

УДК 577.114

СПЕКТРАЛЬНЫЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ХИТОЗАНА, МОДИФИЦИРОВАННОГО МАННОЗОЙ, С ЛЕКТИНОМ КОНКАНАВАЛИНОМ А ДЛЯ СОЗДАНИЯ СИСТЕМ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ПРЕПАРАТОВ

И.М. Ле-Дейген*, П.В. Мамаева, А.А. Скуредина, Е.В. Кудряшова

(Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии; *e-mail: i.m.deygen@gmail.com)

Продемонстрирована возможность детального изучения процесса взаимодействия рецепторов с лигандами на примере лектина конканавалина А и хитозана 5 кДа, модифицированного D-маннозой, спектральными методами анализа. Разработан усовершенствованный способ модификации хитозана D-маннозой и очистка полученных конъюгатов. Впервые предложен способ расчета констант связывания конканавалина А с маннозо-содержащим лигандом по уменьшению интенсивности полосы поглощения Амид II в нормированных на Амид I ИК-спектрах рецептора при связывании с модифицированным биополимером хитозан-маннозой. Линеаризация полученных кривых связывания в координатах Скетчарда позволила рассчитать значения констант диссоциации комплексов $5,5(\pm 0,3) \cdot 10^{-5}$ М, результаты подтверждаются данными поляризационного флуоресцентного анализа. Среди предлагаемых способов ИК-спектроскопия представляется наиболее удобным, точным и не требующим предварительной химической модификации белка методом для расчета констант диссоциации.

Ключевые слова: лектины, взаимодействие лиганд – рецептор, хитозан, ИК-спектроскопия Фурье.

Список сокращений: ПТП – противотуберкулезные препараты, КонА – конканавалин А, ТНБС – тринитробензолсульфокислота, ПБС – натрий-фосфатный буферный раствор, ФИТЦ – флуоресцеин изотиоцианат.

Туберкулез – одна из наиболее угрожающих инфекций как в развивающихся, так и в развитых странах. Длительная терапия высокими дозами антибиотиков приводит к развитию побочных эффектов, снижающих уровень жизни пациентов, и к формированию мультирезистентных штаммов *M. Tuberculosis*. Разработан широкий спектр систем доставки противотуберкулезных препаратов (ПТП): липосомальные [1], олигосахаридные [2], полимерные [3]. Однако большинство нано- и субмикронных частиц недостаточно эффективно достигают цели при лечении легочных форм туберкулеза. Таким образом, очевидна необходимость нацеливания систем доставки на альвеолярные макрофаги для борьбы с *M. Tuberculosis*, поражающей данные клетки [4].

Актуальная задача биомедицинской химии состоит в синтезе биосовместимых полимеров для создания систем доставки лекарств с эффектом активного нацеливания. Перспективны в качестве адресной метки D-манноза и ее производные, по-

скольку на поверхности альвеолярных макрофагов легкого активно экспрессируются соответствующие рецепторы [5, 6]. Подобные молекулы могут быть использованы для создания как полимерных, так и липосомальных систем доставки ПТП.

Хитозан (аминополисахарид природного происхождения) представляет собой перспективный полимер для создания систем доставки ПТП в виду его мукоадгезивных свойств и высокой биосовместимости. Большое число аминогрупп, доступных для взаимодействия, обуславливает широкий спектр реакций химической модификации для введения в структуру адресных меток. Известны способы получения хитозана, модифицированного маннозой [7], однако данные методики обычно требуют 1–2 дня инкубации реакционной смеси. Для применения хитозана-маннозы в биомедицинских целях необходимо разработать экспрессные методики синтеза, позволяющие контролировать степень модификации. Следует отметить, что для отбора наиболее перспек-

тивных полимеров, модифицированных маннозой, необходимо глубокое понимание механизма взаимодействия таких молекул с рецепторами класса лектинов. Широко известен рецептор макрофагов, специфически связывающий олигосахариды, содержащие маннозные остатки [8]. Он относится к классу лектинов и представляет собой мембранный гликопротеин массой 165 кДа. Процесс связывания лиганда с рецептором чувствителен к рН и требует присутствия ионов кальция.

