

УДК 577.152.321+675.043.42

ПЛЮРОНИКИ И БРИДЖ-35 УМЕНЬШАЮТ БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЛИЗОЦИМА

А.В. Шнитко*¹, М.Г. Чернышева¹, С.А. Смирнов², П.А. Левашов², Г.А. Бадун¹

(Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, ¹кафедра радиохимии, ²кафедра химической энзимологии; *e-mail: alshnit@mail.ru)

Исследовано влияние неионогенных поверхностно-активных веществ (НПАВ): плуроников P123, L121 и F127, а также Бридж-35 на бактериолитическую активность лизоцима по отношению к модельным клеткам *Micrococcus luteus*. Показано, что образование комплексов лизоцима с этими веществами происходит посредством образования водородных связей между этиленоксидными фрагментами НПАВ и аминокислотными остатками на поверхности белковой глобулы. Ферментативная активность лизоцима при этом снижается в ряду F127 < P123 < L121 ≈ Бридж-35, вероятно, за счет стерических затруднений взаимодействия белка с субстратом – клетками.

Ключевые слова: лизоцим, плуроники, неионогенные поверхностно-активные вещества, бактериолитическая активность.

Изучение взаимодействия белков и высокомолекулярных поверхностно-активных веществ (ПАВ) способствует более глубокому пониманию функционирования материалов на основе комплексов белок – ПАВ в живых организмах, что может быть использовано для развития биотехнологии и фармакологии [1–4]. Механизмы взаимодействия белков с ПАВ разного типа в адсорбционных слоях хорошо изучены [5–12]. Некоторые неионогенные ПАВ (НПАВ) предотвращают агрегацию белков и сохраняют активность некоторых ферментов [13].

С помощью радионуклидных и спектрометрических методов показано, что блок-сополимеры пропиленгликоля и этиленгликоля состава (полиэтиленгликоль)_n(полипропиленгликоль)_m(полиэтиленгликоль)_n, известные как плуроники или полуксамеры, образуют комплексы с лизоцимом на границах раздела фаз водный раствор – органическая жидкость [14] и водный раствор – воздух [15]. На примере плуроника P123 показано увеличение флуоресценции и УФ-поглощения лизоцима при 280 нм, что свидетельствует об образовании комплекса в объеме водного раствора.

Лизоцим белка куриного яйца представляет собой фермент класса гидролаз, катализирующий гидролиз пептидогликана, который входит в состав клеточных стенок бактерий [16]. Образование комплексов лизоцима с ПАВ может привести к изменению ферментативной активности лизоцима [17]. В данной работе исследовано влияние плуроников P123, L121 и F127 и полиэтиленгликолевого эфира Бридж-35 на бактериолитическую

активность лизоцима по отношению к грамположительным бактериальным модельным клеткам *Micrococcus luteus*. Выбор НПАВ обусловлен их физико-химическими характеристиками (таблица), а также их биохимическими свойствами и способностью эффективно связываться с животными клетками и искусственными липидными слоями [18–23].

Экспериментальная часть

В работе использовали лизоцим (MP Biomedicals), плуроники L121, P123 («Aldrich») и F127 («BASF»), Бридж-35 («Fluka»), а также клетки *Micrococcus luteus* («Sigma»). Для приготовления буферного раствора применяли 0,9%-й раствор хлорида натрия (ООО «Мосфарм», Россия) и гидрофосфаты натрия и калия («Реахим», Россия). Характеристики используемых НПАВ приведены в таблице.

Все растворы готовили в солевом фосфатном буфере 8 мМ Na₂HPO₄, 2 мМ K₂HPO₄, 0,146 М NaCl (pH 7,2). Концентрация лизоцима составляла 0,5 г/л (3,5×10⁻⁵ М). Концентрацию НПАВ варьировали от 1×10⁻⁹ до 1×10⁻⁶ М для плуроников L121 и F127, от 1×10⁻⁹ до 1×10⁻⁵ М для плуроника P123 и от 1×10⁻⁹ до 1×10⁻⁵ М для Бридж-35. Смеси перед проведением эксперимента инкубировали в течение двух суток при комнатной температуре (25±2 °С). [14, 15] Измерение бактериолитической активности лизоцима проводили на вторые сутки после приготовления смеси.

