Далее изучали зависимость биолюминесцентного сигнала от концентрации люциферина в реакционной смеси (см. табл. 1).

Линейность и повторяемость измерений интенсивности биолюминесценции в зависимости от концентрации люциферина оценивали путем добавления возрастающих концентраций люциферина (от 0 до 2.5 нМ) к стандартной смеси, содержащей люциферазу и АТФ (см. раздел «Материалы и методы»).

На рис. 2 видно, что зависимость максимальной интенсивности биолюминесценции от концентрации люциферина характеризуется коэффициентом детерминации 99.9%, что подтверждает хорошую линейность применяемого метода.

На рис. 2 показано, что значение биолюминесценции с учетом стандартного отклонения не превышает порогов LOD и LOQ для нашей биолюминесцентной системы. Установлено, что зависимость интенсивности биолюминесценции от концентрации люциферина носит линейный характер. Таким образом, метод биолюминесценции можно использовать как количественный и качественный метод при концентрациях люциферина в диапазоне 0.025–2.5 нМ.

Влияние сверхвысоких разведений люциферина на интенсивность биолюминесценции в люциферин-люциферазной реакции. Сравнение интенсивности биолюминесценции при добавлении контрольных и испытуемых образцов с одинаковой степенью разбавления к системе с концентрацией люциферина 2.5 нМ (рис. 3а) и 0.25 нМ (рис. 3б) показало некоторые разнонаправленные, но существенные различия (рис. 3г). Одно статистически значимое увеличение интенсивности наблюдали при концентрации люциферина 2.5 нМ для степени разведения 10^{54} . В системе с концентрацией 0.25 нМ наблюдали два статистически значимых различия — для степени разведения 10^{28} и 10^{68} , также важно отметить, что в первом случае наблюдалось снижение интенсивности, а во втором случае — увеличение. Однако

Таблица 1. Зависимость интенсивности биолюминесценции от концентрации люциферина

Концентрация люциферина, нМ	Интенсивность люминесценции, RLU
2.5	19008.53 ± 442.37
0.25	1737.26 ± 17.27
0.025	185.46 ± 20.31
0	23.25 ± 14.88

Примечание. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение для восьми измерений, RLU — относительные единицы интенсивности люминесценции.

количество разведений, в которых были обнаружены значительные различия, резко увеличивалось при снижении концентрации субстрата до

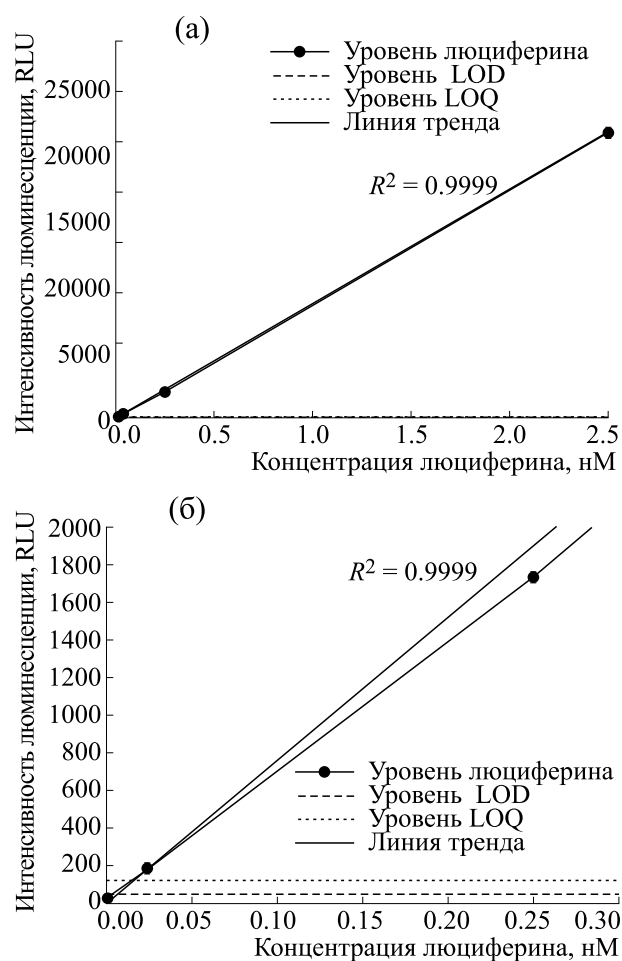


Рис. 2. (а) — Линейная зависимость биолюминесценции от концентрации люциферина. Анализ проводили в присутствии 0, 0.025, 0.25 и 2.5 нМ люциферина. Коэффициент детерминации $R^2 = 0.9999$. Данные выражены в относительных единицах люминесценции (RLU) и представлены в виде среднего значения по четырем измерениям, планки погрешностей соответствуют величине стандартного отклонения. (б) — Увеличенная часть рис. 2а. Предел качественного (LOD) и количественного (LOQ) обнаружения изображены в виде горизонтальных линий.

