

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



ШНИТКО АЛЕКСЕЙ ВАЛЕРЬЕВИЧ

**ВЛИЯНИЕ ПЛЮРОНИКОВ L121, P123 И F127 НА
КОЛЛОИДНО-ХИМИЧЕСКИЕ, СТРУКТУРНЫЕ И
ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ СВОЙСТВА ЛИЗОЦИМА**

02.00.14 – радиохимия

03.01.04 – биохимия по химическим наукам

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в лаборатории радионуклидов и меченых соединений кафедры радиохимии химического факультета Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова.

Научные руководители:	Чернышева Мария Григорьевна – кандидат химических наук, доцент; Левашов Павел Андреевич – кандидат химических наук.
Официальные оппоненты	Орлова Марина Алексеевна – доктор химических наук, ведущий научный сотрудник кафедры радиохимии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; Королёва Марина Юрьевна – доктор химических наук, доцент, профессор кафедры наноматериалов и нанотехнологий Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева; Ефимова Анна Александровна – кандидат химических наук, доцент, доцент лаборатории нанобиоструктур кафедры высокомолекулярных соединений химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Защита диссертации состоится «2» декабря 2020 г. в 15:00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.02.11 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 10, кафедра радиохимии, аудитория 313.

E-mail: severin@radio.chem.msu.ru (А.В. Северин, учёный секретарь диссертационного совета МГУ.02.11), alshnit@mail.ru (А.В. Шнитко, соискатель).

С диссертацией, а также со сведениями о регистрации участия в удалённом интерактивном режиме в защите можно ознакомиться на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/325244943/>.

Автореферат разослан « » октября 2020 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук

Северин Александр Валерьевич



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Взаимодействие глобулярных белков и блок-сополимеров этиленоксида и пропиленоксида, называемых также плурониками, представляет большой интерес, как с точки зрения фундаментальной науки, так и с точки зрения практического применения. Плуроники нашли применение в медицине и фармакологии в первую очередь как модификаторы поверхностей для предотвращения адсорбции на них белков и носители для направленной доставки лекарственных препаратов. Мицеллы на основе плуроников с солюбилизированными лекарственными препаратами были первыми полимерными мицеллами, использованными для адресной доставки лекарств в экспериментах с животными, и первыми, прошедшими клинические испытания. Относительно недавно было показано, что плуроники выступают в качестве модификаторов биологического ответа. Например, плуроники увеличивают чувствительность к противоопухолевым препаратам некоторых линий раковых клеток, в т.ч. обладающих лекарственной устойчивостью.

В настоящее время существует несколько теорий, объясняющих механизм возникновения повышенной чувствительности раковых клеток к противоопухолевым препаратам в присутствии плуроников: (1) плуроники способствуют накоплению противораковых препаратов внутри клетки за счёт адсорбции на клеточных мембранах, что препятствует функционированию трансмембранных эффлюкс-транспортёров; (2) плуроники проникают внутрь клеточных митохондрий, подавляя митохондриальное дыхание и синтез АТФ; (3) взаимодействие плуроников с митохондриями способствует увеличению концентрации в клетке активных форм кислорода; (4) связывание плуроников с митохондриями приводит к десорбции с поверхности наружной мембраны митохондрии цитохрома C, белка, запускающего процесс апоптоза. В связи с этим, исследование особенностей взаимодействия плуроников с глобулярными белками, их влияния на структуру и каталитическую активность ферментов, представляется актуальной задачей.

Особый интерес вызывает самоорганизация белков и плуроников на межфазных границах. Использование радионуклидных методов для исследования таких систем позволяет получить информацию не только о количестве вещества в поверхностном слое, но и выявить его структурные особенности и определить характер межмолекулярных взаимодействий. Все это позволяет сделать **метод тритиевого зонда**, основанный на применении реакций атомарного трития и меченных тритием соединений. Совокупность радиохимических и классических спектрометрических подходов позволят выявить особенности самоорганизации лизоцима и плуроников на межфазных границах жидкость-жидкость, жидкость-газ, а также в объёме раствора.

Степень разработанности темы. Данные литературы о взаимодействии плуроников с белками носят фрагментарный характер. Практически нет информации о наличии/отсутствии и характере межмолекулярных взаимодействий между белками и плурониками, влиянии плуроников на адсорбцию и распределение белков в двухфазной системе. Неизвестна роль полиэтиленоксидных и полипропиленоксидных блоков во взаимодействии плуроников с белками. Вместе с тем накоплен большой материал о взаимодействии с белками полиэтиленоксида (ПЭГ), представленный в литературном обзоре данной диссертации.

Цель работы: определение влияния плуроников L121, P123 и F127 на коллоидно-химические, структурные и ферментативные свойства глобулярного белка лизоцима куриного яйца. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Определение коэффициентов распределения лизоцима и неионогенных поверхностно-активных веществ (ПАВ) в системе водный раствор/*n*-ксилол, выбранной в качестве модели двухфазной системы;
2. Исследование взаимного влияния лизоцима и неионогенных ПАВ при конкурентной адсорбции на межфазных границах водный раствор/*n*-ксилол и водный раствор/воздух с помощью методов сцинтиллирующей фазы и тензиометрии;
3. Изучение взаимодействий плуроников с лизоцимом по характеру распределения тритиевой метки по аминокислотным остаткам белка;
4. Определение влияния плуроников на структуру белка по данным молекулярной спектроскопии (УФ-спектроскопии, спектроскопии кругового дихроизма, флуориметрии);
5. Определение влияния плуроников на каталитическую активность лизоцима.

Научная новизна работы заключается в положениях, выносимых на защиту:

1. Показано образование посредством водородных и ван-дер-ваальсовых взаимодействий между цепями полиэтиленоксида (ПЭО) и аминокислотными остатками устойчивых комплексов между лизоцимом и неионогенными ПАВ (плурониками L121, P123 и F127, а также Бридж-35) на межфазных границах жидкость/жидкость и жидкость/воздух, а также в объеме водной фазы при концентрации плуроников ниже критической концентрации мицеллообразования (ККМ).
2. Показано неполное замещение лизоцима из поверхностного слоя молекулами плуроника при концентрациях ПАВ ниже ККМ. В области ККМ и выше нее замещение также составляло 40-75%. В составе смешанного адсорбционного слоя молекула белка изменяла пространственную ориентацию по сравнению с адсорбционным слоем, образованным только молекулами лизоцима.

3. Определены параметры межмолекулярного взаимодействия между лизоцимом и неионогенными ПАВ на границе раздела фаз водный раствор/*n*-ксилол, с помощью которых был определён состав смешанного адсорбционного слоя на границе с воздухом.

4. Найдено, что смешанный адсорбционный слой неионогенное ПАВ-лизоцим более проницаем для атомарного трития по сравнению с адсорбционным слоем белка.

5. Показано, что образование комплексов неионогенное ПАВ-лизоцим не влияет на вторичную структуру белка, но уменьшает бактериолитическую активность лизоцима по отношению к *Micrococcus luteus* и приводит к отклонению от кинетики Михаэлиса–Ментен процесса гидролиза клеточной стенки *M. luteus* под действием лизоцима.

Практическая значимость. Предложенный подход может служить основой для расширенного применения радиохимических методов при проведении физико-химических и биохимических исследований. Выявленные закономерности взаимодействия глобулярных белков и плуроников на границах водный раствор/органическая жидкость и водный раствор/воздух, а также влияние плуроников на структуру и каталитические свойства белков расширяют наше представление о функционировании комплексов на основе плуроников в живых организмах. Полученные данные могут быть использованы при разработке лекарственных препаратов на основе плуроников, носителей для адресной доставки лекарственных препаратов, модификаторов поверхностей, антибактериальных покрытий.

Личный вклад автора состоял в анализе научной литературы и написании обзора; проведении экспериментов по исследованию поведения лизоцима и неионогенных ПАВ в системе водный раствор/*n*-ксилол; измерению ферментативной активности и обработке полученных результатов. Работы по получению и очистке меченых соединений выполнены совместно с к.х.н. Бадуним Г.А. Эксперименты по определению поверхностного натяжения проведены совместно с к.х.н. Соболевой О.А. Анализ распределения трития в аминокислотных остатках лизоцима проведён совместно с к.х.н. Ксенофонтовым А.Л. (НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова). Получение спектров кругового дихроизма проведено совместно с к. ф.-м. н. Арутюняном А.М. (НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова).

Настоящая работа является частью исследований, связанных с получением, анализом и применением меченных тритием веществ, выполненных при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации (МК-4881.2016.3) и Российского Фонда Фундаментальных Исследований (в рамках проекта 18-33-20147-мол_а_вед).