В качестве модельного лектина удобно использовать конканавалин А (КонА), выделенный впервые из растения *Canavalia ensiformis*. Он представляет собой гомотетрамер, каждая субъединица включает в себя 235 аминокислотных остатков и имеет массу 26,5 кДа. Как и связывающий маннозу рецептор макрофагов, КонА чувствителен к рН (при $\text{pH} \leq 5,8$ он диссоциирует на димеры). Связывание лиганда требует присутствия ионов двухвалентного марганца и кальция. Природным лигандом для КонА является триманнозид [9], в то время как различные производные маннозы характеризуются большими константами диссоциации по данным микрокалориметрического титрования и поляризационного флуоресцентного анализа [10].

Следует отметить, что классическими методами исследования взаимодействия между белком и углеводом можно считать ингибиторный анализ Ландштейна, хроматографические методы анализа, равновесный диализ, микрокалориметрический и поляризационный флуоресцентный анализ, при этом последние два наиболее часто используются в литературе. Так, калориметрия позволяет надежно рассчитывать ΔH^0 и ΔC_p для процесса комплексобразования, что способствует установлению механизма. К недостаткам калориметрии следует отнести сложную обработку экспериментальных данных и высокие требования к оборудованию [11]. Метод поляризации флуоресценции высокочувствителен, позволяет работать с равновесной системой и не требует дополнительных стадий отмывки, однако его применимость до сих пор ограничена ввиду недостаточной чувствительности. Поскольку сигнал поляризации флуоресценции зависит от подвижности флуоресцентной метки на белке, полученный результат может быть искажен, особенно при несопоставимых размерах лиганда и рецептора [12].

К перспективным методам анализа сложных биосистем относится ИК-спектроскопия Фурье – надежный и удобный метод, позволяющий

в деталях изучать механизмы взаимодействия биомолекул и определять константы диссоциации [13]. Цель данной работы – изучение процесса взаимодействия КонА с синтезированным производным хитозана 5 кДа, модифицированным маннозой. Полученные результаты позволят заложить основу для дальнейшей системы адресной доставки противотуберкулезных препаратов по отношению к альвеолярным макрофагам легкого.

Экспериментальная часть

Материалы. Конканавалин А, ДМСО, α -D-манноза, флуороисцеиндиизоцианат (ФИТЦ), хитозан 5 кДа, NaBH_3CN , таблетки для приготовления натрий-фосфатного буферного раствора (ПБС) – все производства фирмы «Sigma Aldrich» (США); NaOH , тринитробензолсульфонокислота (ТНБС), соли бура, CaCl_2 , Na_2CO_3 , MnCl_2 («х.ч.», «Реахим», Россия).

Синтез хитозан-маннозы. Синтез был проведен по схеме, представленной на рис. 1. Хитозан 5 кДа растворяли в 5%-й уксусной кислоте, после чего добавляли раствор раствора D-маннозы в пятнадцатикратном мольном избытке, рН доводили до 9,0 раствором 1 М NaOH , интенсивно перемешивали 10 мин и добавляли 0,1 мг NaBH_3CN , затем смесь перемешивали еще 40 мин. Очистку продукта проводили путем диализа в диализных мешках Orange Scientific (Бельгия), масса отсека 3 кДа против ПБС (рН 7,4).

Степень модификации хитозана маннозой определяли по числу свободных аминогрупп в хитозан-маннозе по сравнению с исходным препаратом хитозана. Регистрацию кинетических кривых образования окрашенных аддуктов аминогрупп хитозана с тринитробензолсульфонокислотой (ТНБС) проводили на УФ-спектрофотометре. В кювету, содержащую 3 мл 0,1 М натрий-боратного буферного раствора (рН 8,5), добавляли 0,05 мл 1 М раствора ТНБС в воде, вносили аликвоту (50 мкл 1–2 мг/мл раствора) сополимера, перемешивали и регистрировали изменение оптического поглощения при 420 нм в течение 60 мин при 22 °С. Кювета сравнения содержала 3 мл того же буфера и 0,05 мл раствора ТНБС. Полученную кинетическую кривую изменения оптического поглощения экстраполировали к начальному моменту и определяли содержание (%) свободных аминогрупп в образце хитозан-маннозы, за 100% принимали содержание аминогрупп в немодифицированном хитозане.