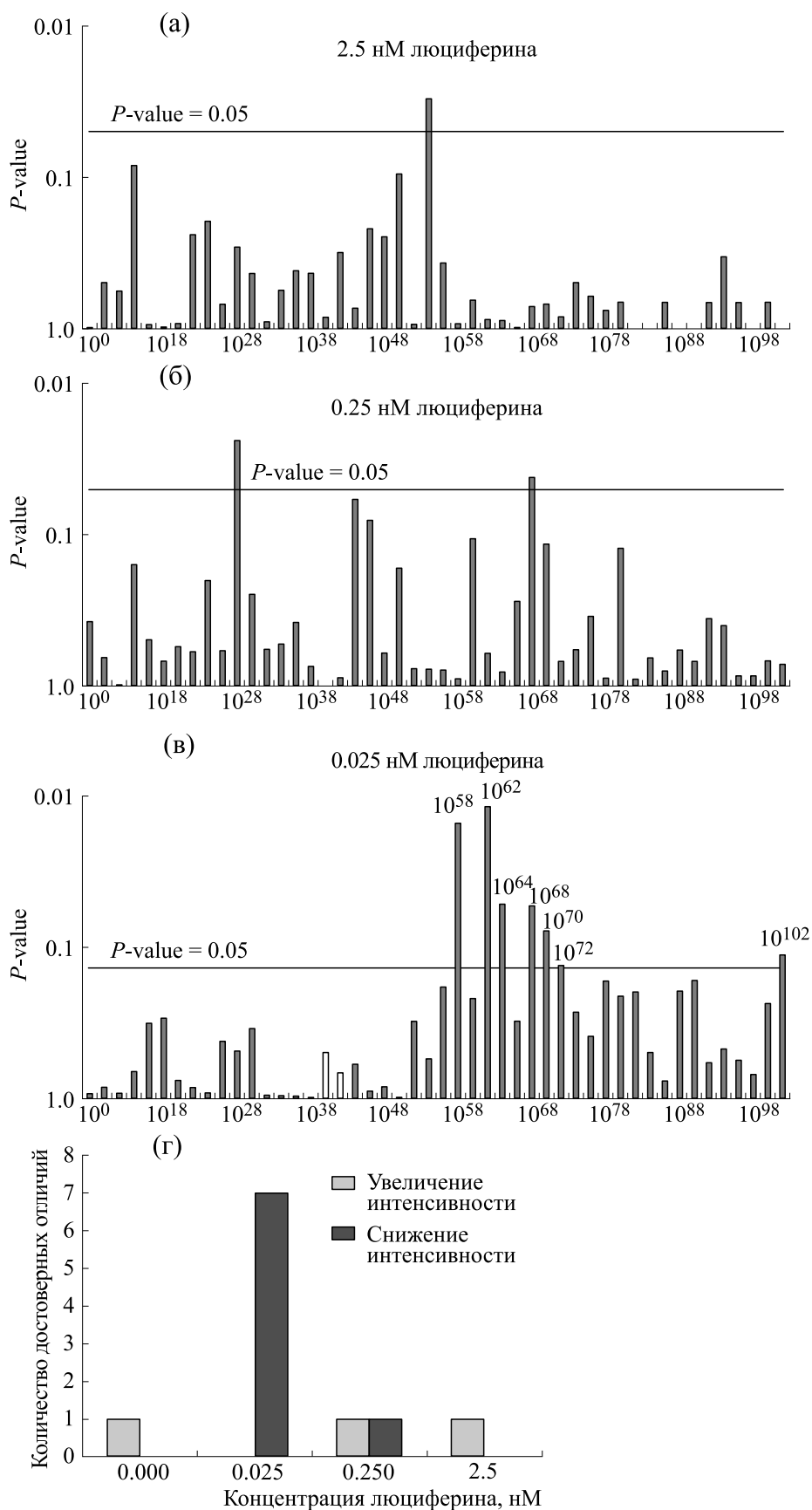


Рис. 3. Начало.

