

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Асланлы Айсель Гюльхан кызы

**Полифункциональные препараты на основе His₆-ОРН
для гидролиза
фосфорорганических соединений и ацилгомосеринлактонов**

03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва - 2020

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Научный руководитель – **Ефременко Елена Николаевна**, доктор биологических наук, профессор
Официальные оппоненты – **Марквичева Елена Арнольдовна**, доктор химических наук, руководитель лаборатории биомедицинских материалов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук»

Швядас Витаутас-Юозапас Каятоно, доктор химических наук, профессор Факультета биоинженерии и биоинформатики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Куюкина Мария Станиславовна, доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет»

Защита диссертации состоится «29» октября 2020 г. в 15.00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.02.08 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: г. Москва, ул. Ленинские горы, д.1, стр.11, ауд. 202. E-mail: d50100159@yandex.ru

С диссертацией, а также со сведениями о регистрации участия в защите в удаленном интерактивном режиме можно ознакомиться на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/323121471/>

Автореферат разослан «28» сентября 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук

 И.К. Сакодынская

Общая характеристика работы

Актуальность темы. В сельскохозяйственном производстве активно применяются фосфорорганические соединения (ФОС), составляющие существенную часть (~40%) от числа применяемых в растениеводстве и животноводстве пестицидов, которые сохраняют свое присутствие в сырье и готовой продукции. ФОС обладают нейротоксичностью, мутагенностью и кумулятивным эффектом, а потому представляют собой антропогенную опасность. Одним из наиболее эффективных методов их детоксификации представляется ферментативный гидролиз. Разработка ферментных биопрепаратов на основе гексагистидинсодержащей органофосфатгидролазы (His₆-ОРН), проявляющей высокую каталитическую активность в отношении широкого спектра ФОС, для возможного разложения этих веществ в сельскохозяйственной продукции, сырье и/или в организме человека и животных является **актуальной**.

Другой **актуальной** современной проблемой является формирование у бактерий резистентности по отношению к применяемым антибиотикам. Способностью противостоять воздействию антибиотиков обладают как грамположительные (Г(+)), так и грамотрицательные (Г(-)) клетки бактерий, поражающие сельскохозяйственные культуры растений и животных. Причиной такого феномена является, прежде всего, способность бактериальных клеток изменять свой биохимический статус в составе высококонцентрированных популяций под действием низкомолекулярных аутоиндукторов. Формирование таких популяций предопределяется механизмом «кворумного ответа» (Quorum Sensing, QS). Молекулами аутоиндукторами QS у большинства Г(-) патогенных бактерий служат различные N-ацилгомосеринлактоны (АГЛ). В этой связи, **актуальным** является поиск эффективных средств, которые могут повысить результативность использования уже известных антибактериальных препаратов при решении проблемы бактериальной резистентности. Кандидатами в число таких «средств» представляются лактоназы – ферменты, гидролизующие молекулы АГЛ.

Ранее было установлено, что His₆-ОРН проявляет активность не только в реакциях с ФОС, но и в отношении отдельных молекул АГЛ, катализируя разрыв лактонного кольца. Очевидно, что, как с теоретической, так и с практической точки зрения, **перспективной** представляется разработка оригинальных многофункциональных биопрепаратов на основе His₆-ОРН, эффективно действующих как в отношении ФОС, так и АГЛ. Разработка общих научных подходов к созданию таких препаратов, которые комбинировали бы действие ферментов, гидролизующих ФОС и АГЛ, с антимикробными агентами, могли бы сформировать в перспективе основу для использования такой информации в разработке аналогов, пригодных и для человека.

Степень разработанности темы исследования. На момент начала работы над данной диссертацией была изучена активность His₆-ОРН в отношении ФОС и показано наличие активности в отношении отдельных молекул АГЛ. В литературе присутствовали ссылки на работы, в которых исследовалась возможность комбинирования различных антимикробных агентов между собой, однако информации о создании композиций ферментов с антимикробными агентами обнаружено не было.

Цель работы - разработка высокоэффективных ферментных композиций на основе His₆-ОРН, способных гидролизовать токсичные ФОС и молекулы АГЛ, ответственные за развитие резистентности у Г(-) бактерий.

Для достижения цели работы были определены **следующие задачи:**

1. Исследовать каталитические и антибактериальные свойства композиций His₆-ОРН или ее полипептидных комплексов (ФПК) с различными по химической структуре антибиотиками.
2. На основе применения компьютерного моделирования отобрать наиболее эффективно действующие комбинации «фермент-антибиотик» и оценить влияние антибиотиков на активность His₆-ОРН.
3. Определить возможность рационального комбинирования His₆-ОРН с молекулами антимикробных пептидов (АМП) вместо антибиотиков.
4. Сравнить эффективность комбинирования различных АГЛ-гидролизующих ферментов и антимикробных агентов с аналогичными данными, полученными в отношении His₆-ОРН.
5. При использовании бактериальной целлюлозы (БЦ) и криогеля поливинилового спирта (ПВС) разработать образцы композитных biomaterialов на основе His₆-ОРН в комбинации с антимикробными агентами.

Научная новизна работы. Впервые с использованием методов молекулярного моделирования и экспериментального исследования продемонстрирована возможность разработки полифункциональных комбинированных ферментных препаратов на основе His₆-ОРН и:

- антибиотиков (β-лактамных антибиотиков, аминогликозидов, пуромицина, цефтиофура, рифампицина), применяемых на практике в отношении Г(-) бактериальных патогенов и различающихся по химической структуре, с целью улучшения эффективности их действия и снижения их минимальных ингибирующих концентраций (МИК),
- АМП, действующих в отношении как Г(-), так и Г(+) патогенных бактерий, примененных для стабилизации фермента His₆-ОРН в составе разработанных препаратов.

С использованием анализа активности His₆-ОРН, проявляемой в отношении ФОС, установлен смешанный тип ингибирования фермента различными антимикробными агентами, определены те из них, что имеют минимальный

ингибирующий эффект и практически не экранируют активный центр фермента.

Определены каталитические и физико-химические характеристики разработанных ферментных композиций, показана противобактериальная эффективность действия ферментных композиций, полученных в комбинации с различными антимикробными агентами в отношении Г(-) и/или Г(+) бактерий. Установлено, что в составе таких композиций происходит:

- стабилизация ферментативной активности His₆-ОРН, увеличение каталитической эффективности действия фермента и расширение его субстратного спектра действия;
- значительное увеличение эффективности действия антимикробных агентов и, следовательно, снижение их МИК в отношении Г(-) и Г(+) бактерий, и как следствие, возможность снижения применяемых эффективных доз.

Впервые проведено сравнение эффективности комбинирования различных АГЛ-гидролизующих ферментов и антимикробных агентов с аналогичными данными, полученными в отношении His₆-ОРН. Выявлено, что, в сравнении с известными АГЛ-гидролизующими ферментами, His₆-ОРН можно эффективно комбинировать с большим количеством различных антимикробных агентов и, следовательно, перспективным является комбинирование антимикробных агентов именно с His₆-ОРН для получения ферментных композиций, эффективных в отношении более широкого спектра молекул АГЛ.

Впервые при использовании БЦ и криогеля ПВС разработаны композитные биоматериалы на основе His₆-ОРН в комбинации с антимикробными агентами. Определены их каталитические и бактерицидные свойства. Установлено, что для получения перспективных биоматериалов наиболее эффективным представляется комбинирование His₆-ОРН с β-лактамым антибиотиком - меропенемом или с таким АМП, как темпорин А.

Теоретическая и практическая значимость работы. На основе результатов исследований отобраны вещества, проявляющие антимикробные и/или стабилизирующие свойства (с целью максимального сохранения каталитических свойств ферментных композиций), для рационального комбинирования их с рядом ферментов, катализирующих гидролиз сигнальных молекул бактериального кворума. Пул эффективных комбинаций фермента His₆-ОРН, проявляющего активность в реакциях с АГЛ и ФОС, с антимикробными агентами, выявленный в этом исследовании, формирует реальную научно-практическую основу для разработки новых разнообразных комбинированных препаратов, которые могут найти применение: - в сельском хозяйстве, позволяя решить ряд проблем, связанных с необходимостью борьбы с бактериальными заболеваниями растений и животных, и одновременно с отравлениями, возникающими в результате токсичного воздействия

применяемых фосфорорганических пестицидов на животных; - в составе создаваемых новых средств химико-биологической защиты для человека. Полученные данные по компьютерному моделированию демонстрируют конкретный подход к целенаправленному комбинированию отдельных ферментов с антибиотиками в составе нековалентных комплексов для использования белков в качестве носителей для антибиотиков и повышения эффективности действия последних.

Методология и методы исследования. В рамках данной работы были использованы методы компьютерного моделирования, молекулярной биологии, различные современные экспериментальные методы исследования, применяемые для характеристики свойств ферментов и клеток бактерий.

Положения, выносимые на защиту:

1. Комбинирование His₆-ОРН и различных по химической структуре антибиотиков приводит к снижению МИК последних в отношении Г(-) клеток бактерий. При этом наиболее эффективным вариантом для комбинирования с ферментом, как с точки зрения сохранения каталитической активности His₆-ОРН, так и снижения МИК антибиотика, является β-лактамный антибиотик - ампициллин.
2. Использование компьютерного моделирования позволяет отобрать наиболее эффективно действующие комбинации «фермент-β-лактамный антибиотик». При комбинировании His₆-ОРН с β-лактамным антибиотиком меропенемом происходит расширение субстратного спектра действия фермента, увеличение эффективности его каталитического действия и стабилизация ферментативной активности.
3. Использование молекул АМП вместо антибиотиков для комбинирования с His₆-ОРН позволяет получить стабильные композиции, проявляющие ферментативную и антимикробную активность.
4. Комбинирование антимикробных агентов с His₆-ОРН обеспечивает получение большего числа возможных эффективно действующих композиций в отношении молекул АГЛ в сравнении с известными АГЛ-гидролизующими ферментами.
5. С использованием БЦ и криогеля ПВС могут быть получены композитные биоматериалы на основе His₆-ОРН в комбинации с антимикробными агентами меропенемом или темпорином А, обладающие высокой каталитической и бактерицидной активностями.