В независимых экспериментах было показано, что после добавления НПАВ в исследуемом

Характеристики НПАВ [24]

НПАВ	Формула	М, г/моль	ККМ, М	ГЛБ
Бридж-35	$C_{12}H_{25}(OCH_2CH_2)_{23}OH$	1221	$7,4 \times 10^{-5}$ [25]	16
L121	$\text{Э}O_5\text{П}O_{68}\text{Э}O_5$	4400	1×10^{-6} [26]	1
P123	$\text{Э}O_{20}\text{П}O_{70}\text{Э}O_{20}$	5700	$2,5 \times 10^{-6}$ [24]	8–11
F127	$\text{Э}O_{100}\text{П}O_{65}\text{Э}O_{100}$	12600	$2,8 \times 10^{-6}$ [26]	18–23

Обозначения: ККМ – критическая концентрация мицеллообразования (приведена для 25 °С), ГЛБ – гидрофильно-липофильный баланс.

диапазоне концентраций в первые 5 ч активность лизоцима не отличается от активности лизоцима в отсутствие НПАВ в пределах погрешности эксперимента.

Бактериолитическую активность лизоцима по отношению к *M. luteus* определяли турбидиметрическим методом [27, 28]. Навеску лиофилизированных клеток массой $4,9 \pm 0,2$ мг растворяли в 1 мл фосфатного буфера. Суспензию клеток использовали в течение 2 ч после ее приготовления. В кювету вносили одинаковый объем суспензии клеток (30 мкл), вязкость оставалась неизменной в серии экспериментов. Концентрацию подбирали таким образом, чтобы оптическая плотность полученной суспензии составляла 0,48–0,52 при длине волны 650 нм. Для определения оптической плотности исследуемых растворов использовали двулучевой спектрофотометр «UV-1601PC» («Shimadzu», Япония). При проведении измерений кювету (длина оптического пути 1 см, объем 1 мл) с суспензией термостатировали при 37 °С в течение 5 мин. К суспензии клеток в кювете добавляли раствор лизоцима или смеси лизоцим – НПАВ объемом 20 мкл, смесь тщательно перемешивали, после чего проводили измерение зависимости оптической плотности от времени. Отметим, что в выбранном диапазоне концентраций НПАВ вязкость суспензий остается постоянной [29]. За активностью фермента наблюдали по уменьшению мутности суспензии в результате лизиса клеток на протяжении 5 минут.

Результаты и их обсуждение

Влияние НПАВ на бактериолитическую активность лизоцима исследовали по отношению к *M. luteus*. Скорость, с которой уменьшается оптическая плотность на начальном линейном участке, пропорциональна изменению числа лиофилизированных клеток в реакционной системе,

и поэтому может считаться характеристикой бактериолитической активности фермента (рис. 1).

На рис. 2 показано относительное изменение активности лизоцима от концентрации НПАВ:

$$\Omega = \frac{dA_{650}(\text{лизоцим} + \text{НПАВ})/dt}{dA_{650}(\text{лизоцим})/dt}.$$

Отмечено, что ни плуроники, ни Бридж-35 не вызывают спонтанного лизиса.

Присутствие плуроников L121 и P123 приводит к уменьшению бактериолитической активности лизоцима при концентрациях ниже 5×10^{-7} М. Для плуроника F127 в этой области концентраций существенного эффекта не наблюдалось. В области концентрации около 1×10^{-6} М все исследуемые НПАВ приводят к снижению активности лизоцима до 60%, дальнейшее увеличение концентрации НПАВ вызывает дальнейшее снижение ферментативной активности. Снижение ферментативной активности лизоцима в присутствии этиленгликоля и полиэтиленгликоля