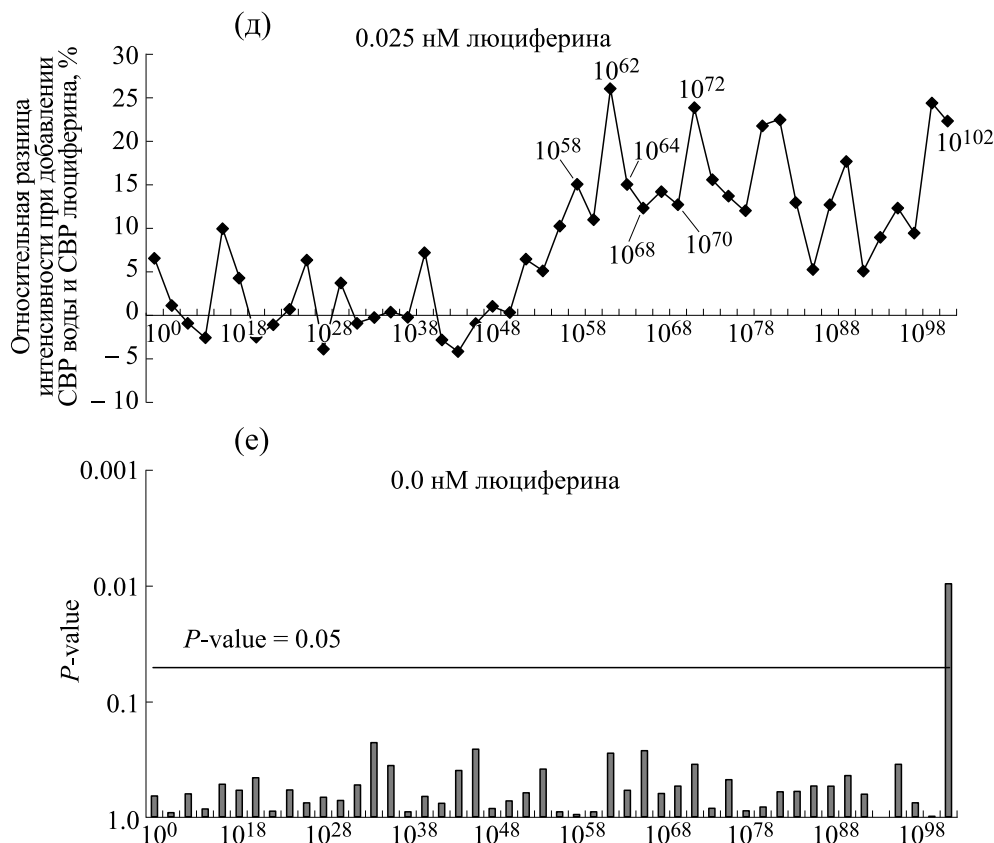


Рис. 3. (а) — Величины p -value для разницы между средней интенсивностью биоломинесценции, зарегистрированной в образцах при добавлении соответствующих СВР люциферина или воды в присутствии 2.5 нМ люциферина. Количество добавленного СВР составляло 50% от объема образца. Все образцы содержали стандартную смесь люциферазы и АТФ. Измерения проводили при комнатной температуре, pH 7.4. По оси абсцисс — степень разбавления. Горизонтальная линия обозначает порог статистики значимого p -value = 0.05. (б) — Величины p -value, полученные при сравнении интенсивности биоломинесценции при добавлении СВР люциферина или воды в присутствии 0.25 нМ люциферина. (в) — Величины p -value, полученные при сравнении интенсивности биоломинесценции при добавлении СВР люциферина или воды в присутствии 0.025 нМ люциферина. (г) — Количество разведений, для которых были обнаружены статистически значимые отличия при сравнении интенсивности биоломинесценции в присутствии СВР люциферина или воды. Измерения проводили при концентрации люциферина в диапазоне от 0 до 2.5 нМ. Результаты основаны на данных, представленных на рис. 3в и 3е. (д) — Процентное отличие между интенсивностями биоломинесценции, зарегистрированной от образцов при добавлении соответствующих СВР люциферина или воды в присутствии 0.025 нМ люциферина. Положительное значение указывает на то, что биоломинесценция, измеренная в присутствии СВР воды, характеризуется более высокой интенсивностью, чем в присутствии СВР люциферина. (е) — Величины p -value, полученные при сравнении интенсивности биоломинесценции при добавлении СВР люциферина или воды в присутствии 0 нМ люциферина.

0.025 нМ (рис. 3в–д) [22, 45]. Это снижение интенсивности происходило в образцах со степенью разбавлению 10^{58} , 10^{62} , 10^{64} , 10^{68} , 10^{70} , 10^{72} и варьировало от 14 до 26%. При снижении концентрации субстрата до 0 нМ количество статистически значимых отличий резко снизилось (рис. 3е).