Апробация работы. Основные результаты настоящей работы были представлены в виде устных и стендовых докладов на Международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 2016,

2017, 2018, 2019), Всероссийской Каргинской конференции «Полимеры» (Москва, 2017; Тверь, 2020), Международной конференции для молодых учёных «Химическая технология функциональных наноматериалов» (Москва, 2017), IX Российской конференции с международным участием «Радиохимия» (Санкт-Петербург, 2018), Школе-конференции с международным участием для молодых учёных «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (Казань, 2019), X Международной конференции «Химическая термодинамика и кинетика» (Великий Новгород, 2020), XXI Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Санкт-Петербург, 2019), XVI International Conference on Surface Forces, (Казань, 2018) и VII International Colloids Conference, (Сиджес, 2017).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи, в т.ч. статьи в международных рецензируемых научных изданиях с импакт-фактором, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus) и рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных работ, а также 13 тезисов докладов.

Объём и структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания используемых в работе материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 173 страницах машинописного текста и содержит 36 рисунков и 10 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 409 источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** приведено обоснование актуальности диссертационной работы, сформулированы поставленные цели и задач, указаны научная новизна и практическая значимость работы.

Первая глава посвящена обзору литературы и состоит из двух частей. Первая часть посвящена взаимодействию неионогенных ПАВ с белками: влиянию неионогенных ПАВ на структуру и каталитические свойства белков. Вторая часть посвящена радиохимическому подходу при изучении взаимодействия лигандов и белков, получению меченных тритием белков и лигандов, методам регистрации β -излучения трития.

Вторая глава содержит описание экспериментальной части. Описаны методики получения меченных тритием неионогенных ПАВ и лизоцима, исследования конкурентной адсорбции лизоцима и неионогенных ПАВ на межфазной границе жидкость/жидкость с помощью метода сцинтиллирующей фазы. Представлена методика обработки атомами трития смешанных адсорбционных слоёв с последующим анализом распределения трития по аминокислотным остаткам белка. Также приведены

методики измерения поверхностного натяжения на границе раздела жидкость/жидкость и жидкость/воздух с помощью метода висящей капли; получения УФ-спектров, спектров флуоресценции, спектров кругового дихроизма и малоуглового рентгеновского рассеяния; определения ферментативной активности лизоцима по отношению к *M. luteus*.

В третьей главе приведены результаты и их обсуждение.

Получены характеристики плуроников: (1) молекулярно-массовое распределение, определённое методом гель-проникающей хроматографии, подтвердило соответствие состава препаратов и молекулярной массы плуроников заявленным характеристикам (таблица 1); (2) значения критической концентрации мицеллообразования плуроников в солевом фосфатном буфере (PBS, pH 7,3±0,1, $I = 0,16$ М) при 25°C, которые составили 2,7, 1,8 и 1,3 мкМ для F127, P123 и L121, соответственно. В качестве низкомолекулярного ПАВ, как «вещества сравнения» выбран полиоксиэтиленлауриновый эфир Бридж-35, значение ККМ которого в PBS составило 70 мкМ.

Таблица 1. Структура, средневесовая молекулярная масса M_w и гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ) исследованных неионогенных ПАВ.

ПАВ	Структура	M_w , Да	ГЛБ*
Бридж-35	$C_{12}H_{25}EO_{24}$	1221	16
Плюроник L121	$EO_5PO_{68}EO_5$	4400	1 – 7
Плюроник P123	$EO_{20}PO_{70}EO_{20}$	5700	7 – 9
Плюроник F127	$EO_{100}PO_{65}EO_{100}$	12600	22
(*) Значения ГЛБ по данным производителя			

Меченные тритием лизоцим, Бридж-35 и плуроник P123 получали с помощью метода термической активации трития. Радиохимический выход меченых соединений составил 35%, 48%, 17% для лизоцима, плуроника P123 и Бридж-35, соответственно. Удельная радиоактивность полученных меченых соединений составляла 0,3 ТБк/ммоль для лизоцима, 1 ТБк/ммоль для плуроника P123, 0,14 ТБк/ммоль для Бридж-35.

С помощью метода сцинтиллирующей фазы и метода висящей капли изучено взаимное влияние лизоцима и неионогенных ПАВ, на примере плуроника P123 и Бридж-35, при конкурентной адсорбции на межфазной границе водный раствор/*n*-ксилон и водный раствор воздух. В таблице 2 приведены коэффициенты распределения лизоцима, P123 и Бридж-35 и их смесей. Лизоцим не влияет на распределение P123 и Бридж-35. В присутствии неионогенных ПАВ происходит увеличение коэффициента распределения белка, что указывает на изменения в его структуре или образование

комплексов. Значения коэффициента распределения неионогенных ПАВ превосходят на два порядка величину коэффициента распределения лизоцима, поэтому связывание неионогенными ПАВ с белком облегчает переход лизоцима в органическую фазу.

Таблица 2. Распределение лизоцима и неионогенных ПАВ в системе вода/*n*-ксилол плуроника по отдельности и в составе смеси состава лизоцим-неионогенное ПАВ

Тип водной фазы	Состав раствора	Коэффициент распределения		
		Лизоцим	Плюроник Р123	Бридж-35
Вода	индивидуальное вещество	$(1,2 \pm 0,5) \times 10^{-3}$	$0,13 \pm 0,07$	-
	смесь	$(1,3 \pm 0,5) \times 10^{-3}$	$0,21 \pm 0,06$	-
К,Na-фосфатный буфер (0,018 М)	индивидуальное вещество	$(5,5 \pm 0,6) \times 10^{-4}$	$0,15 \pm 0,07$	-
	Смесь	$(7,8 \pm 0,8) \times 10^{-4}$	$0,11 \pm 0,02$	-
PBS	индивидуальное вещество	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^{-3}$	$0,28 \pm 0,06$	$0,27 \pm 0,01$
	Смесь	$(7,8 \pm 0,8) \times 10^{-4}$ $(1,5 \pm 0,2) \times 10^{-3(*)}$	$0,30 \pm 0,08$	$0,24 \pm 0,02$
Na-фосфатный буфер (0,05 М)	индивидуальное вещество	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^{-3}$	-	$0,26 \pm 0,01$
	Смесь	$(1,5 \pm 0,2) \times 10^{-3(*)}$	-	$0,22 \pm 0,02$
(*) Смесь с Бридж-35				

В присутствии неионогенных ПАВ происходит уменьшение поверхностной концентрации белка на межфазной границе водный раствор/*n*-ксилол, что показано на примере плуроника Р123 и Бридж-35 (рис.1). При этом адсорбция Бридж-35 и плуроника Р123 возрастает с увеличением концентрации ПАВ и не зависит от присутствия лизоцима в системе (рис. 2). Следует отметить, что эффект не зависит от ионной силы раствора.

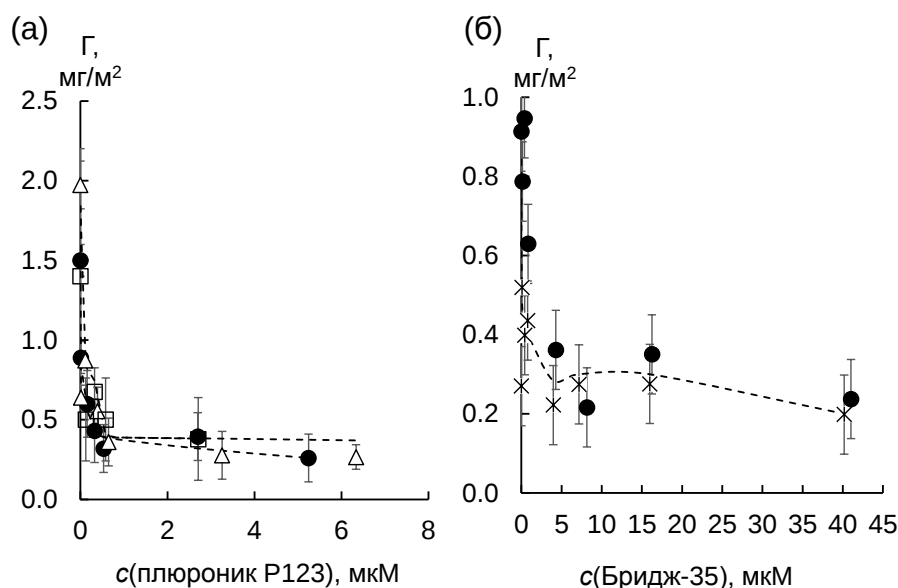


Рис.1. Адсорбция лизоцима (0,1 г/л) на межфазной границе водный раствор/*n*-ксилол в присутствии P123 (а) и Бридж-35 (б) в PBS (●), 0,018 М К,Na-фосфатном буфере (Δ), 0,0055 М Na-фосфатном буфере (×), воде (■).