Личный вклад автора заключается в планировании и проведении экспериментальной части, а также работ по сбору и анализу литературных данных. Все результаты получены самим автором или при непосредственном его участии в случае совместной работы. Автор принимал непосредственное участие при подготовке публикаций по материалам работы.

Степень достоверности и пробация результатов. Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием современных физико-химических методов исследования, на высокоточном оборудовании, а также проведением статистической обработки полученных результатов. Научные положения и сформулированные в диссертации выводы обоснованы и подтверждаются результатами многочисленных исследований.

Материалы диссертации были представлены на Московском междунар. салоне изобретений и инновационных технологий "АРХИМЕД-2017" и «Архимед-2020», III Междисциплин. Симпозиуме по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике (Севастополь, 2017), Intern. Conference "Biocatalysis: Fundamentals & applications" (Истра, 2017), Intern. Conference "Renewable plant resources: Chemistry, technology, medicine" (Санкт-Петербург, 2017), 20-й междунар. выставке ХИМИЯ (Москва, 2017), XVII Ежегодной молодежной конференции с междунар. участием ИБХФ РАН-ВУЗы "Биохимическая физика" (Москва, 2017), Междисциплин. научном форуме с междунар. участием «Новые материалы и перспективные технологии» (Москва, 2017; 2018; 2019;), Выставке инновационных проектов Химического факультета "Навстречу 88-летию химического факультета МГУ" (Москва, 2017), Междунар. научно-практической конференции "Новые подходы к разработке технологий производства и переработки сельскохозяйственной продукции» (Волгоград, 2018), Междунар. молодежной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные исследования в области химии и экологии» (Курск, 2018), XI Московском междунар. конгрессе "Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни" (Москва, 2019), Междунар. научно-технической конференции молодых ученых «Инновационные материалы и технологии» (Минск, 2020). Результаты работы являются частью проекта РФФ 16-14-00061 и были отмечены стипендией Президента РФ (2019-2020) и стипендией МГУ имени М.В.Ломоносова для аспирантов и молодых ученых (2019-2020).

Публикации. Основные результаты работы опубликованы в 8 статьях в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и РИНЦ, в 1 статье в монографии, в 4 статьях в сборниках, индексируемых в базах данных Scopus и РИНЦ, и 16 публикациях в сборниках материалов и тезисов докладов на международных конференциях.

Объем и структура. Диссертационная работа состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов и списка цитируемой литературы из 275 источников. Работа изложена на 174 страницах машинописного текста и содержит 36 рисунков и 30 таблиц.

Основное содержание работы

В первой главе приводится обзор литературы по теме работы в трех направлениях: «Проблемы, формирующиеся в результате применения ФОС в сельском хозяйстве и их решения», «Проблема развития антибиотикорезистентности» и «Гексагистидинсодержащая органофосфатгидролаза, ее свойства». Рассмотрены различные способы создания ферментных биокатализаторов и методы их стабилизации для *in vivo* применений, а также, существующие подходы к преодолению проблемы токсичности ФОС и антибиотикорезистентности.

Во второй главе приведен перечень, использованных в работе реактивов, материалов, приборов, методик разработки и исследования каталитических, антибактериальных и физико-химических свойств образцов ферментных композиций.

Третья глава посвящена представлению основных результатов, полученных в работе, и их обсуждению.

Результаты и их обсуждение

1. Определение МИК антибиотиков в составе ферментных композиций, в отношении клеток Г(-) бактерий. Для исследования влияния введения ферментных композиций на основе His₆-ОРН или её ФПК с полиаспарагиновой (ПАК₅₀) и полиглутаминовой (ПГК₅₀) кислотами (мольное соотношение фермент:полипептид = 1:5) и различных по химической структуре антибиотиков (ампициллин, цефтиофур, гентамицин, канамицин, пуромицин и рифампицин) в высококонцентрированные суспензии Г(-) бактерий (10⁶ кл/мл) на эффективность действия антибиотиков были определены величины МИК. Было установлено, что комбинирование антибиотиков с His₆-ОРН или её ФПК способствует снижению значений МИК для всех антибиотиков, в лучшем варианте - до 85 раз (Табл. 1).

Для изучения возможного влияния антибиотиков на активность фермента определялись каталитические характеристики His₆-ОРН и её ФПК в составе ферментных композиций (Табл.2). В качестве субстрата при этом использовался фосфорорганический пестицид параоксон. Было установлено, что антибиотики в концентрациях, не превышающих их МИК, не оказывают заметного ингибирующего влияния на активность фермента.

Таким образом, была определена потенциальная возможность снижения величин разовых эффективных доз применяемых антибиотиков. При этом для каждого из антибиотиков был установлен смешанный тип ингибирования активности His₆-ОРН в концентрациях, значительно превышающих их МИК. Наилучшие каталитические характеристики фермента были получены при комбинировании его с ампициллином - β-лактамным антибиотиком, который оказывал минимальный ингибирующий эффект на активность His₆-ОРН.

Таблица 1. Минимальные ингибирующие концентрации антибиотиков отдельно и в составе ферментных композиций на основе His₆-ОРН (12,5 мкг/мл) или её ФПК в отношении клеток бактерий при pH среды 7,5.

Антибиотик	МИК, мкг/мл			
	Исходно	+ His ₆ -ОРН	+His ₆ -ОРН-ПГК ₅₀	+ His ₆ -ОРН-ПАК ₅₀
	<i>Escherichia coli</i> DH5α			
Ампициллин	4900±50	445±10	4454±50	3578±50
Цефтиофур	1000±17	900±12	870±14	850±15
Гентамицин	3800±50	87,9±2	79,6±3,1	94,8±3,5
Канамицин	1±0,05	0,5±0,01	0,4±0,01	0,3±0,01
Пуромицин	3±0,05	1,2±0,01	0,8±0,03	0,5±0,02
Рифампицин	25±0,5	23±0,2	21±0,3	22±0,3
	<i>Pseudomonas sp.</i> 78G			
Ампициллин	3600±50	498±3	1115±50	1250±30
Цефтиофур	4000±33	2730±20	2200±25	2170±17
Гентамицин	5100±50	61±1	66,7±3,1	59,7±2,0
Канамицин	120±5	15±0,5	8±0,1	6±0,2
Пуромицин	6±0,2	2,1±0,01	1,8±0,01	1,7±0,01
Рифампицин	31±0,5	28±0,1	25±0,1	26±0,5

Таблица 2. Константы смешанного ингибирования гидролитической активности His₆-ОРН и её ФПК в присутствии разных антибиотиков (тип ингибирования: **K_к** – конкурентное, **K_н**- бесконкурентное).

Ингибитор	Фермент или ФПК	K _к , мМ	K _н , мМ
—	His ₆ -ОРН		
	His ₆ -ОРН/ПАК ₅₀		
	His ₆ -ОРН/ПГК ₅₀		
Ампициллин	His ₆ -ОРН	229±15	72±15
	His ₆ -ОРН/ПАК ₅₀	515±14	241±20
	His ₆ -ОРН/ПГК ₅₀	146±7	48±7
Гентамицин	His ₆ -ОРН	264±18	61±13
	His ₆ -ОРН/ПАК ₅₀	377±10	109±9
	His ₆ -ОРН/ПГК ₅₀	162±8	41±6
Канамицин	His ₆ -ОРН	72±5	62±13
	His ₆ -ОРН/ПАК ₅₀	142±4	23±2
	His ₆ -ОРН/ПГК ₅₀	44±2	26±4
Рифампицин	His ₆ -ОРН	29±2	26±5
	His ₆ -ОРН/ПАК ₅₀	79±2	10±1
	His ₆ -ОРН/ПГК ₅₀	32±2	15±2

2. Компьютерное моделирование взаимодействий His₆-ОРН с различными по химической структуре антибиотиками. С целью исследования возможности применения компьютерного моделирования для предсказания взаимодействий в составе ферментных композиций и отбора наиболее эффективных комбинаций His₆-ОРН с антибиотиками был использован метод молекулярного докинга. В результате докинга всех экспериментально исследованных антибиотиков к поверхности димера His₆-ОРН при рН 7,5 и 10,5 (оптимум действия чистого фермента) были получены компьютерные модели наиболее вероятных вариантов их взаимодействия с ферментом (Рис. 1).