С данной точки зрения эффект СВР люциферина более выражен при низкой концентрации субстрата (0.025 нМ).

Влияние сверхвысоких разведений имидазола на интенсивность биоломинесценции в люциферин-люциферазной реакции. Имидазол не может оказывать влияние на интенсивность люциферин-

люциферазной реакции, так как люцифераза не имеет активных центров для связывания имидазола [46]. В связи с этим мы решили использовать имидазол в качестве неспецифического контроля. Было решено изучить влияние СВР имидазола на интенсивность биоломинесценции в системе с концентрацией люциферина 0.025 нМ, так как максимальное количество статистически значимых односторонних отличий интенсивности биоломинесценции в присутствии СВР люциферина по сравнению с СВР воды было получено для этой концентрации люциферина. В предыдущем разделе было показано, что СВР люциферина, в отличие от СВР воды, снижают биоломинесценцию в присутствии 0.025 нМ люциферина.

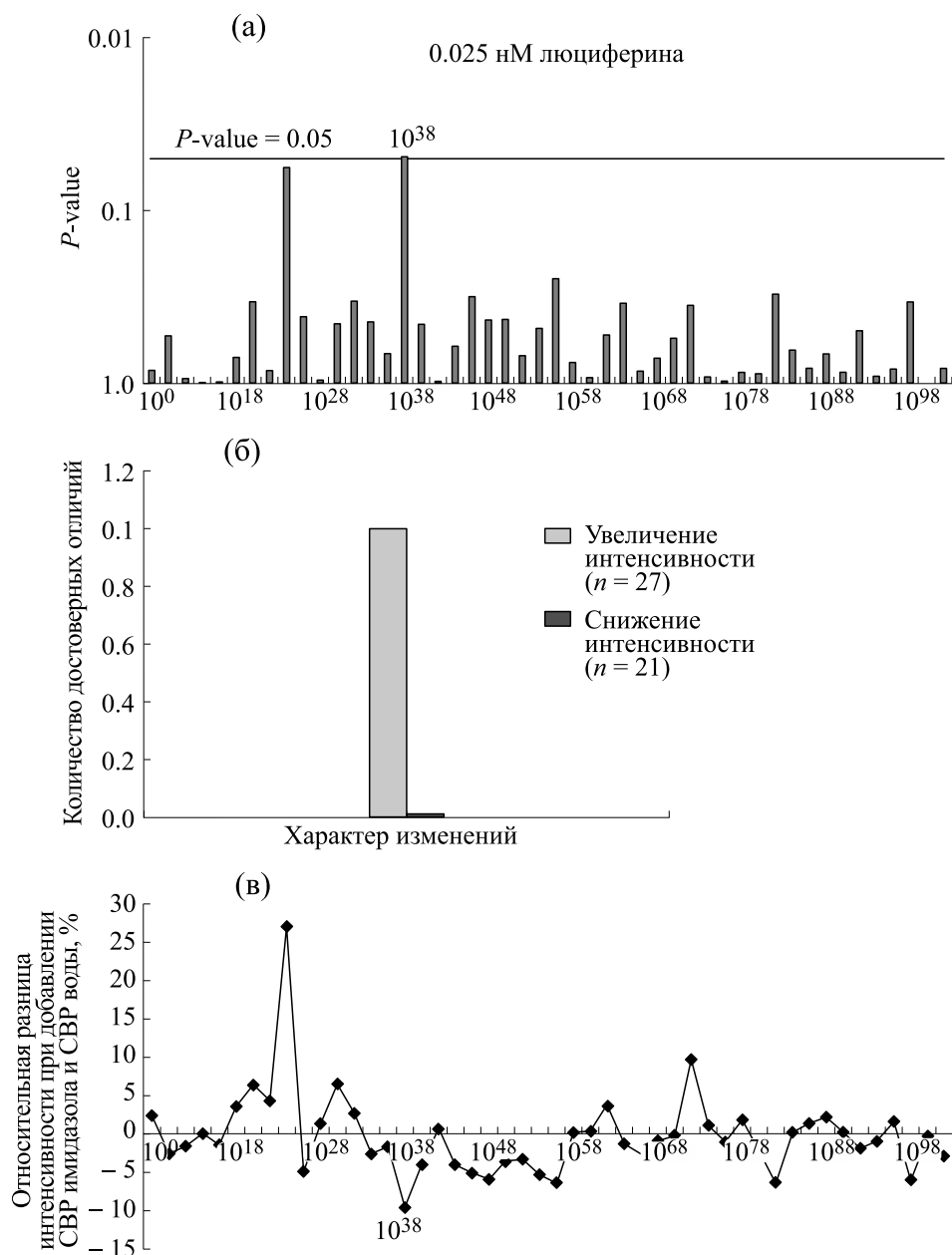


Рис. 4. (а) — Величины p -value, полученные для разницы между средними значениями биолуминесценции, детектированной от образцов с добавлением СВР имидазола или СВР воды в присутствии 0.025 нМ люциферина. Количество добавленного СВР составляло 50% от объема образца. Все образцы содержали стандартную смесь люциферазы и АТФ. Измерения проводили при комнатной температуре, рН 7.4. По оси абсцисс — степень разбавления. Горизонтальная линия обозначает порог статистически значимого p -value = 0.05. (б) — Количество разведений (n), для которых обнаружены статистически значимые различия при сравнении интенсивности биолуминесценции в присутствии СВР имидазола или СВР воды. Измерения проводили в присутствии люциферина с концентрацией 0.025 нМ. Результаты основаны на данных, представленных на рис. 4а и 4в. (в) — Процентное отличие между интенсивностями биолуминесценции, зарегистрированной от образцов при добавлении соответствующих СВР имидазола или воды в присутствии 0.025 нМ люциферина. Положительное значение указывает на то, что биолуминесценция, измеренная в присутствии СВР воды, характеризуется более высокой интенсивностью, чем в присутствии СВР имидазола.

Нами были зарегистрированы разнонаправленные изменения интенсивности биолуминесценции (рис. 4б,в) при добавлении СВР имидазола в присутствии люциферина в концентрации

0.025 нМ. В данном случае только одно из изменений, наблюдаемое при внесении разведения в степени разбавления 10^{38} , было статистически значимым и соответствовало увеличению биолу-

минесценции на 9.5% по отношению к СВР воды (контрольный образец) (рис. 4а,в).

