**Влияние наночастиц серебра и их совместного действия с гентамицином на живые системы на основе мутантной термостабильной люциферазы светляков**

***Халаджан Е.А.1,2, Ломакина Г.Ю.1***

*Студентка, 2 курс магистратуры*

*1Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,*

*химический факультет, Москва, Россия*

*2 Московский государственный технический университет имени Н.Э. Баумана, факультет Фундаментальные науки, Москва, Россия*

*E-mail: e.khaladzhan@gmail.com*

Рекомбинантная термостабильная люцифераза светляков имеет большое биоаналитическое значение, представляя собой чувствительный индикатор для изучения активности биологически активных веществ *in vivo* и *in vitro*. При проведении скрининга новых эффективных лекарственных средств требуются быстрые, чувствительные и надежные методы оценки эффективности их действия. Биолюминесцентные тест-системы на основе люциферазы светляков могут быть использованы для быстрого тестирования новых лекарственных форм известных и новых препаратов, позволяющие за 2-4 часа оценить эффективность их действия. Перспективным направлением создания новых лекарственных форм является совместное действие антибиотиков и неорганических наночастиц. Целью данной работы является изучение действия наночастиц серебра (NPAg) и гентамицина (Gent)– антибиотика широкого спектра действия на мутантную люциферазу светляков *L. mingrelica* (GTSLuc) и клетки *E.coli*, продуцирующие люциферазу.

В данной работе использована pH-нечувствительная люцифераза GTSLuc с максимумом биолюминесценции при 550 нм, полученная в нашей лаборатории введением дополнительных мутаций Y35N и S398M в структуру термостабильного мутанта (TSLuc) с λmax=590 нм, что привело к смещению максимума биолюминесценции в зеленую область. Изучены каталитические свойства GTSLuc, рассчитаны значения Km по АТР и люциферину и Vmax. Изучены зависимости активности ферментов от температуры (37-50 0С) при различных концентрациях фермента, рассчитаны константы скорости инактивации ki и энергия активации Ea и проведено сравнение с исходным TSLuc. Рассчитаны активационные параметры ΔH≠ и ΔS≠ в рамках теории активированного комплекса. Показано, что кинетика термоинактивации протекает по первому порядку и практически не зависит от концентрации фермента во всем исследованном диапазоне температур, что свидетельствует об мономолекулярном механизме термоинактивации. Введение дополнительных мутаций незначительно снизили термостабильность фермента, тем не менее при 37 0С GTSLuc проявляет высокую стабильность и может быть использована в тест-системах на основе живых клеток.

Показано, что Gent не оказывает влияния на GTSLuc, в то время как NPAg снижают ферментативную активность. Анализ полных кинетических кривых с применением интегральной формы уравнения скорости позволяет сделать вывод о протекании неконкурентного ингибирования константой ингибирования ki=2.78 mM.

Влияние Gent, NPAg и их совместного действия проведено в широком диапазоне концентраций агентов для определения минимальной бактерицидной концентрации (МБК) на жизнеспособных клетках *E. coli* BL-21 (DE3) Сodon Plus, экспрессирующих GTSLuc, нечувствительной к эффекту снижения внутриклеточного рН в процессе роста клеток. Показано, что присутствие низкой концентрации NPAg (0.1 мкг/мл), не влияющей на функционирование клеток, увеличило эффективность действия Gent в три раза.

*Работа выполнена в рамках госзадания МГУ им. М.В. Ломоносова – номер ЦИТИС 121041500039-8.*