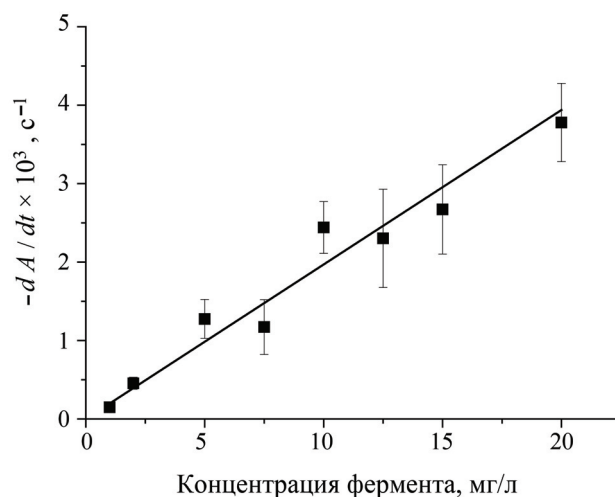


Рис. 1. Зависимость скорости лизиса клеток от концентрации фермента

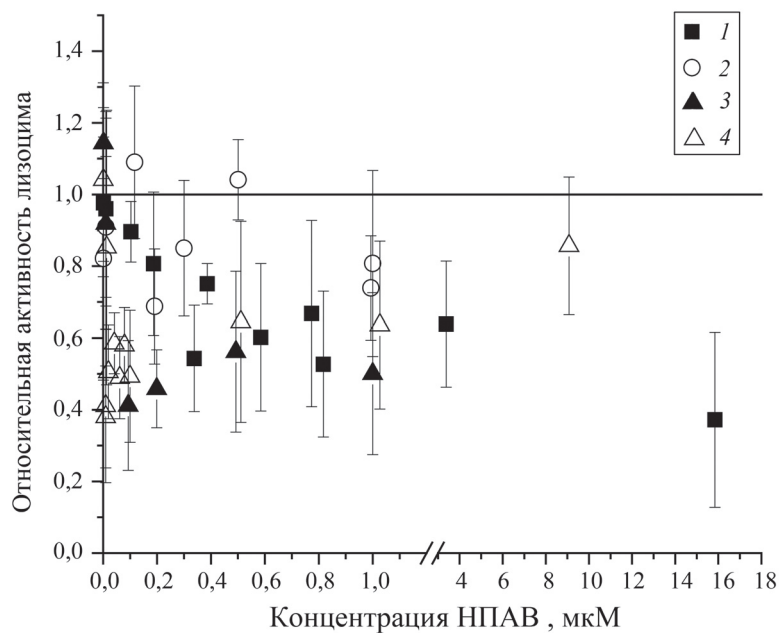


Рис. 2. Зависимость относительной активности лизоцима от концентрации НПАВ ($n = 3$, $P = 0,9$): 1 – плуроник P123, 2 – плуроник F127, 3 – плуроник L121, 4 – Бридж-35

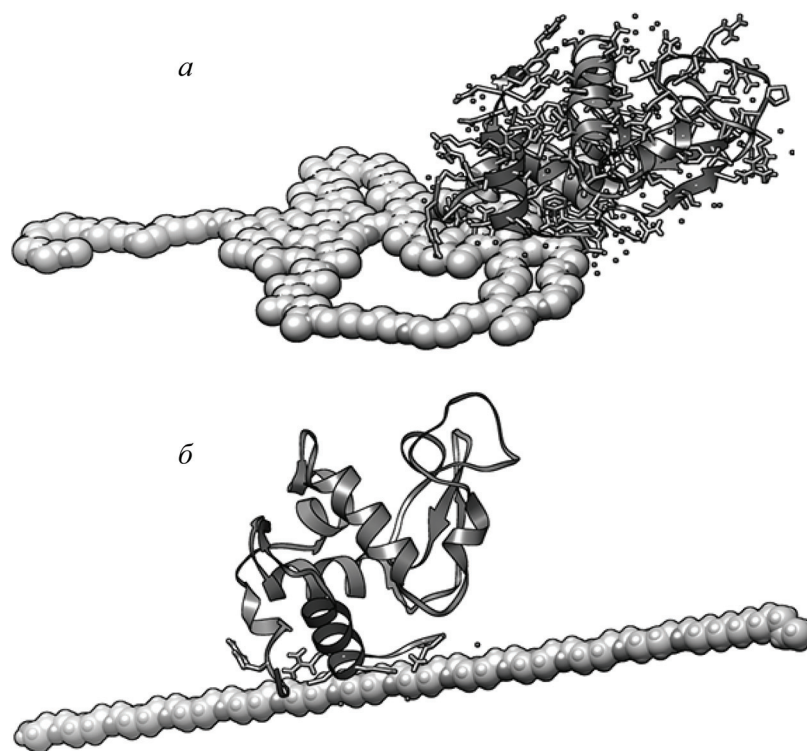


Рис. 3. Образование комплекса лизоцима с плуроником (а) и Бридж-35 (б)