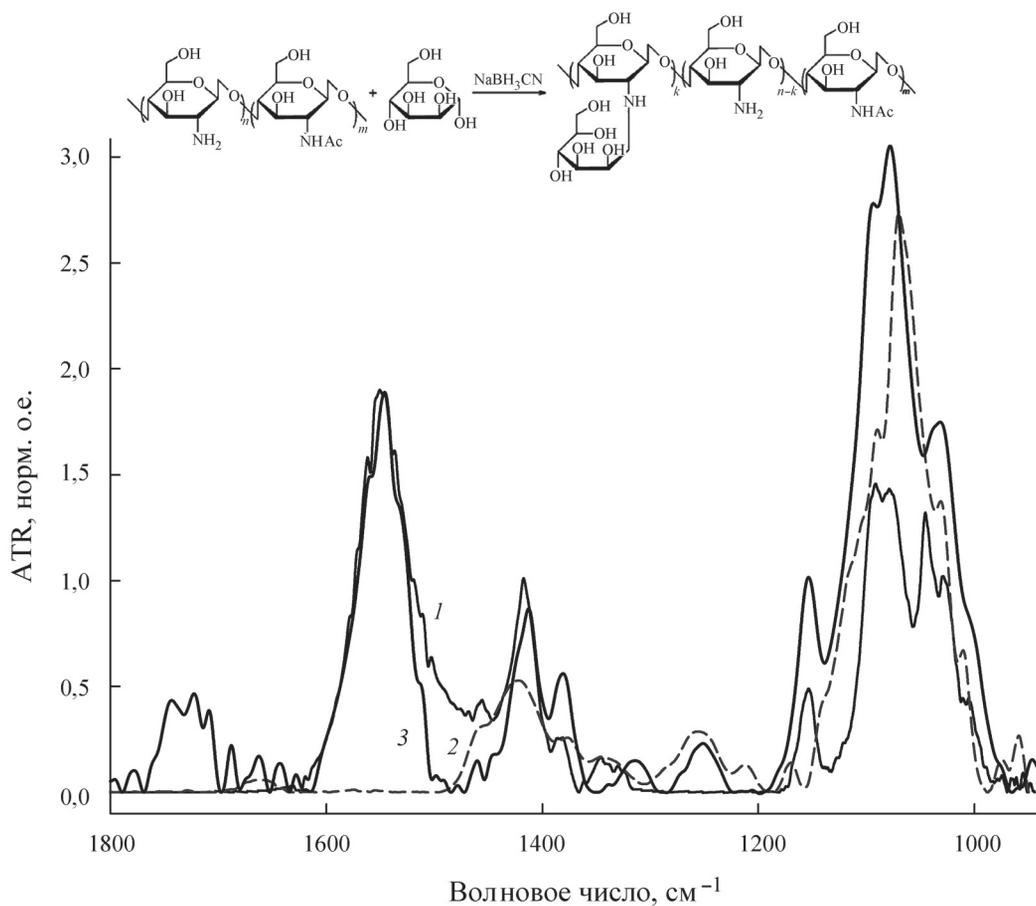


Рис. 1. ИК-спектр: 1 – хитозана, 2 – *D*-маннозы, 3 – хитозан-маннозы (0,02 М ПБС; pH 7,4, 22 °C). На вставке представлена схема синтеза производного хитозан-маннозы

Комплексы Кона с хитозан-маннозой (0,02 М ПБС, pH 7,4)

Название комплекса	Соотношение Кона : хитозан-манноза
ХМ0,1	10:1
ХМ0,2	5:1
ХМ0,3	10:3
ХМ0,4	2,5:1
ХМ0,5	2:1
ХМ0,7	10:7
ХМ0,9	10:9
ХМ 1	1:1
ХМ 1,5	1:1,5
ХМ 2	1:2

Примечание: концентрация ионов Ca²⁺ и Mn²⁺ 3,6·10⁻⁵ М.

