

УДК 544.77.051.6

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИЗОЦИМА С БЛОК-СОПОЛИМЕРАМИ PGLU–PEG

© 2024 г. Л. Ю. Филатова¹, *, Н. Г. Балабушевич¹

¹Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Химический факультет,
Ленинские горы, д. 1, стр. 3, Москва, 119991 Россия

*e-mail: luboff.filatova@gmail.com

Поступила в редакцию 02.10.2023 г.

После доработки 12.12.2023 г.

Принята к публикации 12.12.2023 г.

Исследовано взаимодействие лизоцима белка куриного яйца с блок-сополимерами поли(L-глутаминовой кислоты натриевой соли) и полиэтиленгликоля (PGLU₁₀–PEG, PGLU₁₀₀–PEG) в водной среде и на границе вода–воздух. При проведении исследований применяли широкий спектр физико-химических методов: турбидиметрия, тензиометрия, флуориметрия, КД-спектроскопия, электрофоретическое светорассеяние, просвечивающая электронная микроскопия. Обнаружено, что на границе вода–воздух возможно образование смешанных адсорбционных слоев при мольных соотношениях блок-сополимер: фермент, не превышающих 2:1. В водной среде возможно образование комплексов блок-сополимера PGLU₁₀–PEG и лизоцима со структурой типа ядро–оболочка и комплексов блок-сополимера PGLU₁₀₀–PEG: лизоцим состава 1:1 или 2:1 (по молям). Возможность регулировать свойства продуктов взаимодействия фермента и блок-сополимеров позволяет разрабатывать стратегии получения антибактериальных препаратов.

Ключевые слова: лизоцим, блок-сополимер PGLU–PEG, комплекс, структура, тензиометрия, бактерицидная активность

DOI: 10.31857/S0023291224020127, **EDN:** DFRWGB

ВВЕДЕНИЕ

Белки (ферменты) — это природные полиэлектролиты, которые обладают уникальными свойствами, включая способности к денатурации и ренатурации, образованию гелей и нановолокон. Большое количество ферментов обладает терапевтическими свойствами, однако они, как правило, неустойчивы в физиологических условиях, что обуславливает потребность в иммобилизации биокатализаторов. Иммобилизованные на полимерах препараты ферментов широко используются в пищевой промышленности, при доставке лекарств, в изготовлении биосенсоров [1–4].

Блок-сополимеры полиаминокислот и полиэтиленгликоля (PEG) используют в качестве носителей для иммобилизации ферментов и белков. Установлено, что они взаимодействуют с белками и ферментами с образованием полиионных комплексов, которые представляют собой супрамолекулярные структуры типа ядро–оболочка. Общепринятой моделью таких структур являются те, в состав ядра которых входят белок и полиаминокислота, а оболочка состоит из PEG. Движущей силой взаимодействия белка с полимером является

энтропийный фактор, обусловленный высвобождением в раствор противоионов. Роль PEG заключается в увеличении растворимости в водной среде полиионных комплексов, подавлении агрегации частиц комплексов, а также защите от протеолиза включаемых в комплексы белков и понижении их иммуногенности [5–10].

Лизоцим белка куриного яйца — небольшой глобулярный белок (14.3 кДа) с высоким значением изоэлектрической точки (11.35). Лизоцим — распространенный фермент в организме человека и животных: он содержится в грудном молоке, слюне, слезной жидкости, сыворотке крови, а также в слизистых оболочках органов пищеварения, дыхания, мочеполовой системы [11–15]. Лизоцим гидролизует β-1,4 гликозидные связи между N-ацетилмуравовой кислотой и N-ацетил-d-глюкозамином в пептидогликане клеточных стенок грамположительных микроорганизмов (*Clostridium tyrobutyricum*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Micrococcus luteus*). Свойства лизоцима изучены достаточно хорошо, поэтому его часто используют в качестве модельного белка в физико-химических, структурных и кинетических исследованиях [11, 15, 16].

В данной работе изучено взаимодействие блок-сополимеров PGLU–PEG (с переменной длиной PGLU) с антимикробным ферментом лизоцимом. Исследование взаимодействия лизоцима с блок-сополимерами PGLU–PEG может способствовать пониманию подходов к получению самособирающихся функциональных наноматериалов с антимикробным действием. Как было сказано выше, лизоцим входит в состав физиологических жидкостей и слизистых оболочек (например, слезы, слюна, слизь дыхательных путей), которые контактируют с внешней средой. Понимание особенностей структуры и функционирования наноматериалов как в объеме жидкости, так и на границе раздела жидкость–воздух является важной фундаментальной и прикладной задачей. В качестве простейших моделей жидкой фазы и границы раздела можно рассмотреть водную фазу и границу вода–воздух. Цель работы – установить влияние длины фрагмента PGLU на физико-химические параметры взаимодействия между лизоцимом и блок-сополимерами PGLU–PEG в водной фазе и на границе вода–воздух.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

В работе использовали лизоцим белка куриного яйца (диализованный и лиофилизированный, L6876), *M. lysodeikticus* ATCC No. 4698 (M3770), соли для приготовления буферных растворов фирмы Sigma (США); блок-сополимеры полиэтиленгликоля и поли(L-глутаминовой кислоты натриевой соли) фирмы Alamanda polymers (США). Молекулы блок-сополимеров характеризуются наличием блока поли(L-глутаминовой кислоты натриевой соли) переменной молекулярной массы (PGLU₁₀ 1.5 кДа и PGLU₁₀₀ 15.0 кДа) и полиэтиленгликоля массой 5 кДа (114 структурных звеньев): PGLU₁₀–PEG (M_w 6.5 кДа), PGLU₁₀₀–PEG (M_w 20.0 кДа). По данным производителя, кривые молекулярно-массового распределения обоих полимеров, полученные с помощью гель-проникающей хроматографии, имеют унимодальную форму, коэффициент полидисперсности составляет 1.0–1.2, что соответствует монодисперсной системе.