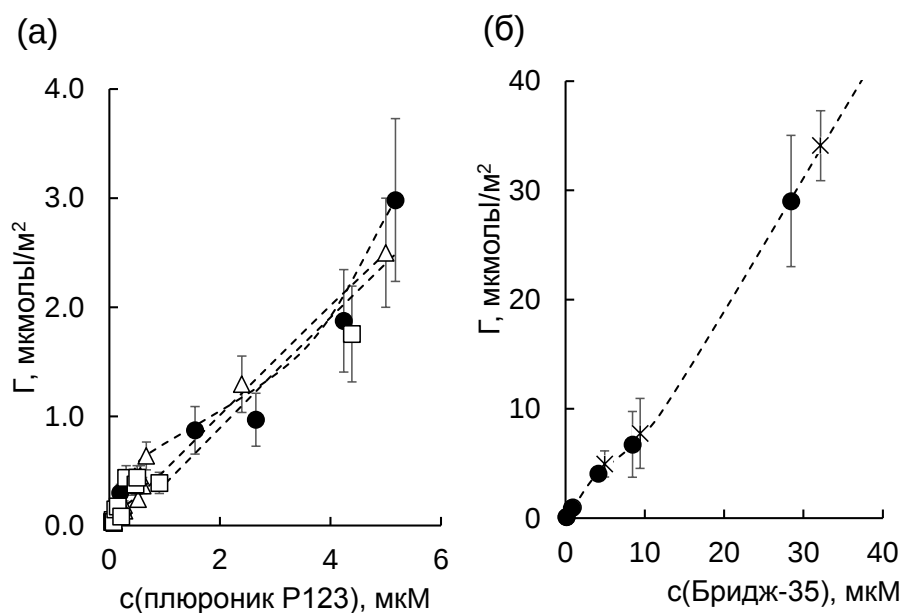


Рис. 2. Адсорбция плуроника P123 (а) и Бридж-35 (б) в присутствии 0,1 г/л лизоцима на границе вода/*n*-ксилол в PBS (●), 0,018 М К,Na-фосфатном буфере (Δ), 0,0055 М Na-фосфатном буфере (×), воде (■).

На рис. 3 приведена зависимость поверхностного натяжения смесей плуроник P123-лизоцим и Бридж-35-лизоцим на межфазной границе с *n*-ксилолом от концентрации неионогенного ПАВ, полученная с помощью метода висящей капли.

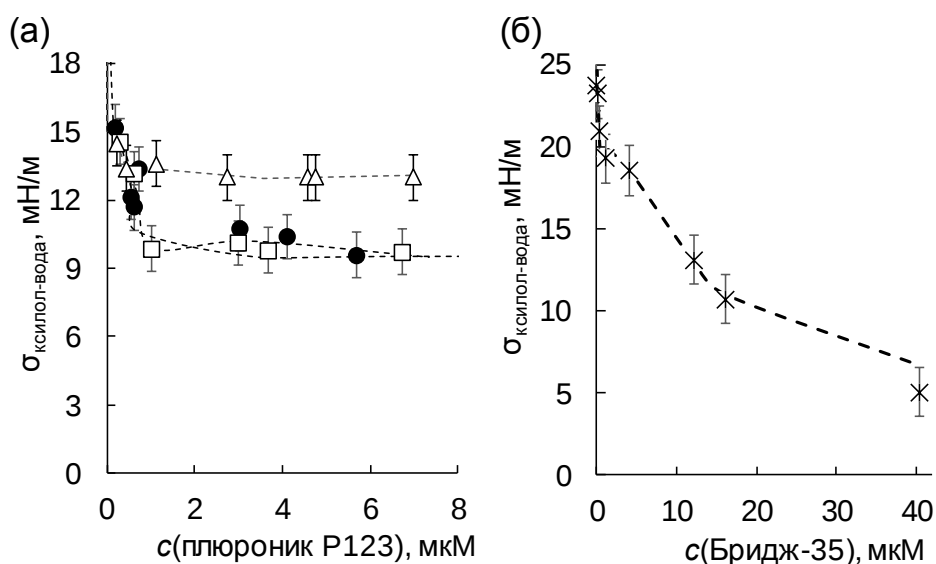


Рис. 3. Поверхностное натяжение растворов плюроника P123 (а) и Бридж-35 (б) в присутствии 0,1 г/л лизоцима на границе водный раствор/*n*-кислол в PBS (●), 0,018 М К,Na-фосфатном буфере (Δ), 0,0055 М Na-фосфатном буфере (×), воде (■).

Для определения параметров межмолекулярного взаимодействия между белком и неионогенными ПАВ в поверхностном слое была использована модель, описанная в работе [1] для изотерм двумерного давления:

$$-\frac{\Pi w_0}{RT} = \ln(1 - \theta_p - \theta_s) + \theta_p \left(1 - \frac{w_0}{w}\right) + a_p \theta_p^2 + a_s \theta_s^2 + 2a_{ps} \theta_p \theta_s \quad (1)$$

Где Π – двумерное давление, R – универсальная газовая постоянная, T – температура, a – параметр межмолекулярного взаимодействия молекул в адсорбционном слое (индексы p и s относятся к белку и ПАВ соответственно), $\theta = \Gamma w$ – степень заполнения слоя молекулами.

В данной работе параметр, описывающий заполнение смешанного адсорбционного слоя тем или иным компонентом, не подбирали теоретически, а использовали экспериментальное значение, полученное с помощью метода сцинтиллирующей фазы, что позволило существенно упростить и уточнить расчет. Параметры межмолекулярного взаимодействия, которые подбирали с помощью метода наименьших квадратов. Полученные значения приведены в таблице 3, а результаты расчёта показаны пунктирными линиями на рис.1-3.

Поскольку адсорбционные слои на границе раздела жидкость/жидкость и жидкость/воздух структурно идентичны то для описания изотерм поверхностного натяжения соответствующих смесей на границе водный раствор/воздух использовали полученные параметры межмолекулярного взаимодействия. Такой подход позволил определить состав смешанного адсорбционного слоя лизоцим-неионогенное ПАВ на границе раздела фаз водный раствор/воздух (рис. 4).

Таблица 3. Параметры межмолекулярного взаимодействия между лизоцимом и плюронином Р123, лизоцимом и Бридж-35.

Параметр	Значение	Параметр	Значение	Параметр	Значение
лизоцим		Бридж-35		Плюроник Р123	
w_0	$4,95 \times 10^5$ м ² /моль	w_s	$4,2 \times 10^5$ м ² /моль	w_s	$2,95 \times 10^8$ м ² /моль
w_{min}	$7,72 \times 10^6$ м ² /моль	a_s	2,75	a_s	1,3
w_{max}	$2,54 \times 10^7$ м ² /моль	a_{ps}	0	a_{ps}	0
a_p	0,69	b_s	6×10^5 м ³ /моль	b_s	$4,9 \times 10^5$ м ³ /моль
b_p	$1,0 \times 10^4$ м ³ /моль				

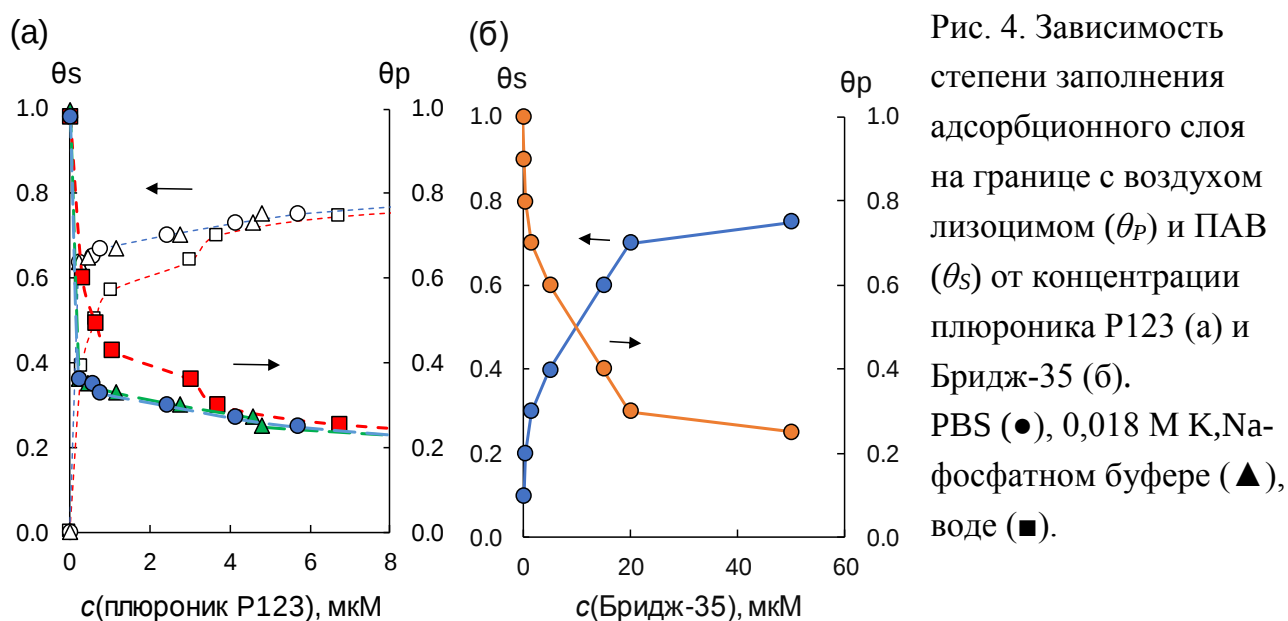


Рис. 4. Зависимость степени заполнения адсорбционного слоя на границе с воздухом лизоцимом (θ_p) и ПАВ (θ_s) от концентрации плуроника Р123 (а) и Бридж-35 (б). PBS (●), 0,018 М К,Na-фосфатном буфере (▲), воде (■).