Таким образом, СВР имидазола не оказывают выраженного влияния на интенсивность биолюминесценции. Этот результат подтверждает специфическое влияние СВР люциферина на интенсивность биолюминесценции при концентрации люциферина 0.025 нМ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Биолюминесценция в люциферин-люциферазной реакции светлячков имеет самый высокий квантовый выход среди всех биолюминесцентных систем (по данным разных авторов, он варьирует от 0.5 до 1.0 [47]), что позволяет определять сверхнизкие концентрации АТФ вплоть до 10^{-16} М [47]. Однако применение СВР АТФ осложняется тем, что при очень низких концентрациях молекула АТФ неустойчива в водных растворах и склонна к самопроизвольному гидролизу. Это может привести к изменению состава анализируемых СВР и неоднозначности полученных результатов. Использование люциферина в данном случае предпочтительнее, так как люциферин стабилен, нетоксичен, хорошо растворяется в воде, а его концентрация в растворе более контролируема.

На модели люциферин-люциферазной реакции мы протестировали широкий спектр СВР люциферина и показали, что его добавление разнонаправленно модифицирует интенсивность биолюминесценции, по сравнению с добавлением аналогичных СВР воды. Однако внесение одних разведений приводило к усилению люминесценции по сравнению в соответствующим СВР воды, а внесение других, наоборот, угнетало ее по сравнению с соответствующим водным СВР. Данный эффект наблюдался для всех концентраций субстрата. При этом наибольшее количество разведений, для которых были обнаружены достоверные отличия, было в биолюминесцентной системе с концентрацией люциферина 0.025 нМ (количество разведений — 7). Аналогичные исследования с концентрациями люциферина 0.25 нМ и 2.5 нМ показали только два и одно отличие соответственно. Это согласуется с результатами исследований, свидетельствующими о том, что добавление СВР вещества в системы, содержащие более высокие концентрации исходного вещества, приводит к наиболее выраженному эффекту в системе с наименьшим его содержанием [22, 45]. Помимо этого, введение СВР в систему вызывает полимодальные эффекты [48, 49]. Важно отметить, что в биолюминесцентной си-

стеме с концентрацией люциферина 0.025 нМ наблюдаемое ингибирование биолюминесценции находилось в диапазоне от 13 до 26% по сравнению с соответствующими разведениями воды. Таким образом, введение СВР субстрата в систему фермент-субстратных взаимодействий вызвало специфический ингибирующий эффект.

Специфичность действия СВР люциферина на систему, содержащую люциферин, была подтверждена результатами изучения действия на эту же систему ряда СВР неспецифического контроля — имидазола. Их добавление не приводило к изменению интенсивности биолюминесценции по сравнению с добавлением СВР воды.