объясняется их проникновением в активный центр после связывания с поверхностью белка, а также возникновением стерических затруднений для взаимодействия фермента с субстратом [30]. Следует отметить, что в присутствии этиленгликоля и полиэтиленгликоля наблюдается увеличение флуоресценции триптофана, так же как для плуроника P123 и Бридж-35 [15, 30]. Более сильное ингибирующее действие плуроника P123 по сравнению с F127 отмечено при действии на Р-гликопротеин [31]. Авторы цитируемой работы связывают наблюдаемое явление с более сильным включением субстрата в мицеллы плуроника P123, чем в мицеллы плуроника F127. Можно предположить, что и в случае лизоцима плуроники связываются за счет взаимодействий с аминокислотными остатками на внешней стороне глобулы, а также с остатками аминокислот, входящими в состав «кармана» фермента, закрывая сам активный центр. Связывание с НП АВ создает стерические затруднения в ходе реакции ферментативного катализа в активном центре, а значит препятствует образованию фермент-субстратного комплекса. Данное предположение подтверждается полученными ранее данными по образованию комплексов лизоцим – плуроник P123 и лизоцим – Бридж-35 на межфазной границе водный раствор – воздух, которые демонстрируют увеличение доступности гидрофильных аминокислотных остатков [15].

Наблюдаемое нами уменьшение бактериолитической активности лизоцима в присутствии НП АВ может быть обусловлено тем, что этиленоксидные звенья взаимодействуют со стенками бактериальных клеток, препятствуя связыванию с ферментом, как это показано в случае связывания плуроников с мембраной эукариотических клеток [32]. Однако при этом должна отсутствовать зависимость эффекта от времени. Было показано, что сразу после приготовления смесей

значительного изменения бактериолитической активности лизоцима не наблюдается. Снижение активности происходит через сутки после приготовления смесей и далее не меняется. Это наблюдение подтверждает высказанное выше предположение о влиянии стерического фактора на снижение активности лизоцима в присутствии исследуемых НП АВ.

Молекулярный докинг, осуществленный с помощью программы Hex 8.0.0 и визуализация комплекса, проведенная с использованием UCSF Chimera (рис. 3) показали образование комплекса плуроник – лизоцим и Бридж – лизоцим за счет образования водородных связей между оксиэтильными цепями НП АВ и остатков Glu, Asp и Cys на поверхности лизоцима. Для проведения докинга использовали структуру лизоцима 6LYS (Protein data bank). Структуры Бридж-35 и плуроника предварительно оптимизировали в силовом поле Amber.

Согласно моделированию, энергия системы с плуроником P123 и Бридж-35 составила $-481,46$ и $-275,75$ кДж/моль соответственно, что свидетельствует о самопроизвольном протекании процесса и согласуется с литературными данными по комплексообразованию лизоцима с ПАВ [33].

Таким образом, в работе показано, что образование комплексов лизоцима с неионогенными ПАВ, содержащими этиленоксидные цепи происходит посредством образования водородных связей аминокислотных остатков на поверхности белковой глобулы и этиленоксидных звеньев ПАВ. Ферментативная активность лизоцима при этом снижается в ряду $F127 < P123 < L121 \approx$ Бридж-35, вероятно, за счет стерических затруднений взаимодействия белка с субстратом (клетками).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 18-33-20147-мол-а-вед).
Конфликта интересов нет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moghimi S.M., Hunter A.C. // Trends Biotechnol. 2000. Vol. 18. N 10. P. 412.
2. Gospodarczyk W., Kozak M. // Colloid Polym. Sci. 2015. Vol. 293. N 10. P. 2855.
3. Valle J.W. et al. // Invest. New Drugs. 2011. Vol. 29. N 5. P. 1029.
4. Kabanov A. V., Batrakova E. V., Alakhov V.Y. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2002. Vol. 54. N 5. P. 759.
5. Dan A. et al. // Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2013. Vol. 18. N 4. P. 302.
6. Otzen D. // Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics. Elsevier B.V., 2011. Vol. 1814. N 5. P. 562.
7. Stenstam A., Khan A., Wennerström H. // Langmuir. 2001. Vol. 17. N 24. P. 7513.
8. Fainerman V.B. et al. // Adv. Colloid Interface Sci. Elsevier B.V. 2016. Vol. 233. P. 200.
9. Maulik S. et al. // Colloids Surfaces B Biointerfaces. 1998. Vol. 11. N 1–2. P. 1.
10. Fainerman V.B. et al. // Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 2017. Vol. 521. P. 211.