Из полученных результатов следует, что лизоцим не полностью вытесняется из адсорбционного слоя молекулами ПАВ. Отметим, что неионогенные ПАВ вытесняют лизоцим из адсорбционного слоя независимо от ионной силы раствора или присутствия различных анионов, что предполагает связывание белка с молекулами плуроников или Бридж-35 за счёт ван-дер-ваальсовых и водородных взаимодействий. Способность вытеснять лизоцим с границы раздела фаз выше у плуроника Р123 по сравнению с Бридж-35, но значения адсорбции лизоцима в присутствии области высоких концентраций плуроника Р123 и Бридж-35 одинаковы при том, что плуроник Р123 и Бридж-35 различаются по структуре и длине гидрофобных фрагментов, имея одинаковые по длине цепи ПЭО, что указывает на ключевую роль цепей ПЭО во взаимодействии неионогенных ПАВ и белка. Следующим этапом было изучение влияния длины ПЭО цепи на адсорбцию лизоцима. Для этого использовали плуроники F127, Р123 и L121, различающиеся по длине цепи ПЭО. Эксперименты проводили при концентрации белка 0,5 г/л.

С помощью метода сцинтиллирующей фазы показано, что плюроники L121, F127, P123 в разной степени вытесняют лизоцим с границы раздела фаз PBS/*n*-ксилол: максимальное вытеснение белка из адсорбционного слоя составило 40%, 60% и 75% для L121, F127, P123 соответственно. Таким образом плюроники P123 и F127, которые обладают более высоким значением ГЛБ, показали большее вытеснение лизоцима из поверхностного слоя по сравнению с L121. Отметим, что существенная часть белка остаётся в адсорбционном слое, что подтверждает то, что лизоцим присутствует на границе раздела фаз в виде комплекса с плюрониками.

Поверхностное натяжение в системах лизоцим-плюроник в области высоких концентраций плюроника не зависит от присутствия лизоцима, в области низких концентраций плюроника присутствие лизоцима приводит к уменьшению поверхностного натяжения до значений, характерных для свободных плюроников при концентрации выше ККМ. Поверхностное натяжение достигает постоянных значений для смесей лизоцим-плюроник при концентрациях плюроника 0,96, 0,88 и 0,52 мкМ для F127, P123 и L121 соответственно, что в 2,8, 2,0 и 2,5 раза меньше соответствующих значений ККМ плюроников.

Для изучения структурных особенностей комплексов лизоцим-плюроник в смешанном адсорбционном слое провели обработку атомарным тритием адсорбционных слоёв, образованных на границе с воздухом в течение 30 минут (за это время поверхностное натяжение достигает постоянного значения, что подтверждает образование адсорбционного слоя). Результаты анализа распределения тритиевой метки по аминокислотным остаткам лизоцима после тотального гидролиза показаны на рис. 5-9.

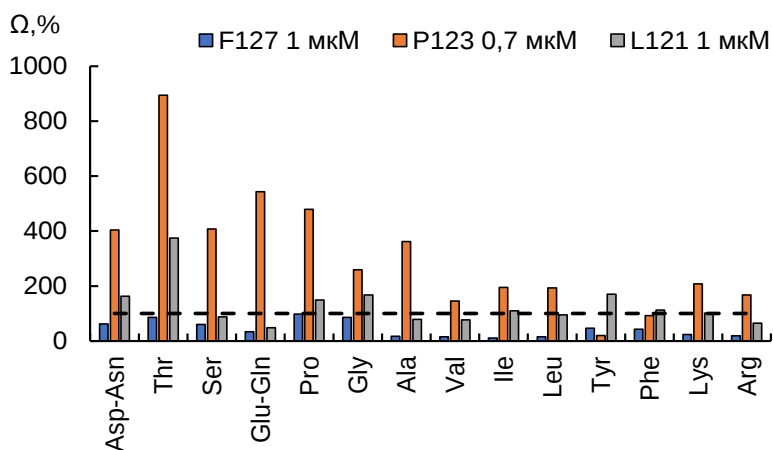


Рис. 5. Относительное изменение радиоактивности аминокислот в составе смешанного адсорбционного слоя лизоцима с плюрониками (за 100 % принята радиоактивность в отсутствие ПАВ).

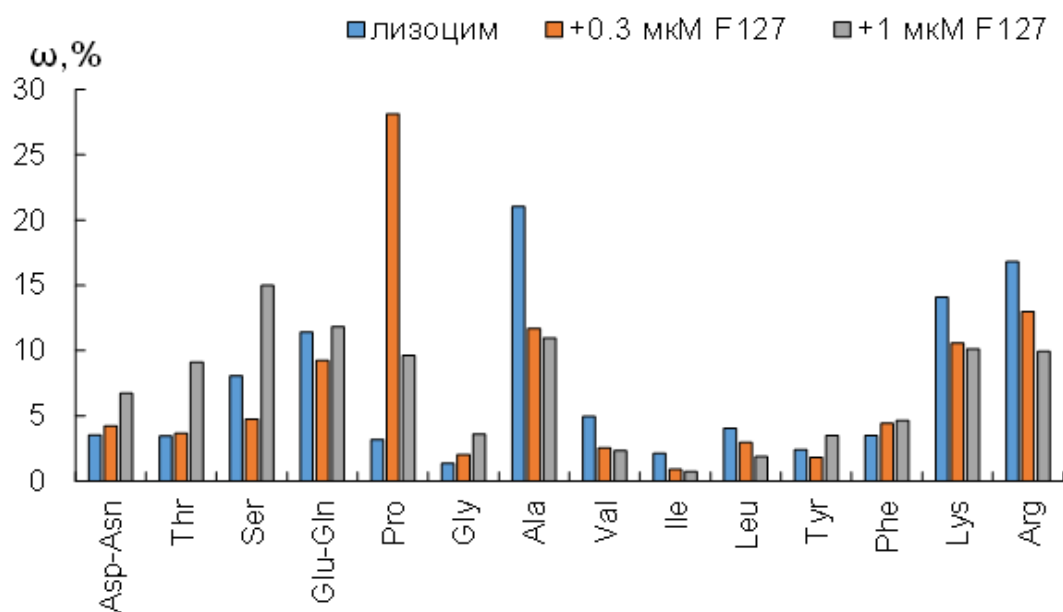


Рис. 6. Распределение трития в аминокислотных остатках лизоцима в присутствии плуроника F127.

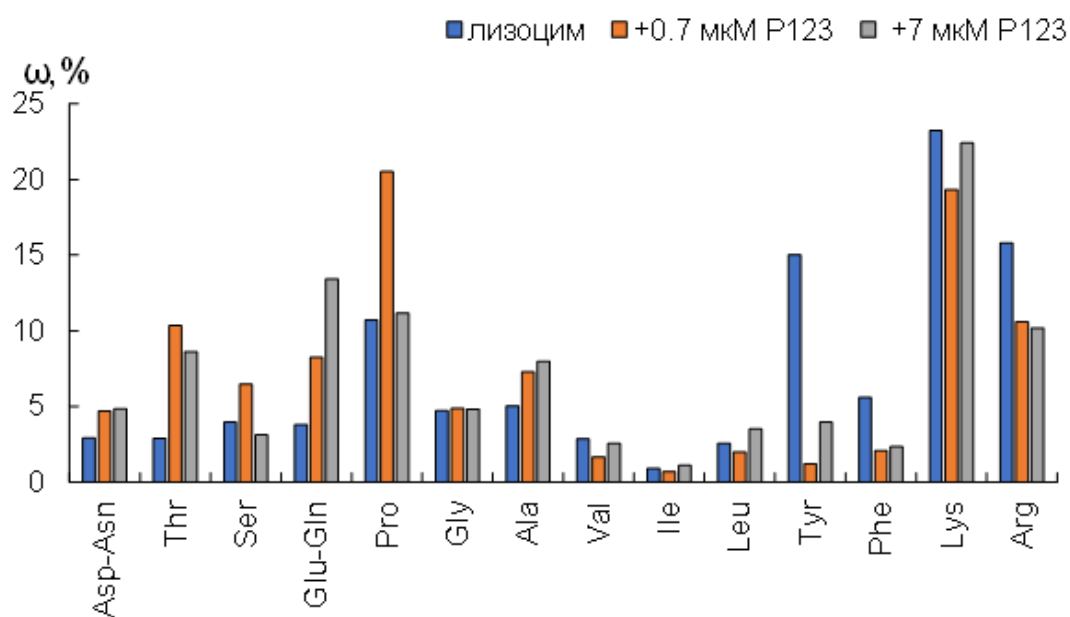


Рис. 7. Распределение трития в аминокислотных остатках лизоцима в присутствии плуроника P123.