Получение комплексов лизоцима с блок-сополимерами PGLU–PEG

Свежеприготовленный водный раствор PGLU–PEG разбавляли свежеприготовленным водным раствором лизоцима необходимой концентрации в объемном соотношении 9:1. Смеси лизоцима с блок-сополимерами PGLU–PEG инкубировали 24 ч при 4°C (низкую температуру выбрали с целью избегания инактивации фермента), были получены образцы с концентрацией лизоцима $7.0 \cdot 10^{-6}$ М

и концентрациями PGLU–PEG от $7.8 \cdot 10^{-6}$ М до $2.0 \cdot 10^{-3}$ М. Для проведения тензиометрии, спектроскопических исследований, измерения ζ -потенциала и размера частиц рН растворов с рН ниже 7.0 доводили до 7.4–7.5 при помощи растворов NaOH в концентрации 1 М и 0.1 М. Исследования объемных и поверхностных свойств растворов проводили через 24 ч после смешения компонентов.

Изучение влияния блок-сополимеров PGLU–PEG на активность лизоцима

Активность лизоцима определяли методом турбидиметрии по изменению мутности суспензии клеток *M. lysodeikticus* во времени при длине волны 600 нм. В фосфатно-солевом буфере готовили суспензии клеток *M. lysodeikticus*, содержащие PGLU–PEG (концентрация от $7.8 \cdot 10^{-6}$ М до $5.0 \cdot 10^{-4}$ М). 0.5 мл суспензии клеток помещали в кварцевую кювету, которую инкубировали 3 мин в термостатируемом кюветном отделении спектрофотометра Beckman Coulter DU720 (Beckman Coulter, США) для прогрева клеточной суспензии до 25°C и регистрации фонового лизиса. Далее к суспензии клеток добавляли аликвоту водного раствора лизоцима (концентрация фермента в реакционной смеси была $3.5 \cdot 10^{-7}$ М) и регистрировали уменьшение мутности во времени до окончания лизиса. Активность фермента рассчитывали как тангенс угла наклона начального участка на кривой зависимости мутности от времени за вычетом фона.

Исследование взаимодействия лизоцима с блок-сополимерами PGLU–PEG на границе вода–воздух

Поверхностное натяжение растворов смесей лизоцима ($7.0 \cdot 10^{-6}$ М) с блок-сополимерами PGLU–PEG (концентрация от $7.8 \cdot 10^{-6}$ М до $2.0 \cdot 10^{-3}$ М) измеряли методом отрыва кольца. В качестве контроля измеряли поверхностное натяжение водных растворов лизоцима и блок-сополимеров без добавок в аналогичных концентрациях.

Исследование взаимодействия лизоцима с блок-сополимерами PGLU–PEG в объеме раствора

Спектры флуоресценции для лизоцима ($7.0 \cdot 10^{-6}$ М) в смесях с PGLU–PEG (от $7.8 \cdot 10^{-6}$ М до $5.0 \cdot 10^{-4}$ М) регистрировали с использованием спектрофлуориметра Spectramax M5 (Molecular Devices, США) при 25°C, длине оптического пути 10 мм, диапазоне длин волн от 290 до 400 нм с шагом 1 нм ($\lambda_{\text{ex}} = 280$ нм). Спектры кругового дихроизма при этих же концентрациях фермента и блок-сополимеров регистрировали при помощи КД-спектрометра Jasco–J815 (JASCO Corporation, Япония) при скорости сканирования 2 нм/с и длине оптического пути 1 мм.

ζ -потенциал смесей лизоцима с PGLU–PEG (водная среда, $7.0 \cdot 10^{-6}$ М лизоцима, от $7.8 \cdot 10^{-6}$ М до $5.0 \cdot 10^{-4}$ М PGLU–PEG) измеряли на анализаторе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, Великобритания). Использовали U-образные пластиковые кюветы с интегрированными золотыми электродами.

Для визуализации изображений частиц использовали просвечивающий электронный микроскоп JEM-1011 (JEOL Ltd, Япония) с боковой цифровой фотокамерой ORIUS SC1000W, работающей под управлением программы Digital Micrograph (GATAN, США). 10 мкл водного раствора образца наносили на медную сетку (диаметр 3 мм, 300 ячеек), покрытую ультратонкой углеродной пленкой, и выдерживали 2 мин. Избыток жидкости удаляли фильтровальной бумагой, сеточки с нанесенными образцами обрабатывали 1% раствором уранилацетата и снова выдерживали 2 мин. Избыток жидкости снова удаляли фильтровальной бумагой. Исследование образцов проводили при ускоряющем напряжении 80 кВ и 300000-кратном увеличении. Для определения размеров частиц и статистической обработки данных использовали программу ImageJ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изотермы поверхностного натяжения блок-сополимеров PGLU–PEG и их смесей с лизоцимом на границе вода–воздух