11. Murray B.S., Ventura A., Lallemand C. // Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 1998. Vol. 143. N 2–3. P. 211.
12. Green R.J. et al. // Langmuir. 1997. Vol. 13. N 24. P. 6510.
13. Banga A. Therapeutic Peptides and Proteins // Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems, Third Edition. CRC Press, 2015.
14. Chernysheva M.G. et al. // Colloid Polym. Sci. 2018. Vol. 296. N 1. P. 223.
15. Chernysheva M.G. et al. // Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 2018. Vol. 537. P. 351.
16. Osserman E.F., Canfield R.E. Lysozyme / ed. E.F. Osserman, R.E. Canfield. Elsevier, 1974.
17. Иванов П.А. и др. // Биоорганическая химия. 2015. Т. 41. № 3. P. 292.
18. Grozdova I.D. et al. // J. Appl. Polym. Sci. 2017. Vol. 134. N 44. P. 45492.
19. Zhirnov A. et al. // Pharm. Res. Pharmaceutical Research, 2018. Vol. 35. N 11. P. 205.
20. Akash M.S.H., Rehman K. // J. Control. Release, 2015. Vol. 209. P. 120.
21. Picheth G.F. et al. // J. Colloid Interface Sci. Elsevier Inc., 2019. Vol. 544. P. 217.
22. Zhang W. et al. // Biomaterials., 2011. Vol. 32. N 11. P. 2894.
23. Lee E.S. et al. // Colloids Surfaces B Biointerfaces. Elsevier B.V., 2011. Vol. 82. N 1. P. 190.
24. Wanka G., Hoffmann H., Ulbricht W. // Colloid Polym. Sci. 1990. Vol. 268. N 2. P. 101.
25. Писаев И.В., Соболева О.А., Иванова Н.И. // Коллоидный журнал. 2009. Т. 71. № 2. С. 256.
26. Мелик-Нубаров Н.С. // Дис. ... докт. хим. наук. 2007.
27. Levashov P.A. et al. // Anal. Chem. 2010. Vol. 82. N 5. P. 2161.
28. Sedov S.A. et al. // Colloids Surfaces B Biointerfaces. Elsevier B.V., 2011. Vol. 88. N 1. P. 131.
29. Jerome F.S., Tseng J.T., Fan L.T. // J. Chem. Eng. Data. 1968. Vol. 13. N 4. P. 496.
30. Samanta N. et al. // Int. J. Biol. Macromol. Elsevier B.V., 2018. Vol. 118. P. 209.
31. Guan Y. et al. // Arch. Pharm. Res. 2011. Vol. 34. N 10. P. 1719.
32. Будкина О.А. // Дис. ... канд. хим. наук. 2015. 135 с.
33. Bhat I.A. et al. // Int. J. Biol. Macromol. Elsevier B.V., 2018. Vol. 109. P. 1006.

Поступила в редакцию 05.06.2019
 Получена после доработки 06.07.2019
 Принята к публикации 10.07.2019

PLURONICS AND BRIJ-35 REDUCE THE BACTERIOLYTIC ACTIVITY OF LYSOZYME

A.V. Shnitko^{1*}, M.G. Chernysheva¹, S.A. Smirnov², P.A. Levashov², G.A. Badun¹

(Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Divisions of ¹radiochemistry and ²chemical enzymology; *e-mail: alshnit@mail.ru)

The influence of non-ionic surfactants on the bacteriolytic activity of lysozyme was studied on the model cells *Micrococcus luteus*. Pluronics P123, L121 and F127 as well as Brij-35 were used. The formation of complexes of these compounds and lysozyme occurs via formation of hydrogen bonds between ethylene oxide fragments of the surfactant and amino acids residues of lysozyme surface. The bacteriolytic activity of lysozyme was reduced in line F127 < P123 < L121 ≈ Brij-35 probably because of steric hindrances of the protein interaction with cells substrate.

Key words: lysozyme, pluronics, non-ionic surfactants, bacteriolytic activity.

Сведения об авторах: Шнитко Алексей Валерьевич – аспирант кафедры радиохимии химического факультета МГУ (alshnit@mail.ru); Смирнов Сергей Александрович – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ (sergik-2001@yandex.ru); Чернышева Мария Григорьевна – доцент кафедры радиохимии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (chernysheva@radio.chem.msu.ru); Левашов Павел Андреевич – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (levashov@yahoo.com); Бадун Геннадий Александрович – доцент кафедры радиохимии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (badunga@yandex.ru).