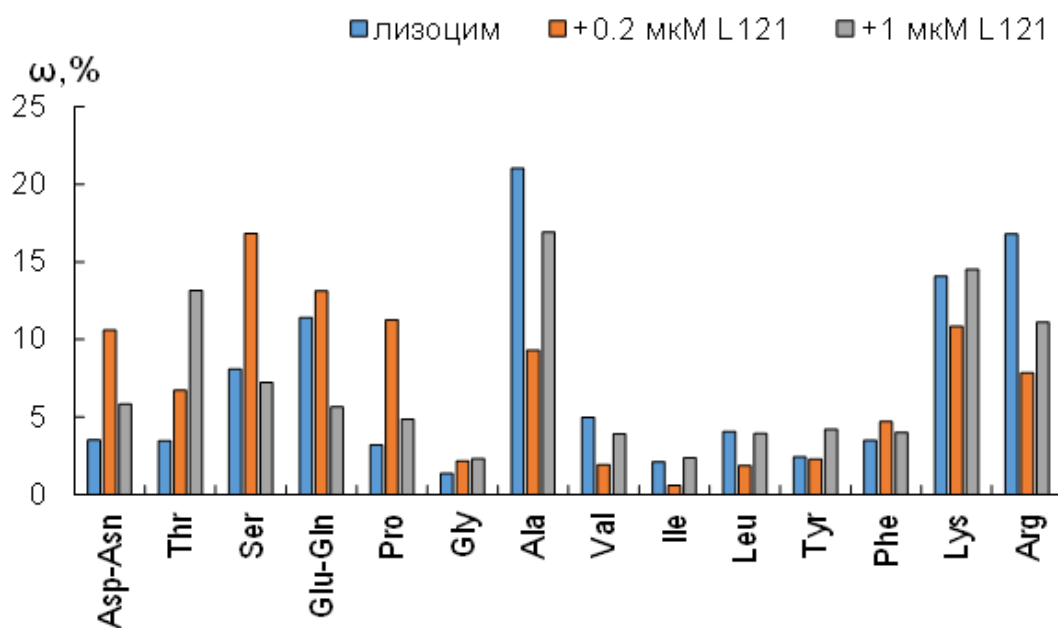


Рис. 8. Распределение трития в аминокислотных остатках лизоцима в присутствии плуроника L121.

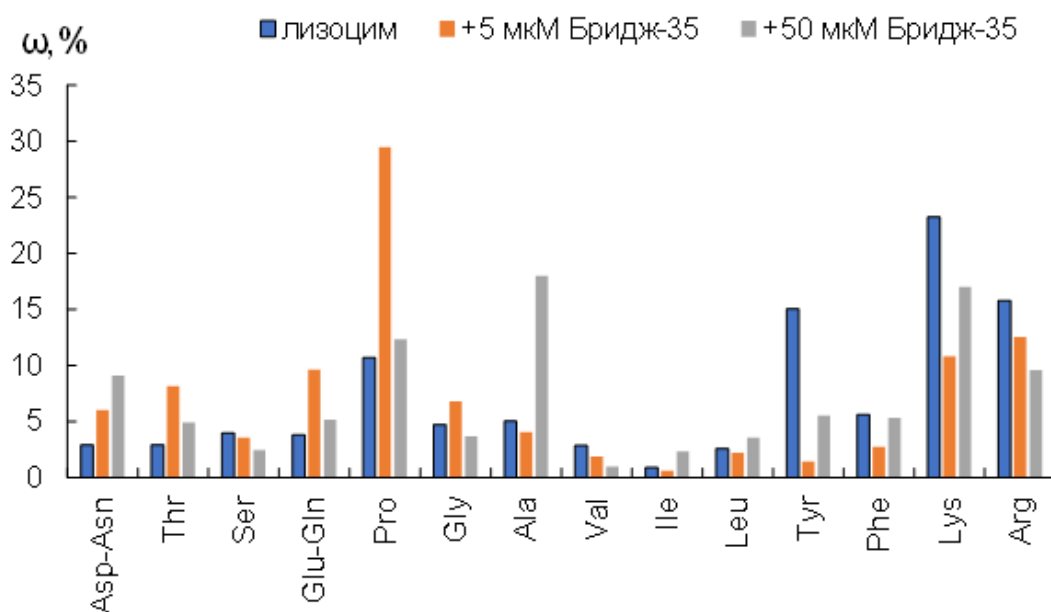


Рис. 9. Распределение трития в аминокислотных остатках лизоцима в присутствии Бридж-35.

В присутствии неионогенных ПАВ радиоактивность аминокислотных остатков и белка в целом как уменьшается, так и увеличивается в зависимости от ПАВ и его концентрации. Учитывая специфику взаимодействия атомарного трития со структурно организованными адсорбционными слоями и бислойными липидными мембранами [2], а также свойство ПЭГ вытеснять молекулы растворителя из микроокружения белков [3], мы можем сделать вывод о том, что наблюдаемое увеличение удельной

радиоактивности аминокислотных остатков и белка в целом в присутствии плуроников обусловлено большей проницаемостью для трития образованных плурониками адсорбционных слоёв по сравнению с водным окружением белка в отсутствии плуроников.

Поскольку в структуре лизоцима белка куриного яйца всего три аминокислотных остатка фенилаланина и два аминокислотных остатка пролина, которые расположены на противоположных сторонах глобулы, то отношение удельных радиоактивностей этих остатков (A_{Phe}/A_{Pro}) позволяет определять пространственную ориентацию глобулы лизоцима в поверхностном слое. Отношение A_{Phe}/A_{Pro} представлено в таблице 4.

Отношение A_{Phe}/A_{Pro} становится меньше единицы для всех смесей и уменьшается с увеличением числа этиленоксидных звеньев, в то время как для индивидуального лизоцима $A_{Phe}/A_{Pro} = 1,3$, то есть для адсорбционного слоя на поверхности вода/воздух при концентрации белка 0,5 мг/мл, молекулы лизоцима ориентированы таким образом, что фенилаланин направлен в сторону границы раздела фаз. Добавление неионогенных ПАВ приводит к изменению структуры адсорбционного слоя: происходит не только вытеснение белка молекулами неионогенного ПАВ, но и изменение пространственной ориентации белка (или белка в составе комплекса), таким образом, что остатки пролина направлены к границе раздела.

Таблица 4. Отношение удельной радиоактивности аминокислотных остатков фенилаланина и пролина (A_{Phe}/A_{Pro}).

Состав смеси	A_{Phe}/A_{Pro}
лизоцим	1,3
+ Бридж-35 (5×10^{-6} М)	0,1
+ Бридж-35 (5×10^{-6} М)	0,4
+ плуроник P123 (7×10^{-7} М)	0,1
+ плуроник P123 (7×10^{-6} М)	0,4
+ плуроник F127 (3×10^{-7} М)	0,2
+ плуроник F127 (1×10^{-6} М)	0,5
+ плуроник L121 (2×10^{-7} М)	0,4
+ плуроник L121 (1×10^{-6} М)	0,8

Для выявления влияния неионогенных ПАВ на структурные особенности лизоцима в объёме водного раствора проведены анализы с помощью методов молекулярной спектроскопии. С помощью спектроскопии кругового дихроизма показано отсутствие изменений во вторичной структуре лизоцима в присутствии неионогенных ПАВ. Результаты малоуглового рентгеновского рассеяния показали

отсутствие агрегатов в смесях и хорошее соответствие полученных данных структуре 6LYZ (Protein Data Bank), которую использовали при молекулярном докинге.

Спектрофотометрический анализ (рис. 10) показал небольшое увеличение (на 5–7%) оптического поглощения лизоцима при длине волны 280 нм в присутствии плуроников L121 и P123, и эффект не зависел от концентрации ПАВ. В присутствии высоких концентраций плуроника F127 показано увеличение оптического поглощения более чем на 50%.