Было исследовано поверхностное натяжение трех серий растворов бинарных смесей блок-сополимеров PGLU–PEG с лизоцимом (концентрация лизоцима $7.0 \cdot 10^{-6}$ М, концентрация блок-сополимеров от $7.8 \cdot 10^{-6}$ М до $2.0 \cdot 10^{-3}$ М), растворов лизоцима и блок-сополимеров. Поверхностное натяжение раствора лизоцима составляет 68.5 ± 1.5 мН/м при концентрации фермента $7.0 \cdot 10^{-6}$ М. Полученное значение хорошо коррелирует с данными, приведенными в литературе. Для лизоцима в сопоставимых концентрациях $5.0 \cdot 10^{-6}$ М и $3.5 \cdot 10^{-6}$ М методом Вильгельми были получены значения поверхностного натяжения 70 и 62.5 мН/м соответственно [17, 18].

Линейные гидрофильные диблок-сополимеры PGLU₁₀–PEG, PGLU₁₀₀–PEG (от $7.8 \cdot 10^{-6}$ М до $2.0 \cdot 10^{-3}$ М) проявляют поверхностную активность в водных растворах, понижая поверхностное натяжение (рис. 1а, 1б) до определенного постоянного значения в 62–63 мН/м, которое сопоставимо со значениями, создаваемыми карбоксил-содержащими анионными полимерами [19].

Показано, что поверхностная активность полиакриловой кислоты массой 250 кДа зависела от состояния ее ионизации при 30°C, концентрации полимера $3 \cdot 10^{-9}$ М. Наиболее высокую

поверхностную активность полимер проявлял в кислых средах при небольшой степени ионизации. При pH 3.35 (степень ионизации 0.0) поверхностное натяжение на границе вода–воздух составляло ~68 мН/м, при pH 3.70 (степень ионизации 0.025) поверхностное натяжение было равно ~69 мН/м. При pH 6.34 (степень ионизации 0.3), 7.82 (степень ионизации 0.5), 11.0 (степень ионизации 1.0) полиакриловая кислота проявляла более низкую поверхностную активность. Это выражалось в том, что равновесное значение поверхностного натяжения находилось в диапазоне от ~71 мН/м (pH 6.34) до ~72.8 мН/м (pH 11.0) [19]. Увеличение степени ионизации карбоксильных групп полиакриловой кислоты затрудняло ее диффузию к границе раздела фаз из-за электростатического отталкивания молекул полимера от одноименно заряженной межфазной границы, создаваемой первыми адсорбированными молекулами [19–21]. Можно предположить, что по этой причине сильного снижения поверхностного натяжения блок-сополимерами (относительно поверхностного натяжения воды) не происходит. Известно, что при адсорбции высокомолекулярных соединений на границе раздела фаз их молекулы приобретают сложные конформации с образованием петель и хвостов [20].

На изотермах поверхностного натяжения PGLU₁₀–PEG или PGLU₁₀₀–PEG в смеси с лизоцимом можно выделить два участка: на первом поверхностное натяжение ниже поверхностного натяжения блок-сополимера и на втором поверхностное натяжение смеси не отличается от натяжения свободного блок-сополимера (рис. 1а, 1б). При Z 1:1 или 2:1 поверхностное натяжение смеси лизоцима с PGLU₁₀–PEG или с PGLU₁₀₀–PEG равно или немного ниже поверхностного натяжения лизоцима и блок-сополимера. Это означает, что на границе раздела фаз находится фермент или смешанный адсорбционный слой. При концентрациях PGLU₁₀–PEG или PGLU₁₀₀–PEG выше или равных $3.1 \cdot 10^{-5}$ М (Z 4:1) происходит полное вытеснение лизоцима с границы раздела фаз и поверхностное натяжение определяется блок-сополимером. Можно заключить, что в смесях лизоцима с блок-сополимерами на границе раздела фаз практически всегда находится блок-сополимер. Наиболее вероятно, что при концентрациях PGLU₁₀–PEG или PGLU₁₀₀–PEG выше или равных $3.1 \cdot 10^{-5}$ М независимо от длины PGLU весь лизоцим связывается с блок-сополимерами и находится в объеме раствора.