Получение комплексов КонА – хитозан-манноза. Для изучения процесса комплексообразования КонА с хитозан-маннозой методом ИК-спектроскопии и поляризации флуоресценции получали комплексы при разном соотношении КонА : Хитозан-манноза (табл. 1). Комплексы получали в ПБС (рН 7,4) в присутствии хлорида кальция и марганца для функционирования КонА.

Синтез флуоресцентно-меченого КонА. Раствор ФИТЦ в ДМСО (1 мг/мл) медленно добавляли к 2,5 мл раствора КонА (2 мг/мл), растворенному в 0,1 М Na_2CO_3 (рН 9,0). Реакция проходила при перемешивании в темноте в течение 4 ч при температуре 4 °С. Для очистки меченого белка от непрореагировавшего ФИТЦ проводили разделение на колонке Sephadex G-25 объемом 5 мл. Полученные фракции анализировали методом УФ-спектрофотометрии и методом поляризации флуоресценции. Концентрацию белка во фракциях рассчитывали по формуле Калькара.

Регистрацию ИК-спектров проводили на ИК-спектрометре Фурье «Tensor 27» («Bruker», Германия), оснащенного МСТ-детектором, охлаждаемым жидким азотом, с термостатом фирмы «Huber» (США). Измерения проводили в термостатируемой ячейке нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО, BioATR-II, «Bruker», Германия) с помощью кристалла однократного отражения ZnSe при 22 °С и постоянной скорости продувки системы сухим воздухом аппаратом «Jun-Air» (Германия). На кристалл ячейки НПВО наносили аликвоту (30 мкл) образца, спектр регистрировали трижды в интервале от 4000 до 950 cm^{-1} , с разрешением 1 cm^{-1} ; проводили 70-кратное сканирование и усреднение. Фон регистрировали аналогично. Спектры анализировали с помощью программы Opus 7.0.

Регистрацию спектров УФ проводили с помощью прибора «SpectraMax M5» (США) в планшете Costar black\clear bottom (96 лунок). В планшет вносили по 150 мкл пробы и регистрировали спектр в диапазоне от 180 до 350 нм.

Регистрацию спектров флуоресценции проводили с помощью прибора «SpectraMax M5» (США) в планшете Costar black\clear bottom (96 лунок). В лунки планшета вносили по 150 мкл пробы и регистрировали спектр флуоресценции, после чего регистрировали сигнал поляризации флуоресценции. Спектры регистрировали при $\lambda_{\text{возб.}} = 485 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{эмиссии}} = 525 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{cut-off}} = 495 \text{ нм}$.

Статистическая обработка данных. Эксперименты по ИК-спектроскопии Фурье повторя-

ли не менее 3 раз, эксперименты с поляризацией флуоресценцией повторяли не менее 10 раз, эксперименты с аффинной хроматографией проводили не менее 3 раз. Обработку данных осуществляли в программах Sigma Plot 12.5 и Microsoft Excel, оснащенных пакетом AtteStat.

Обсуждение результатов

Синтез и характеристика хитозан-маннозы. Синтез хитозан-маннозы проводили путем модификации свободных аминогрупп маннозой с образованием основания Шиффа и его последующего восстановления. Для исследования зависимости степени модификации хитозана от условий проведения синтеза и оптимизации методики варьировали концентрацию модифицирующего агента и время проведения реакции. Удалось добиться уменьшения времени синтеза конъюгата хитозан-манноза до 12 ч по сравнению с 48-часовым синтезом, описанным в работе [7].

Для определения степени модификации маннозой была разработана оригинальная методика на основе анализа интенсивности узкой выраженной полосы поглощения при 1070 cm^{-1} в ИК-спектре модифицированного полимера, что соответствует валентным колебаниям связи С–О–С в маннозе. Для расчета степени модификации контрольные ИК-спектры исходного хитозана вычитали из спектров образца, содержащих такую же концентрацию биополимера. Концентрацию маннозы в образцах определяли по калибровочной кривой (зависимость интенсивности 1070 cm^{-1} от концентрации маннозы). Степень модификации составила $38 \pm 2\%$, что соответствует в среднем десяти остаткам маннозы на одну полимерную цепь.