Полученные результаты свидетельствуют об изменении плотности микроокружения ароматических кислот (увеличении экспозиции в объём растворителя) в результате взаимодействия лизоцима с неионогенными ПАВ.

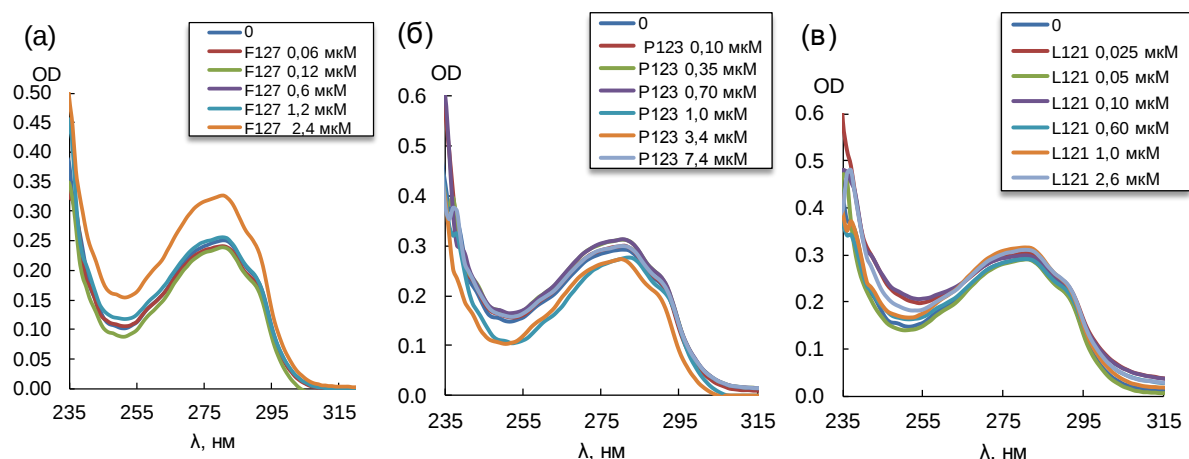


Рис.10. Спектры оптического поглощения лизоцима (0,1 г/л) в присутствии плуроников F127 (а), P123 (б) и L121 (с).

Флуоресцентный анализ показал возрастание интенсивности флуоресценции триптофана в присутствии плуроников (рис. 11).

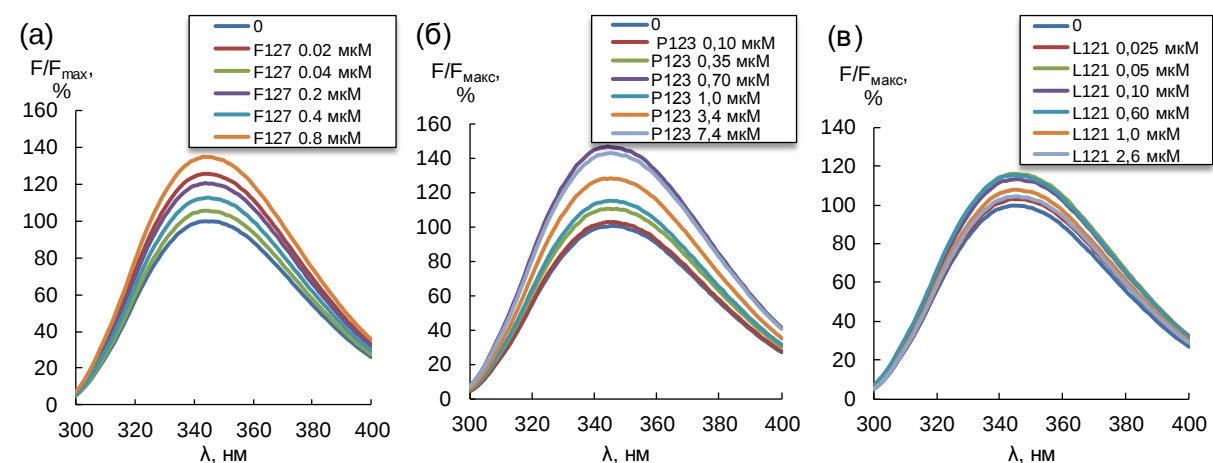


Рис. 11. Спектры флуоресценции при длине волны возбуждающего света 280 нм лизоцима (0,1 г/л) в присутствии плуроников F127 (а), P123 (б) и L121 (в).

В присутствии плуроников P123 и F127 наблюдается увеличение флуоресценции более чем на 40%, в присутствии плуроника L121 – на 20%. Таким образом показано, что связывание плуроника с лизоцимом приводит к изменению микроокружения остатков флуорофоров с сохранением структуры белка даже при концентрации, близкой к критической концентрации мицеллообразования. Этот результат подтверждает высказанное ранее предположение о вытеснении воды в окружении белка в присутствии плуроников и наличие неспецифических взаимодействиях между цепями ПЭО и аминокислотными остатками белка.

Данные флуоресценции были использованы для вычисления константы ассоциации, характеризующей процесс формирования комплекса белок-лиганд 1:1, согласно модели, приведённой в работе [4]. Полученные значения константы связывания лизоцима с плурониками F127, P123 и L121 составляют $(6,7 \pm 3,4) \times 10^6$, $(6,7 \pm 3,4) \times 10^6$, $(1,1 \pm 0,9) \times 10^6$ л/моль, соответственно. Свободная энергия Гиббса, вычисленная из значений константы равновесия, составляет -39, -33 и -34 кДж/моль для плуроников F127, P123 и L121, соответственно.

Увеличение интенсивности флуоресценции указывает на изменение пространственного микроокружения остатков триптофана, которые принимают участие в связывании лизоцима с пептидогликаном клеточных стенок грамположительных бактерий. Поэтому следующим этапом исследования было определение влияния неионогенных ПАВ на ферментативную активность лизоцима по отношению к *M.luteus*. Исследование проводили в области линейной зависимости скорости гидролиза клеток от концентрации лизоцима, т.е. ферментативный процесс является скоростью-лимитирующей стадией лизиса. Показано, что после предварительной инкубации в течение 24 ч в присутствии неионогенных ПАВ происходит уменьшение бактериолитической активности лизоцима более чем в два раза (рис. 12).

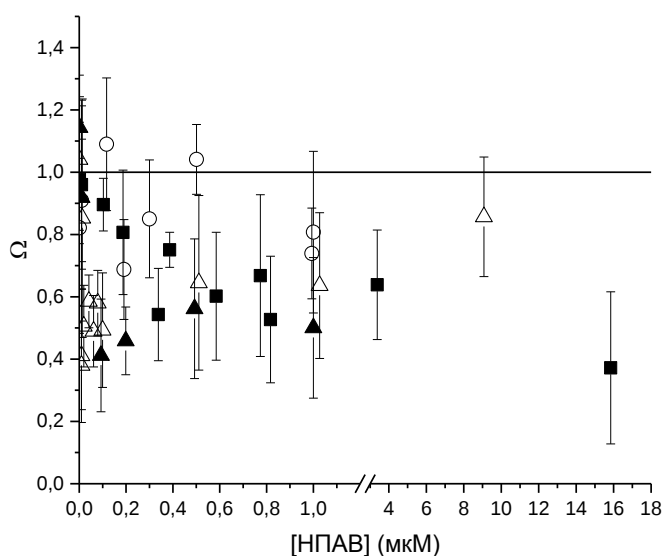


Рис. 12. Зависимость относительной активности лизоцима от концентрации ПАВ в присутствии плуроников P123 (■), F127 (○) и L121 (▲), а также Бидж-35 (Δ). Прямая линия показывает значение бактериолитической активности индивидуального лизоцима

Наблюдаемый эффект уменьшения бактериолитической активности увеличивается в ряду $F127 < P123 < L121 \approx \text{Бридж-35}$, что позволяет предположить связывание неионогенных ПАВ с аминокислотами, расположенными во внутренней полости фермента и/или у входа во внутреннюю полость фермента, что создаёт стерические затруднения для взаимодействия субстрата и активного центра. Наибольший эффект оказывает плуроник L121 с самой короткой по длине цепью ПЭО, что может быть объяснено тем, что короткие цепи ПЭО легче проникают во внутреннюю полость фермента. Восстановление ферментативной активности при увеличении концентрации плуроника L121 может быть связано с образованием плуроником L121 агрегатов при увеличении концентрации и уменьшением взаимодействия с белком.

С помощью меченого тритием плуроника P123 была показана его адсорбция на *M.luteus*, которая не зависела от присутствия лизоцима в растворе. Однако сами плуроники не влияли на лизис клеток. Связывание плуроников с субстратом может быть дополнительной причиной уменьшения ферментативной активности лизоцима. Можно предположить, что на уменьшение ферментативной активности также оказывает влияние вытеснение молекул воды плурониками, тем более что молекулы воды участвуют в каталитической реакции.