Взаимодействие лизоцима с блок-сополимерами PGLU–PEG в объеме раствора

Известно, что блок-сополимеры PGLU–PEG при взаимодействии с белками образуют

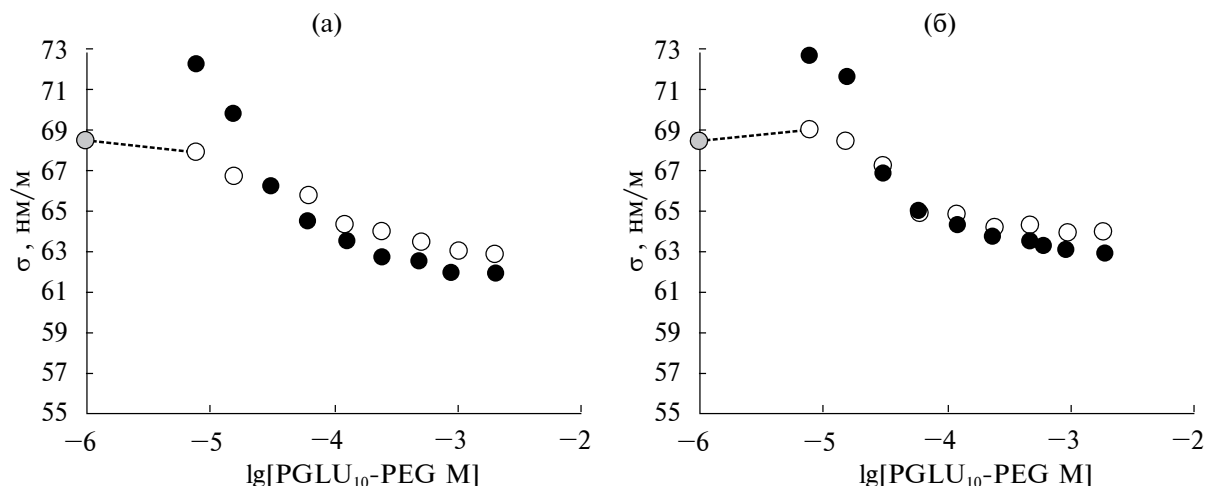


Рис. 1. Изотермы поверхностного натяжения для растворов блок-сополимеров PGLU₁₀-PEG (а), PGLU₁₀₀-PEG (б) в свободном состоянии и в смеси с лизоцимом ($7.0 \cdot 10^{-6}$ М) в водной среде при 25°C. Серые значки – лизоцим, черные значки – блок-сополимеры, белые значки – смеси лизоцима и блок-сополимеров.

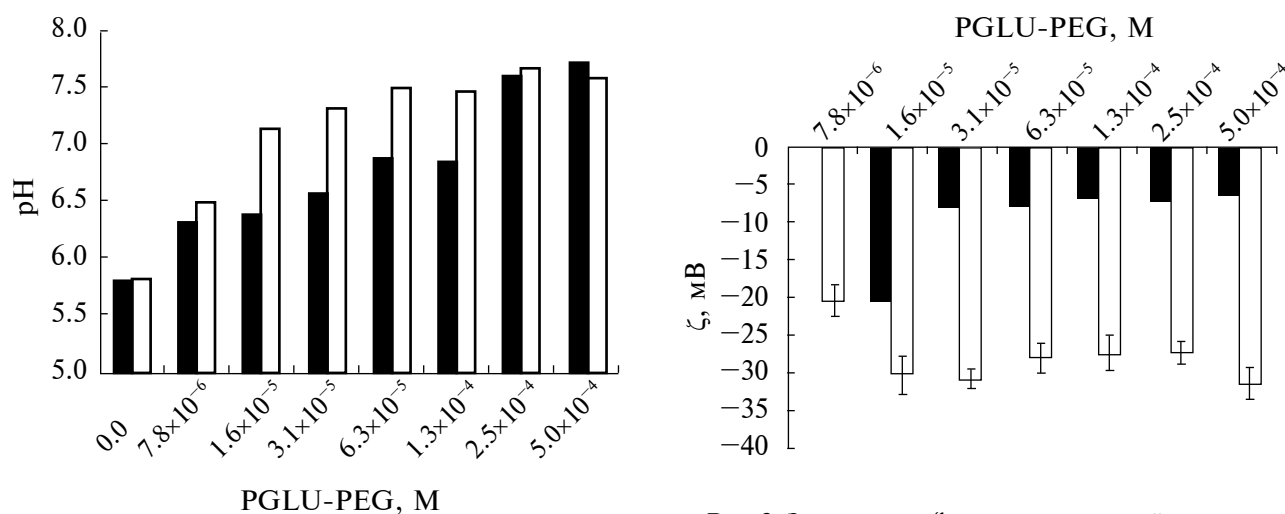


Рис. 2. Зависимость pH среды смесей лизоцима с блок-сополимерами от концентрации блок-сополимера. Черные столбцы – лизоцим с PGLU₁₀-PEG, белые столбцы – лизоцим с PGLU₁₀₀-PEG.

Рис. 3. Зависимость ζ -потенциала смесей лизоцима с блок-сополимерами от концентрации блок-сополимера. Черные столбцы – лизоцим с PGLU₁₀-PEG, белые столбцы – лизоцим с PGLU₁₀₀-PEG. Планки погрешностей обозначают разброс среднего значения ζ -потенциала.

блок-иономерные комплексы с ядром из поли(L-глутаминовой кислоты), содержащим биомолекулы, и оболочкой из PEG [1–4, 7]. Эта концепция была взята за основу при исследовании взаимодействия лизоцима ($7.0 \cdot 10^{-6}$ М) с блок-сополимерами PGLU-PEG (от $7.8 \cdot 10^{-6}$ М до $5.0 \cdot 10^{-4}$ М) при мольных соотношениях полимер: фермент (Z) от 1:1 до 70:1.