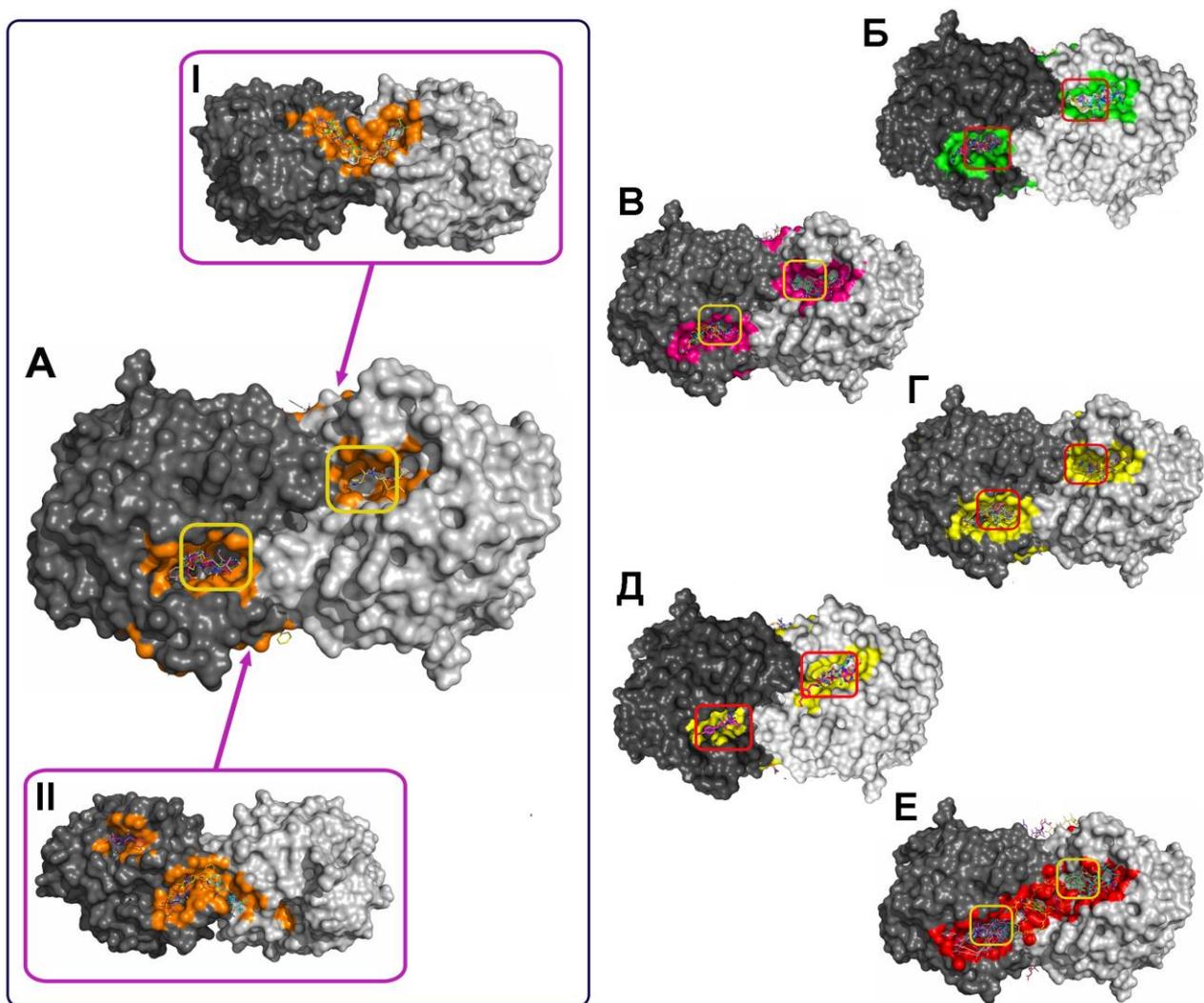


Рис. 1. Расположение молекул ампициллина (А), цефтиофура (Б), гентамицина (В), канамицина (Г), рифампицина (Е) при рН 7,5 (а) на поверхности димера His₆-ОРН окрашены по-разному (серый и темно-серый). Атомы на поверхности His₆-ОРН, расположенные в пределах 4 Å от любого атома антибиотика, и соответствующая молекулярная поверхность окрашены по-разному при рН 7,5. Входы в активный центр димера выделены квадратами. Малиновые прямоугольники показывают димерную молекулу His₆-ОРН при взгляде сверху (I) и снизу (II) (относительно области расположения активных центров).

Помимо связывания антибиотиков непосредственно с белком в области активного центра наблюдалось их взаимодействие с другими участками поверхности димера. В частности, в месте контакта отдельных мономерных субъединиц фермента в составе димера.

Расчёт площади, занимаемой молекулой антибиотика на поверхности димера His₆-ОРН, в случае взаимодействия антибиотиков с ферментом при рН 7,5 и 10,5 показал, что эта характеристика не варьировалась в зависимости от рН. Между тем, в ряду ампициллин < гентамицин ≈ канамицин < рифампицин был отмечен восходящий тренд в процентах площади, занимаемой антибиотиками вблизи активных центров фермента при обоих значениях рН. Так, площадь, занимаемая ампициллином, была в 1,5-1,7 раз меньше по сравнению с рифампицином. Тем самым, результаты молекулярного докинга подтвердили ранее экспериментально полученные результаты, а именно: наилучшим кандидатом для комбинирования с His₆-ОРН оказался ампициллин, а наихудшим – рифампицин, тогда как остальные антибиотики занимали промежуточную позицию среди кандидатов на комбинирование с ферментом.

Поскольку была показана хорошая корреляция результатов молекулярного докинга и экспериментальных исследований, то далее молекулярный докинг использовался для поиска эффективных комбинаций фермента с антибиотиками перед экспериментальными исследованиями.

3. Исследование влияние разных β-лактамных антибиотиков на каталитическую активность His₆-ОРН. Учитывая успех исследований с ампициллином, далее был проведен скрининг антибиотиков β-лактамного ряда, для определения их влияния на активность и субстратную специфичность His₆-ОРН, проявляемую ферментом в отношении разных молекул АГЛ, и для отбора наиболее эффективных композиций. С помощью молекулярного докинга β-лактамных антибиотиков (цефокситина, цефтриаксона, цефепима, оксациллина, амоксициллина, меропенема и имипенема) к поверхности димера His₆-ОРН при рН 7,5 и 10,5 были получены наиболее вероятные модели их взаимодействия. Было установлено, что цефокситин, оксациллин и амоксициллин перекрывают вход в активный центр фермента похожим образом и в одинаковой степени. Чуть большее перекрывание было обнаружено в присутствии молекулы цефепима, при этом 3 антибиотика (меропенем, имипенем и цефтриаксон) в наименьшей степени блокировали активный центр фермента.

Была рассчитана площадь, занимаемая молекулами антибиотиков на поверхности димера His₆-ОРН при рН 7,5 и 10,5, и показано, что она увеличивалась от имипенема (5,7–6,4%) через цефтриаксон (8,1–8,5%) до меропенема (9,8–11,6%). На основании этого скрининга из 7 репрезентативных β-лактамных антибиотиков для экспериментальной работы далее были отобраны именно эти 3 антибиотика: имипенем (как наименее слабо

связывающийся с поверхностью фермента), цефтриаксон (как наиболее прочно связывающийся вариант) и меропенем (как чувствительный к pH среды).

Далее проводились исследования каталитических характеристик His₆-ОРН и её ФПК в реакциях гидролиза разных АГЛ: N-бутирил-гомосеринлактона (С4-ГЛ), N-октанойл-гомосеринлактона (С8-ГЛ) и N-додеканойл-гомосеринлактона (С12-ГЛ) в присутствии β-лактамных антибиотиков (Табл. 3). Эффективность гидролиза молекул АГЛ росла с увеличением длины ацильного заместителя в структуре исследуемых субстратов, и максимальная активность проявлялась в реакциях с С8-ГЛ и С12-ГЛ. При комбинировании фермента с антибиотиками происходило значительное увеличение эффективности каталитического действия фермента (до 2,7 раз).

Таблица 3. Каталитические характеристики некоторых ферментных композиций на основе His₆-ОРН и β-лактамных антибиотиков в отношении различных молекул АГЛ при pH 7,5 и комнатной температуре.

Ферментные биокатализаторы	K_M (мкМ)	$V_{\max} \cdot E_0^{-1}$ (с ⁻¹)	$V_{\max} \cdot E_0^{-1} \cdot K_M^{-1}$ (10 ³ с ⁻¹ ·М ⁻¹)
N-бутирил-D,L-ГЛ (С4-ГЛ)			
His ₆ -ОРН	413±6	2,62±0,02	6,34±0,14
His ₆ -ОРН/ПАК ₅₀	655±16	3,67±0,10	5,60±0,29
His ₆ -ОРН/ПГК ₅₀	655±7	3,97±0,05	6,06±0,14
His ₆ -ОРН/меропенем	315±17	5,17±0,14	16,41±1,33
His ₆ -ОРН/цефтриаксон	273±7	4,21±0,11	15,42±0,80
His ₆ -ОРН/ПАК ₅₀ /меропенем	282±7	3,13±0,08	11,10±0,56
His ₆ -ОРН/ПАК ₅₀ /имипенем	525±17	6,70±0,18	12,76±0,76
His ₆ -ОРН/ПГК ₅₀ /имипенем	492±13	6,01±0,16	12,22±0,65
His ₆ -ОРН/ПГК ₅₀ /цефтриаксон	336±11	4,55±0,12	13,54±0,80
N-(3-гидроксиоктанойл)-D,L-ГЛ (С8-ГЛ)			
His ₆ -ОРН	224±8	3,66±0,03	16,34±0,72
His ₆ -ОРН/ПАК ₅₀	189±12	3,72±0,02	19,68±1,36
His ₆ -ОРН/ПГК ₅₀	483±31	4,93±0,03	10,21±0,72
His ₆ -ОРН/цефтриаксон	320±21	12,20±0,08	38,13±2,75
His ₆ -ОРН/ПАК ₅₀ /меропенем	778±50	17,25±0,11	22,17±1,57
His ₆ -ОРН/ПГК ₅₀ /имипенем	705±46	17,08±0,11	24,23±1,74
N-(3-оксододеканойл)-L-ГЛ (С12-ГЛ)			
His ₆ -ОРН	101±7	1,83±0,05	18,12±1,75
His ₆ -ОРН/ПАК ₅₀	51±4	1,31±0,04	25,69±2,80
His ₆ -ОРН/ПГК ₅₀	61±4	1,00±0,03	16,39±1,57
His ₆ -ОРН/меропенем	87±6	4,28±0,12	49,20±4,77
His ₆ -ОРН/ПАК ₅₀ /имипенем	111±8	4,62±0,13	41,62±4,17
His ₆ -ОРН/ПГК ₅₀ /цефтриаксон	110±6	4,82±0,13	43,82±3,57

4. Термостабильность каталитической активности композиций на основе His₆-ОРН и β-лактамных антибиотиков. Была исследована

термоинактивация полученных ферментных композиций на основе His₆-ОРН и β-лактамных антибиотиков (Рис.2). Концентрации антибиотиков были подобраны соответственно дозам, рекомендуемым для их применения на практике. Оказалось, что присутствие антибиотиков в среде приводит к существенной стабилизации активности фермента. При переходе от 37°C к более высокой температуре ФПК His₆-ОРН теряли около 30% активности, тогда как композиция His₆-ОРН/меропенем полностью сохраняла исходный или даже проявляла более высокий уровень активности. Длительное экспонирование при 37°C показало, что фермент His₆-ОРН сохраняет более 60% активности даже через 18 ч, что крайне важно для возможного её практического применения. Наибольшая стабильность была отмечена для композиции His₆-ОРН/меропенем, которая сохраняла половину исходной активности и через 24 ч экспонирования при указанной температуре. Таким образом, меропенем оказался тем самым вариантом, который обеспечил в комбинации с His₆-ОРН получение стабильной композиции с широким спектром действия в отношении разных протестированных молекул АГЛ.