На примере плуроника P123 исследовано влияние плуроника на кинетические параметры ферментативной реакции. Показано, что скорость реакции, катализируемой лизоцимом в отсутствие плуроника, изменяется согласно гиперболической зависимости Михаэлиса—Ментен, а полученные значения кинетических параметров $K_M = 0,22 \text{ OE}$, $V_M = 1,3 \times 10^{-3} \text{ OE/с}$ согласуются с данными литературы и хорошо коррелируют с экспериментальными данными ($r = 0,970$). В присутствии плуроника после предварительной инкубации в течение 24 ч наблюдалось отклонение кинетики ферментативной реакции от кинетики Михаэлиса—Ментен (рис. 13). В области концентраций плуроника P123 от 1 до 10 мМ наблюдался «перегиб» при одних и тех же концентрациях субстрата.

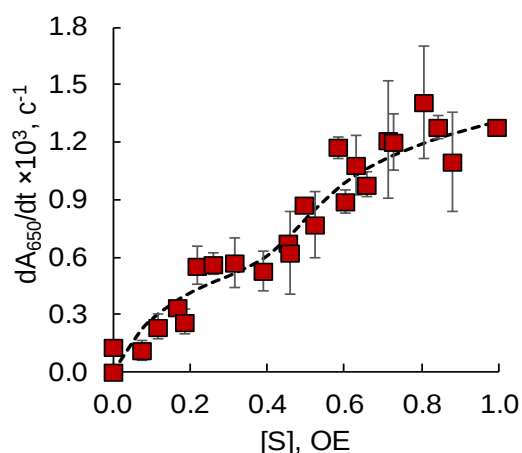


Рис. 13. Зависимость скорости лизиса клеток *M. luteus* при 37 °С от концентрации субстрата в присутствии 1 мкМ плуроника P123. Пунктирной линией показан результат расчёта ферментативной активности согласно модели, приведённой ниже.

Объяснить такой результат позволяет предположение, что связывание фермента E_0 с плюронином приводит к образованию комплекса лизоцим-плюроник E_1 , а последующее связывание комплекса E_1 с субстратом приводит к образованию комплекса состава белок-субстрат-плюроник E_2 , в результате чего в системе присутствует два комплекса E_1 и E_2 , которые отличаются каталитическими свойствами. Соотношение комплексов определяется концентрацией субстрата отношениями вида:

$$g_1 = \frac{[E]}{[E]_0} = \frac{K_D}{K_D + [S]_0^n} \quad (2)$$

$$g_2 = 1 - g_1 = \frac{[ES_n]}{[E]_0} = \frac{[S]_0^n}{K_D + [S]_0^n} \quad (3)$$

где K_D – константа диссоциации комплекса фермент-субстратного комплекса ES_n . Суммарную скорость ферментативной реакции можно представить с помощью модели:

$$v = V_M^{(1)} g_1 \frac{[S]_0}{K_M^{(1)} + [S]_0} + V_M^{(2)} g_2 \frac{[S]_0}{K_M^{(2)} + [S]_0} = g_1 v_1 + g_2 v_2 \quad (4)$$

где $K_M^{(i)}$ и $V_M^{(i)}$ – константа Михаэлиса-Ментен и предельная скорость i -ой формы фермента.

В области малых концентраций субстрата значения субстрата $[S]_0^n \ll K$, в этом случае $g_1 \approx K/K = 1$, и $g_2 = 1 - g_1 = 0$. В этом случае скорость ферментативной реакции сводится к уравнению Михаэлиса-Ментен. Методом линеаризации для начального участка были получены значения $K_M^{(1)}$ и $V_M^{(1)}$, которые затем были использованы, чтобы по методу наименьших квадратов подобрать значения $K_M^{(2)}$, $V_M^{(2)}$, K_D и n . Полученные значения приведены в таблице 5.

Таблица 5. Параметры обобщённого уравнения для реакций лизиса, катализируемого лизоцимом в присутствии плюроника P123.

Добавление плюроника	$V_M^{(1)}$, ОЕ/с	$K_M^{(1)}$, ОЕ	$V_M^{(2)}$, ОЕ/с	$K_M^{(2)}$, ОЕ	K_D	n	r
+ 1 мкМ P123	$8,5 \times 10^{-4}$	0,20	$2,1 \times 10^{-3}$	0,65	0,003	8	0,970
+ 3 мкМ P123	$8,0 \times 10^{-4}$	0,15	$2,0 \times 10^{-3}$	0,55	0,003	8	0,975
+ 7 мкМ P123	$7,0 \times 10^{-4}$	0,15	$2,5 \times 10^{-3}$	0,55	0,003	8	0,943
+ 10 мкМ P123	$7,0 \times 10^{-4}$	0,20	$2,5 \times 10^{-3}$	0,80	0,003	10	0,980

Для установления положения плюроника в составе комплекса с лизоцимом провели молекулярный докинг с помощью программного обеспечения HEX8, в котором использовали структуру лизоцима 6LYZ (PDB). Полученные отрицательные значения полной энергии системы свидетельствуют о возможности самопроизвольного образования комплекса. Показано, что водородные связи образованы Lys13, Arg14,

Asp18, Asn19, Gly16, Tyr20, Asn93 и Leu129 в случае комплекса с F127; Arg14, Gly16, Asp18, Asn19 и Tyr20 в случае комплекса с P123; и Ser36, Thr43, Asn44, Ala122 и Asp119 в случае комплекса с L121, т.е. по данным молекулярного докинга во взаимодействии с плурониками принимают участие преимущественно полярные незаряженные аминокислоты. Остатки, расположенные вблизи Phe3, Phe34 и Phe38, образуют водородные связи и обеспечивают гидрофильное окружение соответствующего участка белковой глобулы, тогда как Pro70 и Pro79 остаются в гидрофобной среде и в результате оказываются расположены на границе раздела. Связывание плуроника L121 с остатками, расположенными около остатка Glu35, который образует активный центр фермента, коррелирует с тем, что L121 оказывает наибольший эффект на уменьшение ферментативной активности лизоцима.

ВЫВОДЫ

I. Показано, что на межфазных границах жидкость/жидкость и жидкость/воздух, а также в объёме водной фазы посредством водородных и ван-дер-ваальсовых взаимодействий между цепями ПЭО и аминокислотными остатками происходит образование устойчивых комплексов между лизоцимом и неионогенными поверхностно-активными веществами (плурониками и Бридж-35). Образование комплексов не приводит к изменениям вторичной структуры белка, но приводит к двукратному уменьшению ферментативной активности и изменению каталитических свойств.

II. С применением метода жидкостной сцинтилляционной спектроскопии в варианте сцинтиллирующей фазы найдено, что из-за наличия взаимодействий между цепями ПЭО и молекулами белка лизоцим не полностью замещается из межфазного слоя молекулами неионогенных ПАВ вплоть до концентраций последних близких к критической концентрации мицеллообразования.

III. Из совокупности данных, полученных с помощью сцинтиллирующей фазы и тензиометрии, рассчитаны параметры межмолекулярного взаимодействия между лизоцимом и неионогенными ПАВ, с помощью которых определён состав адсорбционного слоя лизоцим-НПАВ на границе с воздухом из данных тензиометрии.

IV. При помощи обработки атомарным тритием адсорбционных слоёв лизоцим-неионогенное ПАВ с последующим анализом распределения трития была показана высокая проницаемость адсорбционных слоёв неионогенных ПАВ для атомарного трития. Вследствие того, что в результате взаимодействия лизоцима с плурониками меняется водное окружение молекулы белка, радиоактивность лизоцима в составе смешанного адсорбционного слоя была выше, чем в случае свободного белка. Показано, что в смешанном адсорбционном слое лизоцим ориентирован таким образом, что аминокислотные остатки пролина направлены в сторону межфазной

границы, при этом для лизоцима без ПАВ лизоцим ориентирован противоположным образом.

V. Рассчитаны значения константы связывания лизоцима с плурониками F127, P123 и L121, которые составили $(6,7 \pm 3,4) \times 10^6$, $(6,7 \pm 3,4) \times 10^6$, $(1,1 \pm 0,9) \times 10^6$ л/моль, соответственно. Свободная энергия Гиббса комплексообразования составляет -39, -33 и -34 кДж/моль для плуроников F127, P123 и L121, соответственно.