Растворы смесей лизоцима с блок-сополимерами PGLU-PEG имеют слабокислую или слабощелочную реакцию среды в зависимости от мольного соотношения блок-сополимер: фермент

(pH 6.3 при Z 1:1, pH 7.7 при Z 70:1, рис. 2). Натриевая соль поли(L-глутаминовой кислоты) – полиэлектролит, карбоксильные группы структурных звеньев которого могут связывать протоны из водной среды (растворы блок-сополимеров имеют слабощелочную реакцию среды, pH ~8). Раствор лизоцима ($7.0 \cdot 10^{-6}$ М) имеет слабокислый pH ~6. При смешивании растворов лизоцима и блок-сополимеров PGLU-PEG pH образующегося раствора при малых Z близок к pH раствора лизоцима, при высоких Z – к pH растворов блок-сополимеров. Еще раз отметим, что для проведения исследований

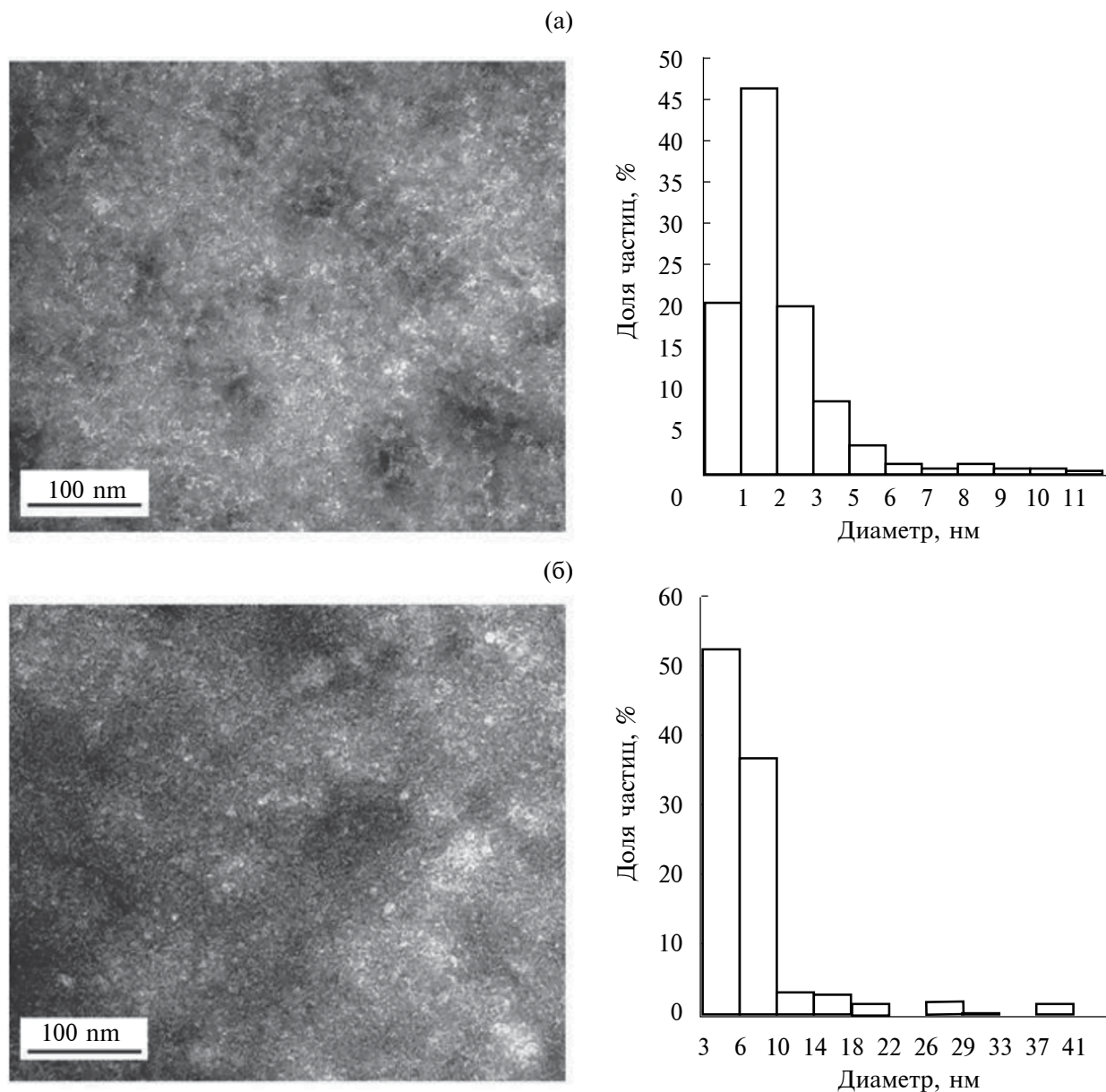


Рис. 4. ПЭМ-изображения и распределения частиц по размерам для блок-сополимера PGLU₁₀₀-PEG (a) и лизоцима с блок-сополимером PGLU₁₀₀-PEG, Z 18:1 (б).

pH растворов лизоцима с блок-сополимерами с pH ниже 7.0 доводили до значения 7.4–7.5.

При pH смесей лизоцима с блок-сополимерами молекулы фермента и блок-сополимеров характеризуются зарядами противоположного знака. Положительная величина заряда лизоцима обусловлена наличием заряженных групп, принадлежащих 6 остаткам лизина, 11 остаткам аргинина, 1 остатку гистидина. Заряд молекулы фермента при pH 7.5 составляет +7.0 [22]. При указанном pH молекула лизоцима характеризуется значением ζ -потенциала в +10–15 мВ [23].

Блок-сополимеры PGLU₁₀-PEG и PGLU₁₀₀-PEG характеризуются значениями ζ -потенциала в -15 ± 1 и -40 ± 2 мВ соответственно. Отрицательные значения ζ -потенциала обусловлены наличием ионизованных карбоксильных групп в молекулах PGLU-PEG.