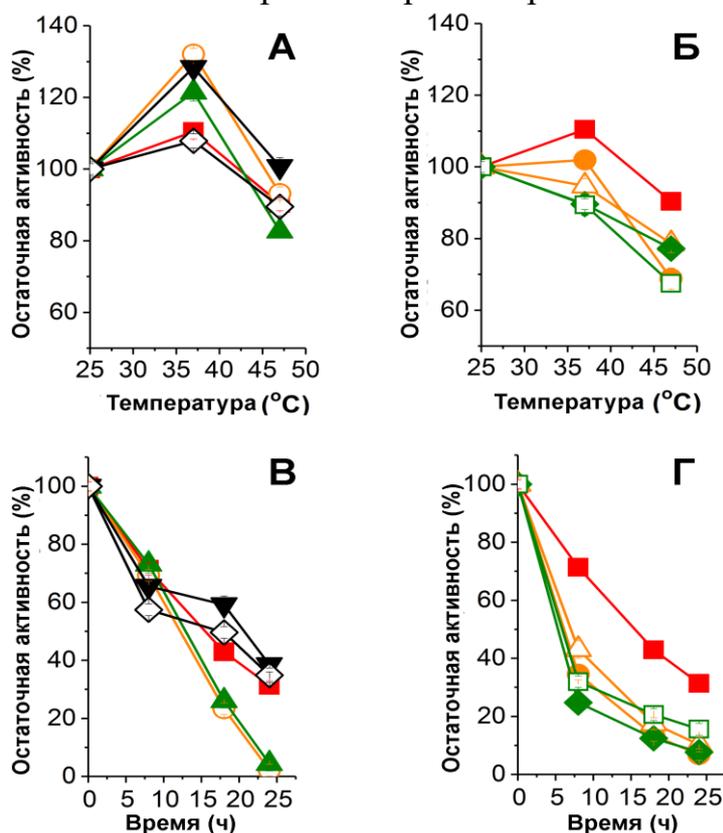


Рис.2. Термическая инактивация активности His₆-ОРН (■) и её комплексов His₆-ОРН/ПАК₅₀ (○) или His₆-ОРН/ПГК₅₀ (▲) при pH 7,5 как функция от (А,Б) температуры среды при экспонировании в течение 15 мин и (В,Г) длительности экспонирования при 37°C в композициях с меропенемом, имипенемом и цефтриаксоном: His₆-ОРН/меропенем (▼), His₆-ОРН/цефтриаксон (◇), His₆-ОРН/ПАК₅₀/меропенем (△), His₆-ОРН/ПАК₅₀/имипенем (●), His₆-ОРН/ПГК₅₀/имипенем (◆), His₆-ОРН/ПГК₅₀/цефтриаксон (□). Концентрации антибиотика и His₆-ОРН или её ФПК были 0,1 г/л и 0,3 г/л, соответственно.

5. Отбор, предсказание структур и молекулярный докинг известных антимикробных пептидов (АМП) к поверхности His₆-ОРН. Сегодня активно растёт интерес к разнообразным полипептидам с антимикробными свойствами, выделяемым из разных природных источников, различающиеся между собой по числу аминокислотных остатков (от 10 до 50) и их последовательности в пептидной структуре. Высокая антимикробная активность, широкий спектр действия и отсутствие резистентности к действию таких АМП у различных бактерий позволяет рассматривать их в качестве потенциальной альтернативы для известных и применяемых антибиотиков. Замена полипептидов ПГК₅₀ и ПАК₅₀ в составе изученных ранее ФПК с His₆-ОРН на молекулы АМП, специально отобранные для подобных комплексов, казалась привлекательной для обеспечения возможной стабилизации фермента в комплексе с новыми полипептидами и одновременного придания таким системам двойных свойств: сохранения каталитической активности His₆-ОРН в отношении разных молекул АГЛ и привнесения вместе с АМП дополнительных антимикробных свойств.

С целью исследования возможности комбинирования His₆-ОРН с молекулами различных АМП для получения каталитически активных ферментных композиций с высокой стабильностью, активностью в отношении молекул АГЛ и потенциальным антимикробным действием был проведен анализ литературы, в результате которого 19 молекул АМП были выбраны для исследования возможности комбинирования с His₆-ОРН *in silico*. Наиболее вероятные модели взаимодействия различных молекул АМП с поверхностью димера His₆-ОРН были получены методом молекулярного докинга при pH 7,5 и 10,5 (Рис. 3), аналогично тому, как это было сделано ранее с антибиотиками.

Для исследования взаимодействий в моделях «His₆-ОРН-АМП» были рассчитаны заряды АМП, значения аффинности молекул АМП к поверхности димера His₆-ОРН и величины площади, занимаемой молекулами АМП на всей поверхности фермента и вблизи активных центров в димере фермента.

Было выявлено, что для большинства молекул АМП площадь, занимаемая ими вблизи активных центров в димере His₆-ОРН, существенно зависела от pH. При этом интересно отметить, что результаты докинга АМП, незначительно отличающихся между собой по количеству аминокислотных остатков и/или природе остатка в определенном положении аминокислотной последовательности, принципиально различались между собой, и наблюдался разный характер взаимодействия молекул этих АМП с His₆-ОРН.

Два АМП, индолицидин и темпорин А, были отобраны как наиболее подходящие для комбинирования с His₆-ОРН на основе суммирования всех характеристик, полученных в результате молекулярного докинга.

Проведенное далее исследование каталитических характеристик ферментных композиций His₆-ОРН с индолицидином или темпорином А

показало, что каталитическая эффективность действия (определяемая как $V_{\text{макс}}/(E_0 \times K_M)$) композиций на основе индолицидина была выше чем у композиций с темпорином А на $20 \pm 2\%$ $(218 \pm 29) \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$ против $(178 \pm 23) \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$.