Как мы отмечали в разделе «Введение», известно, что молекулы исходного вещества могут оставаться в растворе в процессе последовательного разведения [27] и образовывать кластерную структуру, которая способна воздействовать на белковые мишени. Принимая во внимание механизмы реализации эффектов СВР люциферина, описанные в данной работе, можно сделать предположение, что в более низких разведениях люциферина вокруг исходных молекул уже образуются специфические водные кластеры. При увеличении степени разбавления может оказаться, что в центре кластеризации находится не исходная молекула люциферина, а образовавшийся ранее специфический люцифериновый водный кластер. Таким образом, вполне вероятно, что люцифериновые водные кластеры влияют на интенсивность биолюминесценции. Ингибирование биолюминесценции такими кластерами может быть обусловлено несколькими механизмами:

1. Известно, что люцифераза имеет два независимых активных сайта связывания — один для люциферина, а другой — для АТФ [46], также известно, что водные кластеры способны действовать как ферменты, кинетика которых подчиняется уравнению Михаэлиса—Ментен [50]. Однако возможно, что люцифериновые водные кластеры могут выступать в качестве субстрата для люциферазы, встраиваясь в ее активный центр. Вероятно, кластеры могут менять конформацию люциферазы таким образом, что исходный люциферин теряет способность взаимодействовать с ферментом, т. е. могут выступать аналогом субстрата, который ингибирует активный центр люциферазы [51]. Мы предполагаем, что такое взаимодействие люциферина, люциферазы и специфических водных кластеров люциферина можно описать с точки зрения конкурентного фермент-субстратного взаимодействия (рис. 5).

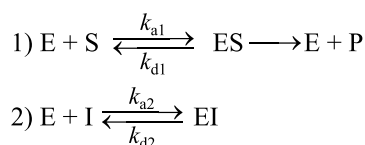


Рис. 5. Конкурентное ингибирование фермент-субстратных взаимодействий. Обозначения: E — фермент, S — субстрат, ES — фермент-субстратный комплекс, P — продукт реакции, I — ингибитор, EI — комплекс «фермент–ингибитор», k_{a1} — константа ассоциации фермент-субстратного комплекса, k_{d1} — константа диссоциации фермент-субстратного комплекса, k_{a2} — константа ассоциации комплекса «фермент–ингибитор», k_{d2} — константа диссоциации комплекса «фермент–ингибитор».

Переменными в данной системе уравнений являются люциферин (S), люцифераза (E) и специфический люцифериновый водный кластер (I). Если концентрация субстрата в системе увеличивается, то число занятых мест связывания на молекулах люциферазы будет больше. Вероятнее всего, константа ассоциации активного центра фермента с люциферином выше, чем со специфическими кластерами, полученными в результате последовательных разведений субстрата. Поэтому чем выше концентрация субстрата, тем быстрее проявятся эффекты, присущие классическому фермент-субстратному взаимодействию, нежели эффекты СВР. Снижение концентрации люциферина напрямую связано с увеличением числа свободных сайтов связывания, которые способны занимать водные кластеры. Следовательно, эффект СВР при более низкой концентрации субстрата будет более выраженным.

2. Другое возможное объяснение заключается в том, что кластеры воды могут действовать как конкурентный антагонист и стерически блокировать доступ субстрата к ферменту, вследствие чего нарушается их адекватное взаимодействие друг с другом [52]. Это также может приводить к снижению интенсивности биолюминесценции. Если предположить, что этот сценарий верен, то эффект контрольных образцов СВР воды или имидазола, вероятно, будет аналогичен действию СВР люциферина, однако мы не наблюдали такого эффекта. Хорошо известно, что комплекс люциферазы с АМФ и оксилуциферином не имеет сайтов связывания имидазола [53]. Таким образом, если СВР имидазола или воды также образуют кластерные структуры, то они не обладают специфичностью к люциферазе.