При взаимодействии лизоцима с PGLU-PEG происходит частичная нейтрализация отрицательных зарядов карбоксильных групп блок-сополимеров положительными зарядами аминогрупп лизоцима. Это выражается в том, что ζ -потенциалы продуктов взаимодействия лизоцима

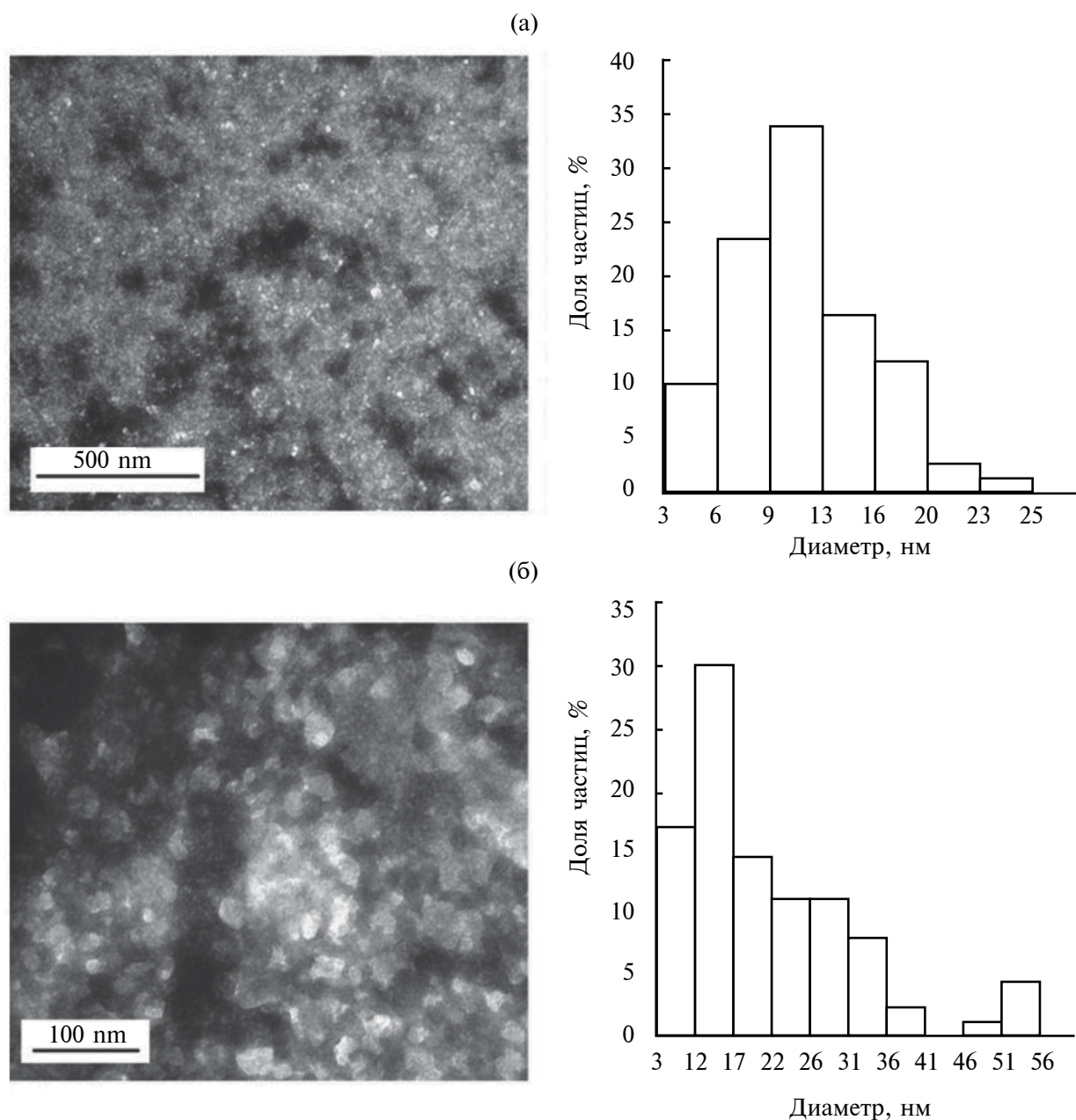


Рис. 5. ПЭМ-изображения и распределения частиц по размерам для блок-сополимера PGLU₁₀-PEG (а) и лизоцима с блок-сополимером PGLU₁₀-PEG, Z 18:1 (б).

с блок-сополимерами характеризуются небольшими отрицательными значениями, находящимися между ζ -потенциалами лизоцима и блок-сополимеров (рис. 3). ζ -потенциал продуктов взаимодействия лизоцима с PGLU₁₀-PEG соответствует ζ -потенциалу комплексов блок-сополимеров и белка со структурой типа ядро-оболочка, в ядро которых входят молекулы белка и PGLU, а оболочка состоит из PEG [24]. Продукты взаимодействия лизоцима с PGLU₁₀₀-PEG имеют достаточно высокий ζ -потенциал, это означает, что

вероятнее всего образуются “обычные” комплексы полимер-белок.

По мере увеличения концентрации блок-сополимера PGLU₁₀-PEG при постоянной концентрации лизоцима ζ -потенциал падает и при Z 4:1 принимает постоянное значение. При взаимодействии лизоцима с блок-сополимером PGLU₁₀₀-PEG выход ζ -потенциала на плато наблюдается при Z 2:1. Появление постоянного значения ζ -потенциала может означать окончание связывания лизоцима.