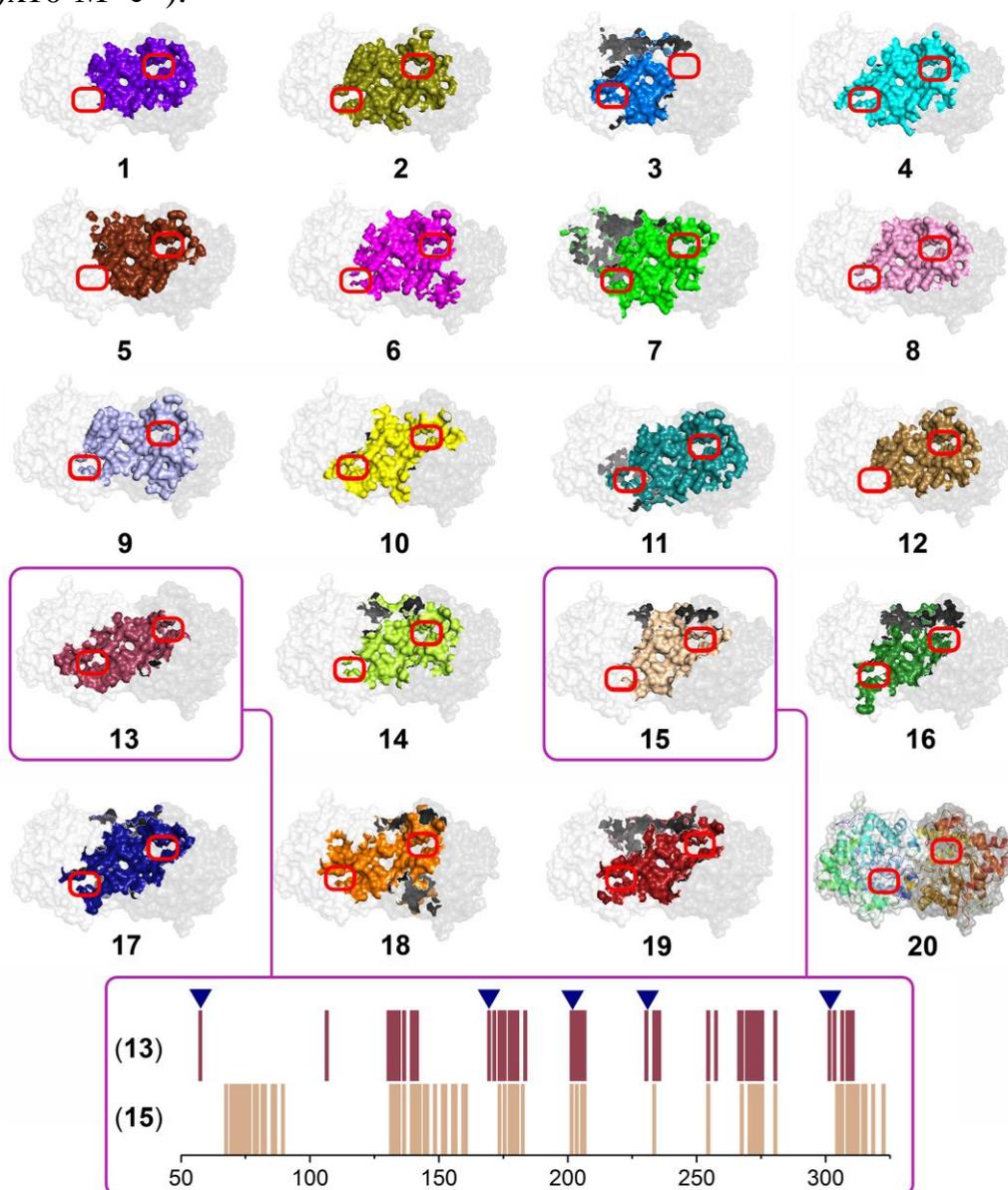


Рис.3. Вид спереди доменов для связывания молекул АМП (САР-18 (1), дермицидин (2), бактенецин 2А (3), SMAP-29 (4), цекропин А, В, P1 (5, 6, 7), VmKa1 (8), LL-37 (9), kappa-казины (10), пептид В (11), энкефалин (12), индолицидин (13), темпорин В, А, 1Ja (14, 15, 16), гепцидин (17), полимиксин В (18) и колистин (19)) при рН 7,5 на поверхности димера His₆-ОРН (20), показанного двумя субъединицами фермента, окрашенными в серый и темно-серый цвета. Атомы, расположенные в пределах 4Å от любого атома АМП и соответствующей молекулярной поверхности, окрашены по-разному для каждой молекулы полипептида. Входы в активные центры димера His₆-ОРН выделены красными прямоугольниками. В нижней части рисунка детализирована картина аминокислотных остатков His₆-ОРН, расположенных в пределах 4Å от любого атома АМП, для индолицидина и темпорина А; аминокислотные остатки активного сайта фермента отмечены треугольниками.

Была исследована термостабильность полученных композиций при различных температурах, и установлено, что взаимодействие с индолицидином и темпорином А приводит к стабилизации активности фермента против термической инактивации (Рис. 4).

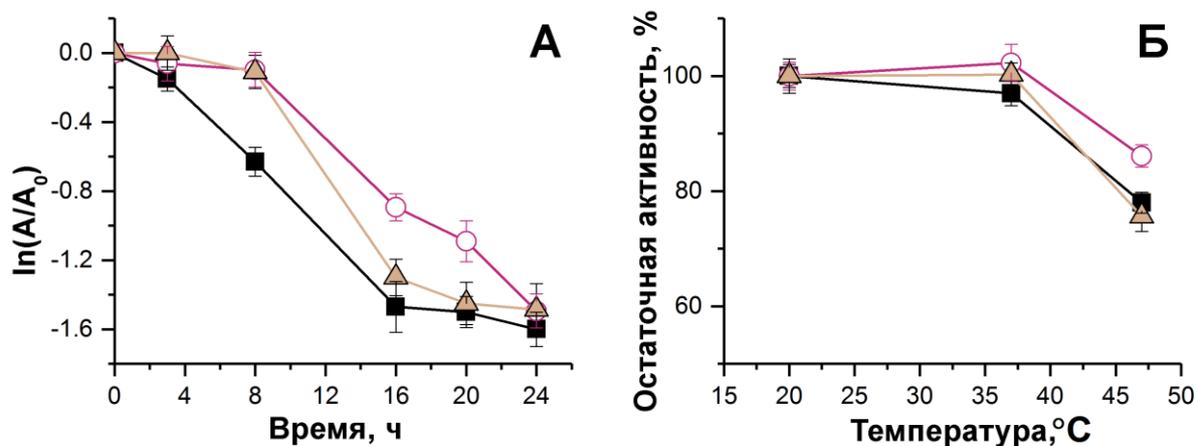


Рис.4. Термоинактивация ферментных композиций His₆-ОРН (■) с индолицидином (○) или темпорином А (▲) при pH 7,5, 37°C в течение 24 ч (А) или 15 мин при разных температурах (Б).

В целом, общая активность полученных композиций была выше по сравнению с чистым ферментом His₆-ОРН при экспонировании в течение 24 ч при 37°C. Максимальная разница наблюдалась через 8 и 16 ч воздействия композиций His₆-ОРН с темпорином А (в 1,7 раза) и индолицидином (в 1,8 раза), соответственно. Кроме того, ферментные композиции с индолицидином имели достоверно в 1,15 раза более высокую остаточную активность по сравнению с чистой His₆-ОРН при кратковременном экспонировании при 47°C.

Исследование антибактериальной активности индолицидина и темпорина А отдельно или в составе ферментных композиций проводилось в отношении различных клеток бактерий (Табл.4). Комбинация обоих АМП с His₆-ОРН привела к значительному (до 188 раз) улучшению их антибактериальной активности. Интересно, что улучшение IC₁₀ (в 1,8-3,6 раза) наблюдалось для АМП в композициях с ферментом даже против Г(+) клеток бактерий. При этом сам фермент His₆-ОРН оказывал незначительное влияние на живые клетки.

Таблица 4. 10%-ая ингибирующая концентрация (IC₁₀, мг/л) АМП в составе композиции с His₆-ОРН и без фермента в отношении Г(+) (*Bacillus subtilis*) и Г(-) (*Pseudomonas sp.*) клеток бактерий

Полипептид	<i>Bacillus subtilis</i> B-522		<i>Pseudomonas sp.</i> 78G	
	контроль	+ His ₆ -ОРН	контроль	+ His ₆ -ОРН
Индолицидин	4,66±0,61	2,62±0,22	37,6±1,9	0,24±0,03
Темпорин А	2,15±0,31	0,60±0,13	9,4±0,7	0,41±0,05

Таким образом, на основе оценки возможности рационального комбинирования His₆-ОРН с молекулами АМП вместо антибиотиков было выявлено, что индолицидин и темпорин А являются наиболее подходящими кандидатами среди АМП для комбинирования с ферментом, поскольку их композиции с His₆-ОРН обладают высокой стабильностью, ферментативной активностью и антимикробными свойствами.

6. Комбинирование различных АГЛ-гидролизующих ферментов с антимикробными агентами и сравнение их эффективности с композициями на основе His₆-ОРН. Поскольку сегодня из литературы известен уже ряд различных АГЛ-гидролизующих ферментов, то интересно было сравнить эффективность их комбинирования с антимикробными агентами с аналогичными данными, полученными с His₆-ОРН.

На основе анализа литературных данных были отобраны ферменты, обладающие разной активностью в отношении АГЛ: лактоназа из *Bacillus thuringiensis* (AiiA, PDB 2btn), пенициллинацилаза из *Pseudomonas aeruginosa* (PvdQ, PDB 4mlj) и рекомбинантная параоксоназа человека (PON2). Методом молекулярного докинга были рассчитаны возможные модели взаимодействия ряда антимикробных агентов (полимиксина В и колистина (полимиксин Е), являющихся в медицине препаратами, так называемого, «последнего резерва», а также таких молекул АМП, как дермицидин, оритаванцин, индолицидин и темпорин А, рассматриваемых в качестве альтернативы традиционным антибиотикам) с выбранными ферментами в условиях, приближенных к физиологическим (рН 7,5) (Рис. 5).

В результате анализа величин энергии связывания и площадей, занимаемой антимикробными агентами на поверхности ферментов оказалось, что среди исследованных АГЛ-гидролизующих ферментов как с точки зрения стабильности образуемых комплексов, так и эффективности протекания биокатализа, целесообразным представляется комбинирование лишь одного фермента - PvdQ с двумя антимикробными агентами: полимиксином В и колистином. Для всех остальных комбинаций наблюдалось существенное экранирование активных центров ферментов антимикробными агентами, что указывает на снижение эффективности протекания каталитической реакции. При этом, комбинирование His₆-ОРН со всеми четырьмя антимикробными агентами является перспективным.

Была определена антибактериальная активность антимикробных агентов в отношении Г(-) клеток *Pseudomonas sp.* 78G (рис.6), отдельно и в составе ферментных композиций с PvdQ или His₆-ОРН. В результате было установлено, что введение полимиксина В, колистина, индолицидина и темпорина А в комплексе с His₆-ОРН, или полимиксина В и колистина в комплексе с пенициллинацилазой PvdQ позволяет почти в 5 раз увеличить их

эффективность действия. Однако оказалось, что в сравнении с известными АГЛ-гидролизующими ферментами именно His₆-ОРН может эффективно комбинироваться с большим количеством различных антимикробных агентов, а в таких комбинациях происходило расширение спектра молекул АГЛ, гидролизуемых His₆-ОРН.