3. Интересная гипотеза описана в работах [54] и [55]. Авторы этих работ указывают на возможность передачи электромагнитного сигнала от скоплений воды (плотностных неоднородностей)

на подходящую цель, способную принимать данный сигнал. Плотностные неоднородности воды имеют специфические колебательные характеристики, выявляемые методом терагерцовой спектроскопии. Таким образом, электромагнитный сигнал от кластеров может воздействовать на активный центр люциферазы, приводя к ингибированию фермент-субстратного взаимодействия и снижению интенсивности биолюминесценции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из вышеописанного, можно сделать вывод, что люциферин-люциферазная реакция пригодна для качественного и количественного изучения СВР люциферина благодаря ее высокой чувствительности. Нами показано, что СВР люциферина вызывали значительное торможение биолюминесценции по сравнению с соответствующими СВР воды. Механизм реализации такого эффекта может быть опосредован специфическими водными кластерами люциферина, однако эта теория требует дальнейшего детального изучения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность компании ООО «НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ» за помощь в финансировании и реализации настоящей работы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова АААА-А21-121011290089-4 и частично финансирована компанией ООО «НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Работа частично финансирована компанией ООО «НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ», предоставившей СВР-растворы люциферина, имидазола и воды для проведения исследования. ООО «НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ» производит препараты на основе сверхвысоких разведений субстанций.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Ouertani, M. Neifar, R. Ouertani, et al., *Adv. Tissue Eng. Regen Med. Open Access*, **5**, 85 (2019).
2. Z. M. Kaskova, A. S. Tsarkova, and I. V. Yampolsky, *Chem. Soc. Rev.*, **45** (21), 6048 (2016).
3. L. J. Kricka, *Anal. Biochem.*, **175** (1), 14 (1988).
4. A. Pandey, P. Nigam, C. R. Soccol, et al., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **31** (2), 135 (2000).
5. N. N. Ugarova and G. Y. Lomakina, *Moscow University Chem. Bull.*, **75**, 15 (2020).
6. D. V. Smirnova and N. N. Ugarova, *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, **18** (10), 946 (2015).
7. P. M. de Souza and P. de Oliveira Magalhaes, *Brazil. J. Microbiol.*, **41**, 850 (2010).
8. S. Raveendran, B. Parameswaran, S. B. Ummalyma, et al., *Food Technol. Biotechnol.*, **56** (1), 16 (2018).
9. V. I. Bruskov, A. V. Chernikov, et al., *Phys. Wave Phen.*, **28** (2), 103 (2020).
10. I. A. Scherbakov, I. V. Baimler, S. V. Gudkov, et al., *Dokl. Physics*, **65** (8), 9 (2020).
11. S. V. Gudkov, G. A. Lyakhov, V. I. Pustovoy, et al., *Phys. Wave Phen.*, **27** (2), 141 (2019).
12. S. V. Gudkov, N. V. Penkov, I. V. Baimler, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8033 (2020).
13. I. V. Baymler, S. V. Gudkov, R. M. Sarimov, et al., *Dokl. Physics*, **65** (1), 5 (2020).
14. W. Lauterborn, *Appl. Phys. Lett.*, **21** (1), 27 (1972).
15. N. F. Bunkin and F. V. Bunkin, *Laser Physics*, **3** (1), 63 (1993).
16. A. Mai-Prochnow, R. Zhou, T. Zhang, et al., *NPJ Biofilms and Microbiomes*, **7**, 11 (2021).
17. Y. M. Zhao, A. Patange, D. W. Sun, et al., *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **19** (6), 3951 (2020).
18. A. Scherbakov, *Phys. Wave Phen.*, **29** (2), 89 (2021).
19. I. S. Ryzhkina, L. I. Murtazina, Y. V. Kiseleva, et al., *Dokl. Phys. Chem.*, **462** (1), 110 (2015).
20. S. V. Gudkov, I. V. Baimler, O. V. Uvarov, et al., *Front. Physics*, **8**, 622551 (2020).
21. E. Don, O. Farafonova, S. Pokhil, et al., *Sensors*, **16**, 10 (2016).
22. E. S. Don, S. A. Bobrovnik, G. Sherriff, et al., *J. Immunoassay Immunochem.*, **40** (3), 250 (2019).
23. O. Epstein, *Symmetry*, **10** (4), 14 (2018).
24. P. Bellavite, M. Marzotto, D. Oliosio, et al., *Homeopathy*, **103** (1), 22 (2014).
25. P. Muller, E. Ignatz, S. Kiontke, et al., *Chem. Sci.*, **9** (5), 1200 (2017).