В качестве контрольного метода определения степени модификации использовали метод титрования свободных аминогрупп тринитробензолсульфо кислотой (ТНБС) по полосе поглощения окрашенного продукта на 420 нм. Результат оказался неожиданным: реакция с ТНБС показала 100%-е модифицирование аминогрупп.

Вероятно, все доступные для реакции с маннозой аминогруппы, расположенные на поверхности биополимера, вступают во взаимодействие с углеводом, и для реакции с ТНБС не остается свободных аминогрупп (все немодифицированные находятся внутри полимерных цепей). Методика, разработанная на базе ИК-спектроскопии, напротив, не имеет подобных недостатков (просто странственные факторы не влияют на результаты анализа).

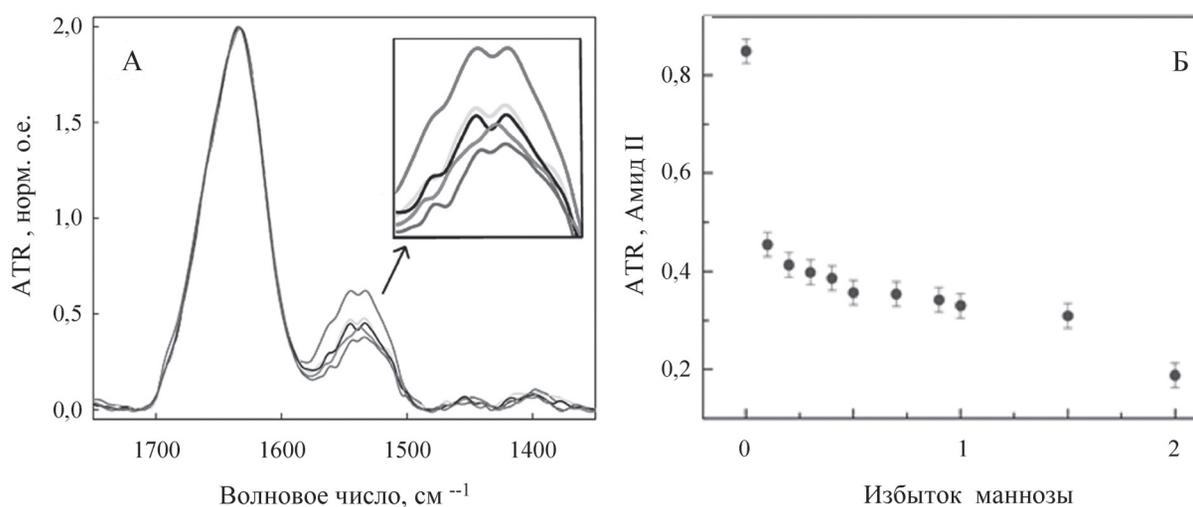


Рис. 2. А – нормированные на Амид I ИК-спектры КонА и его комплекса с конъюгатом хитозан-манноза (0,02 М ПБС, рН 7,4, 22 °С). Спектры комплекса КонА – хитозан-манноза в области Амид II показаны сверху вниз на вставке (контроль, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:10). Концентрация ионов Са²⁺ и Мп²⁺ 3,6·10⁻⁵ М. Б – изотерма сорбции для комплекса КонА – хитозан-манноза по данным ИК-спектроскопии

Взаимодействие конканавалина А с хитозан-маннозой (ИК-спектроскопия Фурье).

Для изучения процесса взаимодействия белков-рецепторов с лигандами целесообразно применение ИК-спектроскопии Фурье – высокоинформативного и точного спектрального анализа, хорошо зарекомендовавшего себя для изучения сложных биологических систем. ИК-спектр КонА в натрий-фосфатном буфере представлен на рис. 2, а. В спектре присутствуют высокоинтенсивные полосы поглощения Амид I (1632 см⁻¹) и Амид II (1537 см⁻¹), соответствующие колебаниям пептидной связи. Обнаружено, что зависи-

мость интенсивности полосы поглощения Амид I от концентрации КонА линейна, значит дальнейшее изучение спектров, нормализованных на полюсу Амид I, корректно.