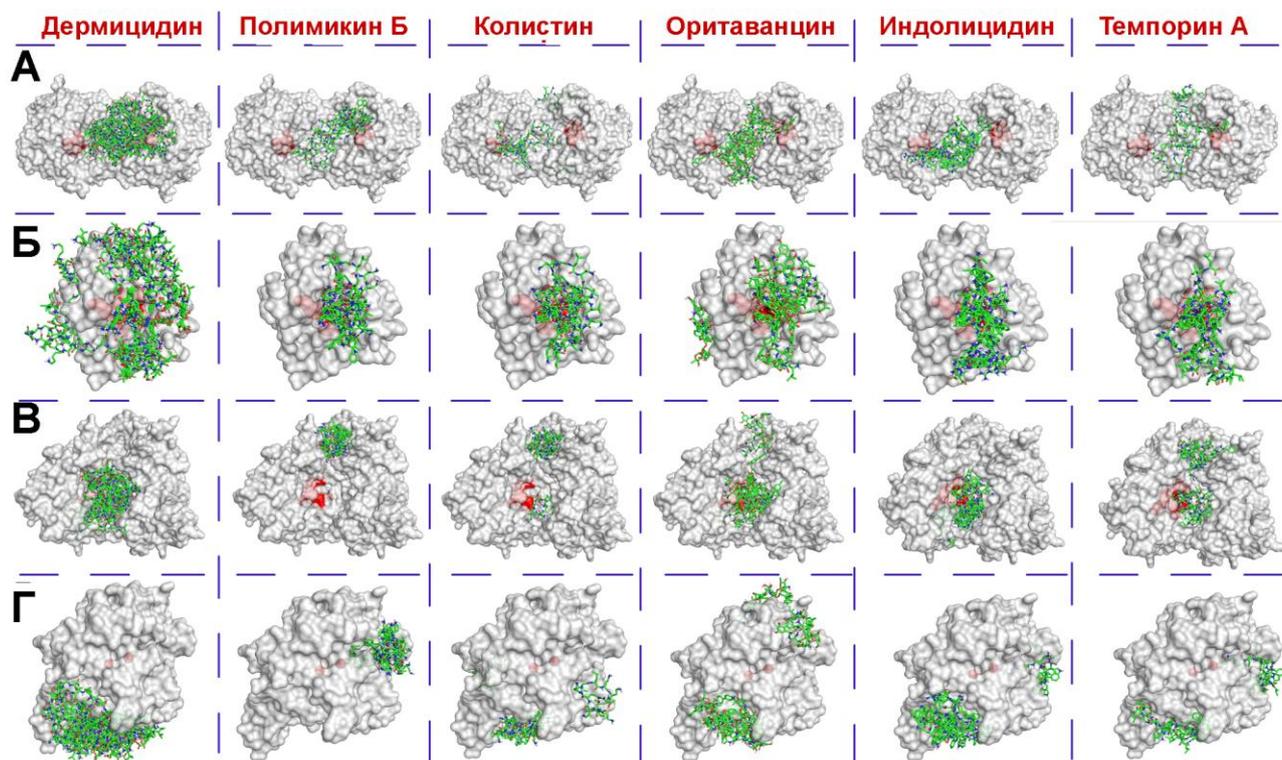


Рис.5. Рассчитанная локализация молекул дермицидина, полимиксина В, колистина, ориванцина, индолицидина и темпорина А на поверхности димера His₆-ОРН (А), лактоназы AiiA (Б), пенициллинацилазы PvdQ (В) и смоделированной PON2 (Г). Область активного центра ферментов окрашена красным цветом, а молекулы АМП - зеленым.

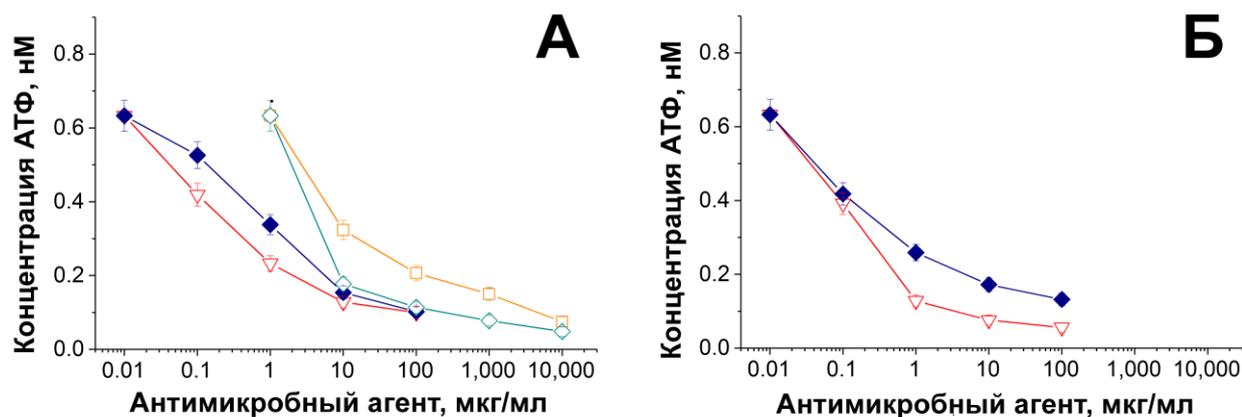


Рис.6. Антимикробная активность в отношении клеток *Pseudomonas* sp. колистина (◆), полимиксина В (▽), индолицидина (●) и темпорина А (◇) в композициях с His₆-ОРН (А) или пенициллинацилазой PvdQ (Б).

7. Композитные материалы на основе His₆-ОРН и антимикробных агентов с использованием криогеля поли(винилового спирта) и бактериальной целлюлозы. В ходе совместных исследований с проф. Лозинским В.И. (ИНЭОС РАН) были получены композитные материалы на основе His₆-ОРН в комбинации с теми антимикробными агентами, которые, как было показано, проявляют максимальный стабилизирующий эффект на каталитическую активность данного фермента (β -лактамы меропенем и такие АМП как темпорин А и индолицидин) с использованием криогеля ПВС и БЦ в качестве носителей для иммобилизации.

При исследовании ферментативной активности His₆-ОРН в полученных материалах было установлено, что как в присутствии, так и в отсутствие антимикробных агентов остаточная ферментативная активность образцов, не содержащих БЦ, исходно была выше, чем у образцов с БЦ (Рис. 7). Однако через 24 ч экспонирования их активность становилась равной между собой, то есть БЦ явно обеспечивала заметную стабилизацию фермента.

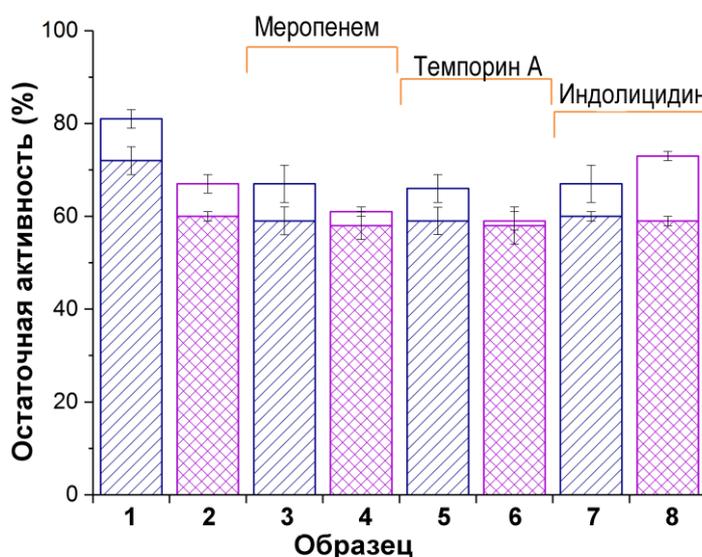


Рис.7. Ферментативная активность композитных материалов на основе криогеля ПВС/His₆-ОРН (образцы 1, 3, 5 и 7) и криогеля ПВС/БЦ/His₆-ОРН (образцы 2, 4, 6 и 8) в отсутствие (образцы 1 и 2) или в присутствии меропенема (образцы 3 и 4), темпорина А (образцы 5 и 6) и индолицидина (образцы 7 и 8). Белая и заштрихованная области столбцов характеризуют активность в нулевой момент и через 24 часа, соответственно.

Далее проводилась оценка антибактериальной активности полученных образцов композитов в отношении Г(-) клеток *Pseudomonas sp.* 78G (Рис. 8). В ходе работы с клетками было обнаружено, что образцы с антимикробными агентами, не содержащие His₆-ОРН, проявляли бактериостатический эффект (подавление бактериального роста), тогда как образцы с ферментом оказывали бактерицидное действие (гибель бактериальных клеток).

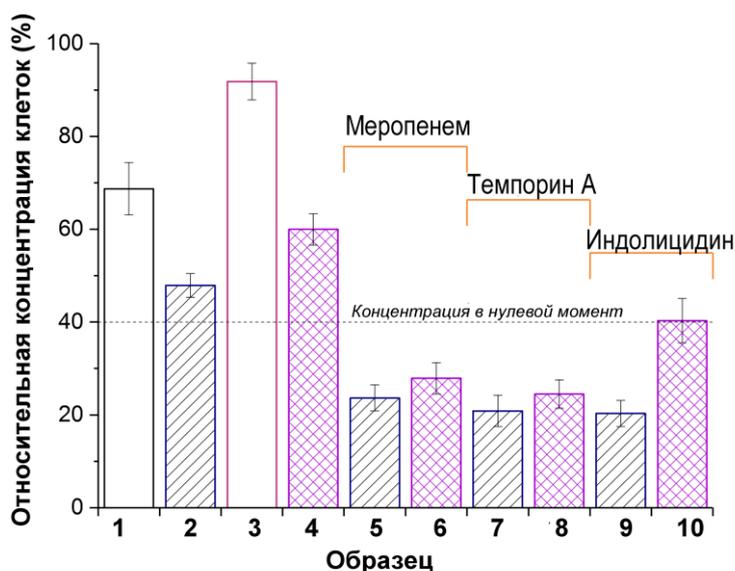


Рис.8. Концентрация бактериальных клеток *Pseudomonas sp.* в суспензии после 24 ч экспонирования при 37°C с криогелем ПВС (образец 1), криогелем ПВС/His₆-ОРН (образцы 2, 5, 7 и 9), криогелем ПВС/БЦ (образец 3) или криогелем ПВС/БЦ /His₆-ОРН (образцы 4, 6, 8 и 10) в отсутствие (образцы 1, 2, 3 и 4) или в присутствии меропенема (образцы 5 и 6), темпорина А (образцы 7 и 8) или индолицидина (образцы 9 и 10). Пунктирная линия показывает концентрацию клеток в нулевой момент времени. Концентрация клеток в контроле без каких-либо добавок через 24 ч при 37°C принималась за 100%.