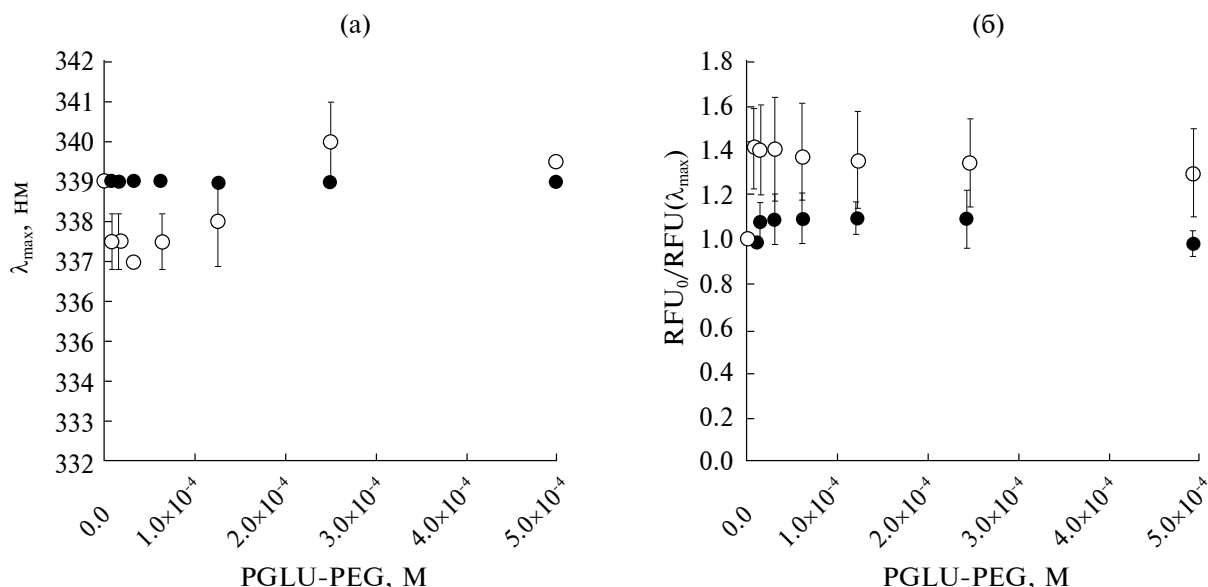


Рис. 6. Влияние блок-сополимеров на положение максимума интенсивности флуоресценции лизоцима (а), влияние блок-сополимеров на интенсивность максимума флуоресценции лизоцима (б). Черные значки — лизоцим с PGLU₁₀–PEG, белые значки — лизоцим с PGLU₁₀₀–PEG. λ_{max} — длина волны максимума интенсивности флуоресценции; RFU_0 — число единиц флуоресценции лизоцима при длине волны 339 нм (при λ_{max}); RFU — число единиц интенсивности флуоресценции лизоцима с блок-сополимером при длине волны 339 нм. $\text{RFU}_0/\text{RFU}(\lambda_{\text{max}})$ — отношение величины интенсивности максимума флуоресценции свободного лизоцима к величине интенсивности флуоресценции лизоцима с блок-сополимером при длине волны 339 нм.

Молекулы диблок-сополимеров в растворе ведут себя по-разному в зависимости от длины PGLU. Диблок-сополимер PGLU₁₀–PEG образует сферические или эллипсоидальные ассоциаты диаметром 10–15 нм с узким распределением по размерам. Блок-сополимер PGLU₁₀₀–PEG не склонен к ассоциации, в растворе находятся очень мелкие частицы диаметром 1–2 нм (рис. 4а, 5а). Молекулы блок-сополимеров PGLU₁₀₀–PEG обладают высоким значением ζ -потенциала, и межмолекулярное электростатическое отталкивание, вероятно, препятствует образованию ассоциатов.

При взаимодействии лизоцима с PGLU₁₀₀–PEG и PGLU₁₀–PEG значительного увеличения размеров частиц (по сравнению с размерами блок-сополимера) не наблюдается (рис. 4б, 5б). Взаимодействие PGLU₁₀₀–PEG с лизоцимом (Z 18:1) приводит к укрупнению частиц от 1–2 нм (для PGLU₁₀₀–PEG) до 3–10 нм. Частицы ассоциатов с ζ -потенциалом в –30 мВ отталкиваются друг от друга, что предотвращает их укрупнение. Частицы со средним диаметром в 12–17 нм и образуются при взаимодействии лизоцима с PGLU₁₀–PEG (Z 18:1), как уже было сказано выше, это, скорее всего, комплексы со структурой по типу ядро–оболочка.

Можно заключить, что при взаимодействии лизоцима с блок-сополимерами PGLU–PEG есть возможность регулирования физико-химических свойств образующихся комплексов

путем изменения количественного состава молекул блок-сополимеров. Наноразмерные комплексы ядро–оболочка получаются при взаимодействии лизоцима с PGLU₁₀–PEG. С блок-сополимерами PGLU₁₀₀–PEG лизоцим образует комплексы без мицеллоподобной структуры.