Полосы поглощения Амид I и Амид II характеризуют изменения во вторичной структуре белка и могут быть информативны при анализе связывания с лигандом. Обнаружено, что комплексообразование с хитозан-маннозой приводит к уменьшению интенсивности в нормализованных по Амиду I спектрах полосы поглощения Амид II.

Установлено, что насыщение КонА при взаимодействии с хитозан-маннозой происходит при

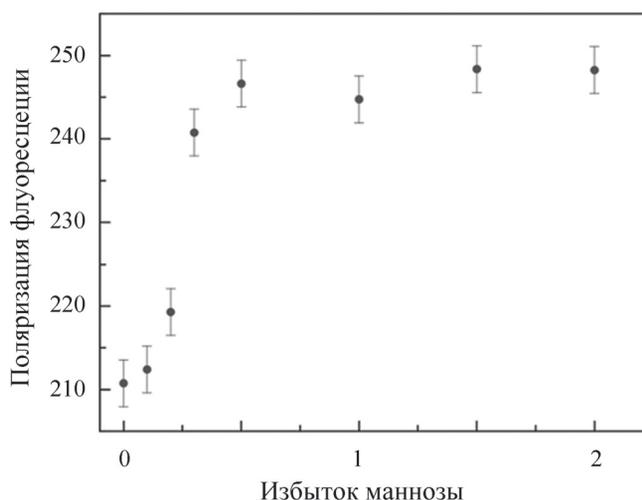


Рис. 3. Изотерма сорбции для комплекса ФИТЦ-КонА – хитозан-манноза по данным поляризации флуоресценции. Концентрация ФИТЦ-КонА постоянна (0,25 мг/мл), концентрация хитозан-маннозы варьировалась для достижения требуемого основомольного избытка остатков маннозы (0,02 М ПБС, рН 7,4, 22 °С)

двукратном избытке лиганда (рис. 2, б). Линеаризация изотермы сорбции комплекса в координатах Скетчарда позволила рассчитать значение его константы диссоциации, равное $5,5 (\pm 0,3) \cdot 10^{-5}$ М. Природным лигандом для КонА является триманнозид (так называемая «маннозная тройка»), для которого, по литературным данным, значение константы диссоциации комплекса составляет $1,0 (\pm 0,1) \cdot 10^{-5}$ М [14]. Ключевое отличие триманнозида заключается в его разветвленности, т.е. хитозан-манноза структурно отличается от природного лиганда КонА. При этом хитозан-манноза имеет значения константы диссоциации, близкие к константе диссоциации природного лиганда, что указывает на его перспективность для дальнейшего использования в системах доставки ПТП. Для подтверждения полученных результатов проводили анализ этой системы методом поляризации флуоресценции.

Влияние комплексообразования КонА с хитозан-маннозой на поляризацию флуоресценции ФИТЦ-меченого КонА. Метод поляризации флуоресценции – классический метод анализа взаимодействия белков с разными лигандами. КонА, меченный ФИТЦ, обладает яркой флуоресценцией, что позволяет применить данный метод анализа для изучения взаимодействия лектина с хитозан-маннозой. Установлено, что процесс связывания сопровождается увеличением сигнала поляризации флуоресценции с выходом на плато при двукратном избытке лиганда (рис. 3). Линеаризация в координатах Скетчарда позволила рассчитать значение кон-

станты диссоциации комплекса КонА – хитозан-манноза, которая составила $1,6 (\pm 0,7) \cdot 10^{-5}$ М.

Поскольку метод поляризации обладает меньшими чувствительностью и воспроизводимостью, чем метод ИК-спектроскопии Фурье, погрешность для значения диссоциации константы оказалась выше. Следует также учесть, что на сигнал поляризации может оказывать влияние и неспецифическое связывание полимера на поверхности белка.