Таким образом, в результате оценки как каталитических, так и бактерицидных свойств образцов композитных биоматериалов на основе His₆-ОРН и антимикробных агентов, с использованием БЦ и криогеля ПВС, было установлено, что для получения перспективных биоматериалов с высокой каталитической и бактерицидной активностями наиболее эффективным представляется сочетание His₆-ОРН с меропенемом или темпорином А.

8. Компьютерное моделирование взаимодействий композиций на основе His₆-ОРН и антибиотиков с фосфорорганическими соединениями. Целью исследований на данном этапе работы было определить влияние комбинирования фермента с антимикробными агентами на каталитическую активность His₆-ОРН в отношении ФОС. Так как при исследовании эффективности ферментных композиций в отношении молекул АГЛ была продемонстрирована хорошая корреляция результатов компьютерного моделирования и экспериментальных исследований, то метод молекулярного докинга был использован на данном этапе как наиболее простой способ предсказания возможных значительных изменений каталитической активности His₆-ОРН в композиции с антимикробными агентами по отношению к ФОС в сравнении с нативным ферментом. Были симулированы взаимодействия субстратов – молекул ФОС (параоксона и вещества VX) с активным центром His₆-ОРН в присутствии меропенема, индолицидина и темпорина А (Рис.9).

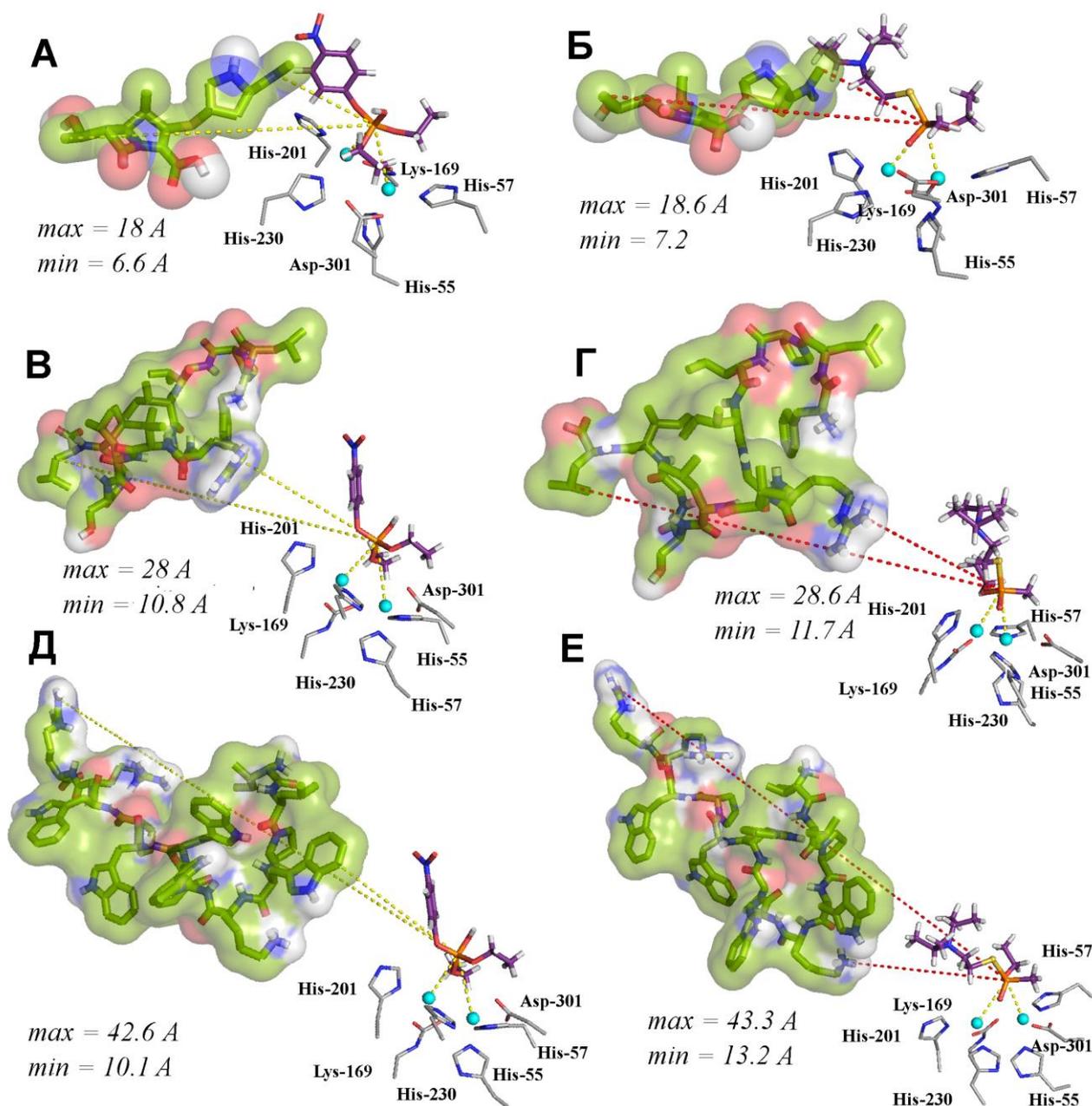


Рис. 9. Модели взаимодействия параоксона (А, В, Д) и вещества VX (Б, Г, Е) с активным центром His₆-ОРН при рН 7,5 в присутствии (А) меропенема, (Б) темпорина А и (В) индолицидина (обозначены в зеленом цвете). Молекулы ФОС показаны в фиолетовом цвете. Аминокислотные остатки активного центра His₆-ОРН и ионы Co²⁺ окрашены в серый и бирюзовый цвета, соответственно. Максимальное (*max*) и минимальное (*min*) расстояния от молекулы ФОС до молекулы антимикробного агента приведены в ангстремах (Å).

В результате компьютерного моделирования было установлено, что при одновременном присутствии молекул антибиотиков и ФОС на поверхности фермента вероятность их пересечения между собой в активном центре His₆-ОРН отсутствует.

Таким образом, исследования показали, что комбинирование фермента с

отобранными антимикробными агентами не должно влиять на ориентацию молекулы ФОС в активном центре и, следовательно, негативно влиять на эффективность протекания каталитической реакции. Экспериментальное определение константы эффективности действия композиции His₆-ОРН с меропенемом в реакции гидролиза параоксона полностью подтвердило этот вывод. Более того, величина константы эффективности действия такой композиции даже увеличилась по сравнению с чистым ферментом в 2,5 раза, аналогично тому, что наблюдалось ранее в реакциях с АГЛ (Табл.3). Эти данные вкуче, безусловно, создают предпосылки для возможного использования полученных композиций His₆-ОРН, проявляющей активность в отношении АГЛ и ФОС, с антимикробными агентами в качестве основного компонента в разработке новых химико-биологических средств защиты.

ВЫВОДЫ

1. Исследованы каталитические и антибактериальные свойства композиций His₆-ОРН или ее полипептидных комплексов, с различными по химической структуре антибиотиками. Установлено значительное снижение минимальных ингибирующих концентраций (МИК) ряда антибиотиков. Показано, что антибиотики лишь в концентрациях значительно превышающих их МИК оказывают ингибирующее влияние на активность фермента, и проявляют смешанный тип ингибирования. Выявлено, что, наилучшим вариантом для комбинирования с His₆-ОРН является β-лактамный антибиотик - ампициллин.
2. На основе применения компьютерного моделирования отобраны наиболее эффективно действующие комбинации «фермент-β-лактамный антибиотик». Проведена оценка влияния отобранных антибиотиков на активность His₆-ОРН и установлено расширение субстратного спектра действия фермента, увеличение эффективности его каталитического действия и стабилизация активности. Лучшим вариантом для комбинирования с His₆-ОРН оказался меропенем.
3. Впервые оценена возможность рационального комбинирования His₆-ОРН с молекулами антимикробных пептидов вместо антибиотиков. Выявлено, что индолицидин и темпорин А являются наиболее подходящими кандидатами для комбинирования с ферментом с целью получения стабильных композиций, проявляющих ферментативную активность и антимикробные свойства.
4. Впервые проведено сравнение эффективности комбинирования различных АГЛ-гидролизующих ферментов и антимикробных агентов с аналогичными данными, полученными в отношении His₆-ОРН. Выявлено, что, в сравнении с известными АГЛ-гидролизующими ферментами, His₆-ОРН может быть эффективно скомбинирована с большим количеством различных антимикробных агентов и, следовательно, получены ферментные композиции с наиболее широким спектром гидролиза молекул АГЛ.

5. При использовании бактериальной целлюлозы и криогеля поливинилового спирта получены образцы композитных биоматериалов на основе His₆-ОРН в комбинации с антимикробными агентами. Показано, что для получения перспективных биоматериалов с высокой каталитической и бактерицидной активностями наиболее эффективным представляется сочетание His₆-ОРН с меропенемом или темпорином А.