26. S. A. Tarasov, E. A. Gorbunov, E. S. Don, et al., *J. Immunol.*, **205** (5), 1345 (2020).
27. P. S. Chikramane, D. Kalita, A. K. Suresh, et al., *Langmuir*, **28** (45), 15864 (2012).
28. N. F. Bunkin, A. V. Shkirin, S. N. Chirikov, et al., *ACS Omega*, **5** (24), 14689 (2020).
29. N. F. Bunkin, A. V. Shkirin, N. V. Penkov, et al., *Phys. Wave Phen.*, **27** (2), 102 (2019).
30. R. Bell, and G. E. Schwartz, *Front. Biosci. (Schol. Ed.)*, **5** (2), 685 (2013).
31. S. V. Gudkov, G. A. Lyakhov, V. I. Pustovoy, et al., *Phys. Wave Phen.*, **29** (2), 108 (2021).
32. G. A. Lyakhov, and I. A. Scherbakov, *Phys. Wave Phen.*, **27** (2), 79 (2019).
33. V. Elia, G. Ausanio, F. Gentile, et al., *Homeopathy*, **103** (1), 44 (2014).
34. E. Freier, S. Wolf, and K. Gerwert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108** (28), 11435 (2011).
35. K. Haider, L. Wickstrom, S. Ramsey, et al., *J. Phys. Chem. B*, **120** (34), 8743 (2016).
36. T. H. Plumridge and R. D. Waigh, *J. Pharm. Pharmacol.*, **54** (9), 1155 (2002).
37. T. M. Raschke, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **16** (2), 152 (2006).
38. R. A. Morton, T. A. Hopkins, and H. H. Seliger, *Biochemistry*, **8** (4), 1598 (1969).
39. M. I. Koksharov and N. N. Ugarova, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **10** (6), 931 (2011).
40. К. А. Сарбашев и Е. О. Химич, Свидетельство №2022665255. TenzometryUnit (программа для ЭВМ), 03.08.2022.
41. V. V. Novikov and E. V. Yablokova, *Field. Appl. Sci.*, **12**, 5185 (2022).
42. K. V. Wood, Available online: <https://world-wide.promega.com/resources/pubhub/enotes/the-bioluminescence-advantage/> (accessed on 23.12.2020).
43. Food and Drug Administration, *ORA Laboratory Manual Volume II. 2020, ORA-LAB.5.4.5.*
44. US Department of Health and Human Services, C.O.V.M. Food and Drug Administration. 2015, *VICH GL49(R)*.
45. M. Pschenitz, E. S. Gavrilova, C. Tarasov, et al., *Int. Immunopharmacol.*, **21** (1), 225 (2014).
46. N. N. Ugarova, *J. Biolumin. Chemilumin.*, **4** (1), 406 (1989).
47. W. D. McElroy, H. H. Seliger, and E. H. White, *Photochem. Photobiol.*, **10** (3), 153 (1969).
48. J. C. Cazin, M. Cazin, J. L. Gaborit, et al., *Hum. Toxicol.*, **6** (4), 315 (1987).
49. E. B. Burlakova, A. A. Konradova, and E. L. Maltseva, *Chem. Physics*, **22**, 106 (2003).
50. J. M. Saa and A. Frontera, *ChemPhysChem.*, **21** (4), 313 (2020).
51. I. V. Berezin, L. Y. Brovko, and N. N. Ugarova, *Rus. J. Bioorg. Chem.*, **3** (12), 1589 (1977).
52. S. D. Banik, M. Nordblad, J. M. Woodley, et al., *Catalysts*, **7** (8), 18 (2017).
53. RCSB PDB, Available online: <https://www.rcsb.org/structure/2D1R> (accessed on 19.05.2020).
54. V. V. Goncharuk, T. V. Pletneva, E. V. Uspenskaya, et al., *J. Water Chem. Technol.*, **39** (6), 325 (2017).
55. K. Johnson, arXiv: Atomic and Molecular Clusters (2009).

Alteration of Enzyme-Substrate Interactions by Ultra-High Dilutions of the Substrate

G.Yu. Lomakina* and N.N. Ugarova*

**Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, 1/3, Moscow, 119991 Russia*

The effects of different ultra-high dilutions of luciferin ranged from 10^{10} to 10^{102} on luciferin-luciferase reaction of fireflies were investigated. Luciferin substrate concentration varied from 0.0025 nM to 2.5 nM and ATP concentration remained unchanged. This study evaluated the bioluminescence intensity after addition of ultra-high dilutions of luciferin or ultra-high dilutions of water to the bioluminescent system and some multidirectional and significant differences were found. The number of ultra-high dilutions from studied starting materials, for which significant differences were found, increased sharply with decreasing substrate concentration to 0.0025 nM. No differences were found when the effects of ultra-high dilutions of a non-specific control imidazole and ultra-high dilutions of water on the signal intensity were compared. Our results suggest that ultra-high dilutions of luciferin can specifically inhibit the luciferin-luciferase reaction.

Keywords: supramolecular interactions, bioluminescence, enzyme-substrate interactions, ultra-high dilutions, firefly luciferin-luciferase reaction