VI. На основании результатов измерения ферментативной активности лизоцима и молекулярного докинга можно предположить, что плуроники взаимодействуют преимущественно с полярными незаряженными остатками аминокислот, расположенными на поверхности белковой глобулы, за исключением плуроника L121, короткие цепи ПЭО которого вступают во взаимодействие с аминокислотными остатками, расположенными во внутренней полости фермента.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИССЕРТАЦИИ ИЗЛОЖЕНЫ В СЛЕДУЮЩИХ РАБОТАХ

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, включенных в перечень Минобрнауки РФ, а также индексируемых в базах данных РИНЦ, Web of Science, Scopus

1. M. G. Chernysheva, G. A. Badun, A. V. Shnitko, V. I. Petrova, A. L. Ksenofontov. Lysozyme-surfactant adsorption at the aqueous-air and aqueous-organic liquid interfaces as studied by tritium probe // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2018, Vol. 537, P. 351-360 (Импакт-фактор: 3,990)
2. M. G. Chernysheva, A.V. Shnitko, O. A. Soboleva, G. A. Badun. Competitive adsorption of lysozyme and non-ionic surfactants (Brij-35 and pluronic P123) from a mixed solution at water-air and water-xylene interfaces // Colloid and Polymer Science. – 2018, Vol. 296 (№ 1), P. 223-232. (Импакт-фактор: 1,536)
3. M. G. Chernysheva, A. V. Shnitko, A. L. Ksenofontov, A. M. Arutyunyan, M. V. Petoukhov, G. A. Badun. Structural peculiarities of lysozyme – pluronic complexes at the aqueous-air and liquid-liquid interfaces and in the bulk of aqueous solution // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020, Vol. 158, P. 721-731. (Импакт-фактор: 5,162)

Статьи в журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России

1. А.В. Шнитко, М.Г. Чернышева, С.А. Смирнов, П.А. Левашов, Г.А. Бадун. Плуроники и Бридж-35 уменьшают бактериолитическую активность лизоцима // Вестник Моск. Ун-та. Сер. 2. – 2020. – Т. 61 (№ 2). – с. 114-118. (Перевод статьи на английский язык: Pluronic and Brij-35 reduce the bacteriolytic activity of lysozyme // Moscow University Chemistry Bulletin. Seriya 2 Chemistry. – 2020, Vol. 75 (№2), P. 92-95)

Иные публикации

1. А. В. Шнитко. Радионуклидная диагностика свойств системы лизоцим – плуроник P123 // Материалы Международного молодежного научного форума

- «ЛОМОНОСОВ-2016». Секция «Инновации в химии: достижения и перспективы». Москва, Россия. 2016. 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).
2. А. В. Шнитко. Радиохимический подход к исследованию конкурентной адсорбции лизоцима и плюроники P123 на межфазных границах вода-ксилол и вода-воздух // Материалы Международного молодёжного научного форума "Ломоносов-2017". Секция «Инновации в химии: достижения и перспективы». Москва, Россия. 2017. 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).
3. А.В. Шнитко, А.Е. Аверина, М.Г. Чернышева, О.А. Соболева, Г.А. Бадун. Конкурентная адсорбция лизоцима и плюроники P123 на межфазной границе водный раствор-ксилол // Сборник тезисов VII Всероссийской Каргинской конференции "Полимеры 2017". Москва, Россия. 2017. С. 361-361.
4. А.В. Шнитко, М.Г. Чернышева, Г.А. Бадун, В.И. Петрова, О.А. Соболева., А.Л. Ксенофонтов, С.А. Смирнов, П.А. Левашов. Анализ комплексов лизоцим-ПАВ с помощью тритиевого зонда // Сборник материалов Международной конференции «Химическая технология функциональных наноматериалов». Москва, Россия. 2017. С. 291-292.
5. M.G. Chernysheva, A.V. Shnitko, G.A. Badun. Lysozyme-surfactant adsorption at the aqueous-air and aqueous-organic liquid interfaces as studied by tritium probe // Abstract Book 7th International Colloids Conference. Барселона, Испания. 2017. С. 53.
6. А. В. Шнитко. Радионуклидный подход к изучению свойств системы лизоцим—НПАВ // Материалы IX научной конференции молодых учёных «Ломоносов-2018». Секция «Инновации в химии: достижения и перспективы». – М.: Перо. – 2018. – с. 807.
7. M.G. Chernysheva, G.A. Badun, A.V. Shnitko, A.V. Sinolits, A.L. Ksenofontov. Lysozyme adsorption layers at different interfaces: water-air, water-xylene and water-diamond as studied by tritium probe // Book of abstract XVIth International conference Surface forces. August 20-25, 2018. Kazan, Russia. Казань, Россия. 2018. С. 60.
8. А.В. Шнитко, М.Г. Чернышева, О.А. Соболева, И.Л. Маркович, А.Л. Ксенофонтов, Г.А. Бадун. Тритиевый зонд в исследовании свойств системы лизоцим—неионогенное ПАВ // IX Российская конференция с международным участием «Радиохимия 2018»: Сборник тезисов, г. Санкт-Петербург, 17 – 21 сентября 2018 г. Санкт-Петербург, Россия. 2018. С. 111.
9. Чернышева М.Г., П.С. Белозеров, А.В. Шнитко, Г.А. Бадун. Радиохимический подход в исследовании влияния анионов Гофмейстера на поведение лизоцима в системе вода-ксилол // IX Российская конференция с международным участием «Радиохимия 2018»: Сборник тезисов, г. Санкт-Петербург, 17 – 21 сентября 2018 г. Санкт-Петербург, Россия. 2018. С. 105.
10. А. В. Шнитко. Метод тритиевого зонда – новый подход к исследованию комплексов лизоцим — неионогенное ПАВ // Материалы Международного молодёжного научного форума «Ломоносов-2019» [Электронный ресурс]. Москва, Россия. 2019. Т. 38. С. 771.
11. А.В. Шнитко, М.Г. Чернышева, Г.А. Бадун, С.А. Смирнов, А.Л. Ксенофонтов, П.А. Левашов, А.М. Арутюнян. Комплексное изучение взаимодействия лизоцима и плюроники P123, L121 и F127 // Школа-конференция для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (с международным участием) (Казань, 2019): тезисы докладов. Казань, Россия. 2019. с 43.
12. Chernysheva M.G., Shnitko A.V., Soboleva O.A., Skrebkova A.S., Ksenofontov A.L., Arutyunyan A.M., Badun G.A. Lysozyme-surfactant self-organization at the aqueous-air and

aqueous-xylene interfaces // Book of abstracts XXI Mendeleev Congress on general and applied chemistry. Book 6. Satellite symposia. – СПб. – 2019. – Т. 6. – стр. 231-231.

13. А.В. Шнитко, М. Г. Чернышева, П.А. Левашов, С.А. Смирнов, Г.А. Бадун. Изменение ферментативных свойств лизоцима в присутствии плюронионов // Десятая Международная научная конференция “Химическая термодинамика и кинетика”: сборник трудов. Великий Новгород, Россия. 2020. С. 272-273.

В автореферате использованы ссылки на работы:

1. Alahverdjieva V.S. et al. Adsorption behaviour of hen egg-white lysozyme at the air/water interface // Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 2008. V. 323, № 1–3. P. 167–174.
2. Бадун Г.А., Федосеев В.М. Проницаемость липидных мембран для атомарного трития, или эффект «соскальзывания» атомов и его роль в методе тритиевой планиграфии // Радиохимия. 2001. Т. 43, № 3. С. 267–271.
3. Samanta N., Luong T. Q., Das Mahanta D., Mitra R. K., Havenith, M.. Effect of Short Chain Poly(ethylene glycol)s on the Hydration Structure and Dynamics around Human Serum Albumin. Langmuir. 2016. V. 32, №. 3, P. 831–837.
4. Nigam S., Durocher G. Spectral and Photophysical Studies of Inclusion Complexes of Some Neutral 3 H -Indoles and Their Cations and Anions with β -Cyclodextrin // J. Phys. Chem. 1996. V. 100, № 17. P. 7135–7142.

Благодарности

Автор искренне признателен своим научным руководителям к.х.н. М.Г. Чернышевой и к.х.н. П. А. Левашову за постоянную помощь и взаимопонимание в процессе выполнения работы. Автор выражает глубокую благодарность заведующему лаборатории радионуклидов и меченых соединений к.х.н. Г.А. Бадуну за ценные советы, замечания и обсуждения в ходе подготовки диссертации.

Автор выражает благодарность к.х.н. Ксенофонтову А.Л. (НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова) за проведение аминокислотного анализа, к.х.н. Соболевой О.А. (Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова) за помощь в измерении поверхностного натяжения и обсуждение результатов, к. ф.-м. н. Арутюняну А.М. (НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова) за помощь в получение спектров кругового дихроизма, к. ф.-м. н. Петухову М.В. (Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН) за проведение экспериментов и анализ результатов малоуглового рентгеновского рассеяния, Смирнову С.А. (Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова) за помощь и консультации при измерении ферментативной активности лизоцима.

Особую благодарность автор выражает своей семье, друзьям и близким за поддержку.