Выводы

В настоящей работе предложена удобная экспрессная методика синтеза, очистки и характеристики маннозилированного хитозана. Методами ИК-спектроскопии Фурье и поляризационного флуоресцентного анализа изучен процесс взаимодействия модельного лектина конканавалина А с хитозан-маннозой. Установлено, что связывание полисахарида приводит к достоверному уменьшению интенсивности полосы поглощения Амид II в нормированных на Амид I ИК-спектрах конканавалина. Связывание хитозан-маннозы с ФИТЦ-меченым КонА приводит к повышению поляризации флуоресценции белка. По изотермам сорбции рассчитаны константы диссоциации, сходящиеся по порядку с константной диссоциации природного лиганда КонА триманнозида.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-33-00134).

Конфликта интересов нет.

Дополнительной информации нет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Le-Deygen I.M., Skuredina A.A., Kudryashova E. V. // Russ. J. Bioorganic Chem. 2017. Vol. 43. N 5. P. 487.
2. Le-Deygen I.M. et al. // Anal. Bioanal. Chem. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2017. Vol. 409. N 27. P. 6451.
3. Кусков А.Н. и соавт. // Успехи в химии и химической технологии. 2016. Т. 30. № 10. С. 53.
4. Борзенко А.С. и др. // Лекарственный вестник. 2014. Т. 1. № 53. С. 42.
5. Санжаков М.А. и др. // Вестн. РАМН Актуальные вопросы фтизиатрии. 2013. № 8. С. 37.
6. Filatova L.Y., Klyachko N.L., Kudryashova E. V. // Russ. Chem. Rev. 2018. Vol. 87. N 4. P. 374.
7. Chaubey P., Mishra B. // Carbohydr. Polym. Elsevier Ltd., 2014. Vol. 101. N 1. P. 1101.
8. Stahl P.D. // Curr. Opin. Immunol. 1992. Vol. 4. P. 49.
9. Mandal D.K., Kishore N., Brewer C.F. // Biochemistry. 1994. Vol. 33. N 5. P. 1149.
10. Yuasa H. et al. // Bioorganic Med. Chem. Lett. 1998. Vol. 8. N 16. P. 2139.
11. Williams B. A., Chervenak M.C., Toone E.J. // J. Biol. Chem. 1992. Vol. 267. N 32. P. 22907.
12. Oda Y. et al. // Biol. Pharm. Bull. 1998. Vol. 21. N 11. P. 1215.
13. Deygen I.M., Kudryashova E.V. // Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2016. Vol. 141. P. 36.
14. Van Landschoot A., Loontjens F.G., De Bruyne C.K. // Eur. J. Biochem. 1980. Vol. 103. N 2. P. 307.

Поступила в редакцию 10.01.2020

Получена после доработки 12.01.2020

Принята к публикации 20.01.2020

NEW DETAILS ON THE INTERACTION OF MANNOSE-MODIFIED CHITOSAN WITH LECTIN CONCANAVALIN A ACCORDING TO SPECTRAL METHODS

I.M. Le-Deygen*, P.V. Mamaeva, A.A. Skuredina, E.V. Kudryashova

*(Lomonosov Moscow State University, Faculty of chemistry, Department of chemical enzymology; *e-mail: i.m.deygen@gmail.com)*

The possibility of comprehensive study of the interaction of receptors with ligands on the example of concanavalin A lectin and 5 kDa chitosan modified with D-mannose by spectral methods of analysis was demonstrated. A convenient method for the synthesis and purification of chitosan mannose is proposed. An analytically significant decrease in the intensity of the absorption band of Amide II was found in the IR spectra of the receptor normalized to Amide I upon binding of chitosan-mannose. The values of the dissociation constants of the complexes are $5,5(0,3) \cdot 10^{-6}$ M, the results confirm the data of polarization fluorescence analysis.

Key words: lectins, ligand-receptor interaction, chitosan, FTIR.

Сведения об авторах: *Ле-Дейген Ирина Михайловна* – ассистент кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (i.m.deygen@gmail.com); *Мамаева Полина Владиславовна* – студентка кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (mamaevapolina@yahoo.com); *Скuredина Анна Алексеевна* – аспирант кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (skuredinanna@gmail.com); *Кудряшова Елена Вадимовна* – доцент кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук (helena_koudriachova@hotmail.com).