Список работ, опубликованных по теме диссертационной работы

Статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Scopus, Web of Science, РИНЦ:

1. **Aslanli A.** and Efremenko. E. Simultaneous molecular docking of different ligands to His₆-tagged organophosphorus hydrolase as an effective tool for assessing their effect on the enzyme // PeerJ. – 2019. – V.7.– P. e7684-e7697. [Импакт-фактор WoS = 2,38, Q1]
2. **Aslanli A.**, Lyagin I. and Efremenko E. Charges' interaction in polyelectrolyte (nano)complexing of His₆-ОРН with peptides: Unpredictable results due to imperfect or useless concept? // International Journal of Biological Macromolecules. – 2019.– V.140.– P. 368-376. [Импакт-фактор WoS = 5,16, Q1]
3. **Aslanli A.**, Stepanov N., Razheva T., Podorozhko E.A., Lyagin I., Lozinsky I.V., Efremenko E. Enzymatically functionalized composite materials based on nanocellulose and poly(vinyl alcohol) cryogel and possessing antimicrobial activity // Materials.– 2019.– V.12.– P. 3619-3629. [Импакт-фактор WoS = 2,97, Q2]
4. Маслова О.В., **Асланы А.Г.**, Сенько О.В., Ефременко Е.Н. Возможности снижения минимальных ингибирующих концентраций пурамицина и цефтиофура при их сочетании с биопрепаратами на основе His₆-ОРН // Вестник Московского Университета. Серия 2: Химия.– 2018.– Т. 73.– С. 298-302. [Импакт-фактор РИНЦ: 0,75]
Maslova O.V., **Aslanli A.G.**, Senko O.V., Efremenko E.N. The possibilities of reducing the minimal inhibitory concentration of puromycin and ceftiofur in their combination with His₆-ОРН-based biologics // Moscow University Chemistry Bulletin. – 2018. – V.73. – P. 298-302. [Импакт-фактор Scopus CiteScore = 0,46]
5. **Aslanli A.**, Lyagin I., Efremenko E. Novel approach to quorum quenching: Rational design of antibacterials in combination with hexahistidine-tagged organophosphorus hydrolase // Biological Chemistry.– 2018. – V.399. – P. 869-879. [Импакт-фактор WoS = 3,27, Q1]
6. Maslova O., **Aslanli A.**, Stepanov N., Lyagin I., Efremenko E. Catalytic characteristics of new antibacterials based on hexahistidine-containing organophosphorus hydrolase // Catalysts. – 2017. – V.7. – P. 271-284. [Импакт-фактор WoS = 3,44, Q2]

7. Maslova O.V., Senko O.V., Stepanov N.A., **Aslanli A.G.Q.**, Efremenko E.N. His₆-OPH and its stabilized forms combating quorum sensing molecules of Gram-negative bacteria in combination with antibiotics // Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products. – 2017. – V.12. – P. e63649-e63655. [Импакт-фактор WoS = 1,3, Q2]

8. **Асланлы А.Г.**, Маслова О.В., Сенько О.В., Ефременко Е.Н. Полифункциональный ферментный биопрепарат на основе гексагистидин содержащей органофосфатгидролазы, действующий против бактериоза растений // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2017. – Т.13. – С. 13–17. [Импакт-фактор РИНЦ = 0,45]

Статья в монографии:

1. **Асланлы А.**, Лягин И., Ефременко Е. Ферментные наноконструкции и их конструирование для детоксификации фосфорорганических соединений. //Глава в монографии “Фосфорорганические нейротоксины” под ред. С.Д. Варфоломеева и Е.Н. Ефременко, Москва: РИОР, 2020, с. 361 – 379. ISBN 978-5-369-02026-5. doi.org/10.29039/53_361-379

Статьи в сборниках, индексируемых в базах данных Scopus, РИНЦ:

1. **Aslanli A. G.**, Efremenko E. N. In silico determination of substrate spectrum of lactonases, hydrolyzing various N-acyl homoserine lactones // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. – 2020. – V. 848. – P. 012006-0.12015. [Импакт-фактор Scopus CiteScore = 0,6]

2. **Aslanli A.G.**, Stepanov N.A., Senko O.V., Maslova O.V., Lyagin I.V., Efremenko E.N. The hexahistidine containing organophosphorus hydrolase enzyme and bacterial cellulose based functional materials // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. – 2019. – V.525. – P. 012005-012011. [Импакт-фактор Scopus CiteScore = 0,6]

3. Efremenko E., Ahundov R., **Aslanli A.**, Lyagin I., Senko O., Maslova O., Stepanov N. Development of functional materials with specific activities for degradation of toxins // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. – 2019. – V.525. – P. 012016-012016. [Импакт-фактор Scopus CiteScore = 0,6]

4. **Асланлы А.Г.**, Сенько О.В., Лягин И.В., Степанов Н.А., Маслова О.В., Ефременко Е.Н. Биопрепараты на основе фермента His₆-OPH и различных антибиотиков для сельскохозяйственного применения // Междунар. научно-практическая конференция «Новые подходы к разработке технологий производства и переработки сельскохозяйственной продукции». – Волгоград, 2018. – С.150–155. [Импакт-фактор РИНЦ = 0,54]

Публикации в сборниках материалов и тезисов докладов:

1. **Асланлы А.Г.**, Лягин И.В., Ефременко Е.Н. Комбинированные ферментные препараты на основе His₆-ОРН с высокой эффективностью действия в отношении патогенных бактериальных клеток //Междунар. научно-техническая конференция молодых ученых «Инновационные материалы и технологии». – Минск, 2020. – С. 187–189.
2. **Асланлы А.Г.**, Маслова О.В., Лягин И.В., Сенько О.В., Степанов Н.А., Ефременко Е.Н. Стабилизированные формы гексагистидинсодержащей органофосфатгидролазы (His₆-ОРН) со специфическими свойствами // XI Москов. междунар. конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – Москва, 2019. – С. 495–496.
3. Ефременко Е.Н., Лягин И.В., Ахундов Р.Ф., **Асланлы А.Г.**, Степанов Н.А., Сенько О.В., Маслова О.В., Махлис Т.А. Различные токсины как ферментные субстраты гексагистидинсодержащей органофосфатгидролазы (His₆-ОРН) со специфическими свойствами // Москов. междунар. конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – Москва, 2019. – С. 495–496.
4. Маслова О.В., Сенько О.В., **Асланлы А.Г.**, Степанов Н.А., Ефременко Е.Н. Комбинированные противомикробные препараты на основе фермента His₆-ОРН // V Междисциплин. конференция «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии». – Москва, 2019. – С. 185–185.
5. **Асланлы А.Г.**, Степанов Н.А., Ражева Т.М., Лягин И.В., Подорожко Е.А., Лозинский В.И., Ефременко Е.Н. Композитные материалы на основе гексагистидинсодержащей органофосфатгидролазы, обладающие антимикробной активностью // V Междисциплин. научный форум с междунар. участием «Новые материалы и перспективные технологии». – Москва, 2019. – Т. 2. – С. 511-512.
6. **Асланлы А.Г.**, Степанов Н.А., Ефременко Е.Н.. Ферментативная активность биоматериалов на основе бактериальной целлюлозы с бактерицидными свойствами // Междунар. научно-практическая конференция «Инновации в технологиях и образовании». – Белово, 2019. – С.8–10.
7. **Асланлы А.Г.**, Маслова О.В., Сенько О.В., Ефременко Е.Н. Возможности применения биопрепаратов для ферментативного разложения фосфорорганических пестицидов в почвах и кормах // Международная научно-практическая конференция «Фундаментальные и прикладные исследования в области химии и экологии». — Курск, 2018. — С.171–173.
8. **Асланлы А.Г.**, Степанов Н.А., Сенько О.В., Маслова О.В., Лягин И.В., Ефременко Е.Н. Функциональный материал на основе бактериальной целлюлозы и криогеля поливинилового спирта, обладающий антимикробной активностью // IV Междисциплин. научный форум с междунар. участием «Новые материалы и перспективные технологии». – Москва, 2018.– С. 22–23.

9. Ефременко Е.Н., Ахундов Р.Ф., **Асланлы А.Г.**, Лягин И.В., Сенько О.В., Маслова О.В., Степанов Н.А. Функциональные материалы для экологичного разложения токсикантов при ведении сельскохозяйственного производства // IV Междисциплин. научный форум с междунар. участием «Новые материалы и перспективные технологии». – Москва, 2018. – С. 390–392.
10. **Асланлы А.Г.**, Ефременко Е.Н. Создание новых антибактериальных ферментных препаратов, способных разрушить сигнальные молекулы кворумного ответа патогенных организмов // V Междунар. научно-практическая конференция «Наноматериалы и живые системы». – Казань, 2018. – С. 7–8.
11. Сенько О.В., Маслова О.В., **Асланлы А.Г.**, Лягин И.В., Степанов Н.А., Махлис Т.А., Ефременко Е.Н. Полифункциональные ферментные биопрепараты для сельского хозяйства // Выставка Инновационных проектов Химического факультета МГУ. – Москва, 2018. – С. 18–21.
12. **Асланлы А.Г.**, Маслова О.В., Сенько О.В., Степанов Н.А., Лягин И.В., Ефременко Е.Н. Новый подход в создании антибактериальных препаратов на основе ферментов, способных разрушать молекулы, участвующие в активации кворумного ответа // XVII Ежегодная молодежная конференция с междунар. участием ИБХФ РАН-ВУЗы и школы «Современные проблемы биохимической физики». – Москва, 2018. – С. 105–106.
13. **Асланлы А.Г.**, Сенько О.В., Маслова О.В., Ефременко Е.Н. Полифункциональные ферментные биопрепараты, действующие против бактериоза растений // 1-ый Российский микробиологический конгресс. – Москва, 2017. – С. 138–138.
14. Маслова О.В., **Асланлы А.Г.**, Сенько О.В., Степанов Н.А., Ефременко Е.Н. Перспективы использования деструкторов N-ацилгомосеринлактонов при разработке новых антимикробных препаратов // III Междисциплин. симпозиум по медицинской, органической и биологической химии и фармацевтике. – Москва, 2017. – С. 45–45.
15. **Aslanli A.G.**, Maslova O.V., Senko O.V., Stepanov N.A., Lyagin I.V., Efremenko E.N. Creation of His₆-OPH based enzyme nanomedicines for increasing of antibiotics action efficiency // III Междисциплин. молодежный научный форум с междунар. участием «Новые материалы». – Москва, 2017. – С. 18–19.
16. Aslanli A.G., Maslova O.V., Senko O.V., Stepanov N.A., Lyagin I.V., Efremenko E.N. Hexahistidine-containing organophosphorus hydrolase as a quorum quenching enzyme used against gram-negative bacteria // Intern. Conference "Biocatalysis-2017: Fundamentals & Applications". - Moscow, 2017. - P. 132–132.