Флуоресцентная спектроскопия широко используется при исследовании взаимодействия белков с разными лигандами. Как правило, флуоресцентную спектроскопию используют для детектирования изменений третичной структуры белков. Молекула лизоцима содержит 6 остатков триптофана: Trp28, Trp62, Trp63, Trp108, Trp111, Trp123. Флуоресценция лизоцима обусловлена почти на 80% флуоресценцией Trp62 и Trp108, флуоресценция Trp63, Trp111 и Trp123 гасится из-за наличия рядом дисульфидных связей Cys76–Cys94 и Cys6–Cys127 [25, 26]. Trp62, Trp63 и Trp108 расположены в активном центре лизоцима, Trp28 и Trp111 расположены во внутренней гидрофобной области, Trp12 расположен на внешней стороне белковой глобулы [27].

Спектр флуоресценции лизоцима характеризуется наличием максимума эмиссии флуоресценции (λ_{max}) при длине волны 339 ± 2 нм. Взаимодействие лизоцима с PGLU₁₀–PEG, PGLU₁₀₀–PEG вызывает колебания положения максимума флуоресценции фермента (λ_{max}) в пределах погрешности измерения (рис. 6а). Слабое тушение

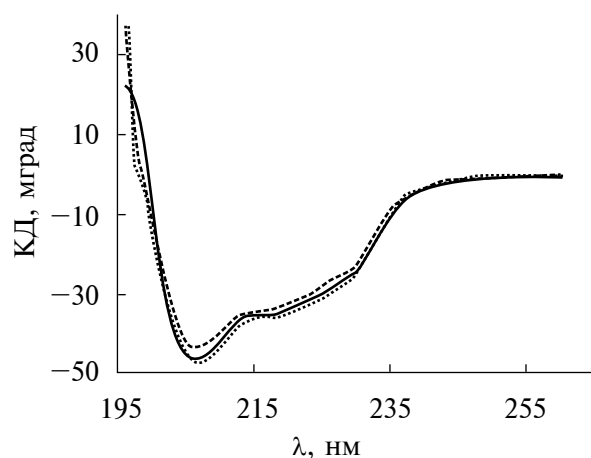


Рис. 7. КД-спектры свободного лизоцима и фермента в составе ассоциатов с блок-сополимерами PGLU₁₀–PEG, PGLU₁₀₀–PEG. Черная линия – свободный лизоцим, черный пунктир – лизоцим с PGLU₁₀₀–PEG (Z 18:1), серый пунктир – лизоцим с PGLU₁₀–PEG (Z 18:1).

флуоресценции лизоцима (возрастание RFU₀/RFU, где RFU₀ – число единиц флуоресценции лизоцима при длине волны 339 нм, RFU – число единиц флуоресценции при 339 нм для лизоцима в комплексе с блок-сополимером) начинается при Z 1:1 (для PGLU₁₀₀–PEG) или при Z 2:1 (для PGLU₁₀–PEG) и далее с увеличением Z остается постоянным. Увеличение длины PGLU способствует усилению тушения флуоресценции лизоцима от 7–10% (для PGLU₁₀–PEG) до 30–40% (для PGLU₁₀₀–PEG) (рис. 6б). Отсутствие зависимости тушения триптофановой флуоресценции лизоцима от концентрации блок-сополимеров означает, что межмолекулярные взаимодействия фермента и блок-сополимеров носят локальный характер. Более того, так как тушение слабое и нет смещения максимума эмиссии флуоресценции для фермента при взаимодействии с блок-сополимерами, то можно заключить, что третичная структура лизоцима сохраняется.

При ассоциации лизоцима с блок-сополимерами PGLU–PEG не происходит изменения формы и интенсивности сигнала спектров КД для фермента (рис. 7). Это означает, что не происходит изменения вторичной структуры молекул фермента.

Самым важным свойством лизоцима является его бактерицидное действие, фермент специфичен к грамположительным микроорганизмам. Было исследовано влияние блок-сополимеров на антимикробную активность лизоцима с использованием в качестве субстрата клеток *M. lysodeikticus*. Влияние полианионов на активность лизоцима исследовалось и ранее. Гликопротеин муцин из

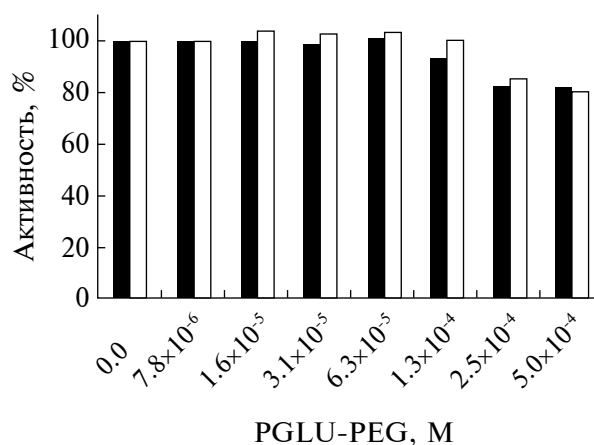


Рис. 8. Влияние блок-сополимеров на активность лизоцима. Черные столбцы – лизоцим с PGLU₁₀–PEG, белые столбцы – лизоцим с PGLU₁₀₀–PEG.

желудка свиньи вследствие своей высокой способности к адгезии к клеточным стенкам блокировал доступ лизоцима к пептидогликану, и активность фермента существенно падала [23]. Альгинаты высокой и низкой вязкостей формировали прочные комплексы с лизоцимом и создавали стерические затруднения при взаимодействии фермента с клеточной стенкой [28]. Блок-сополимеры PGLU–PEG не оказывают существенного влияния на активность лизоцима (активность фермента сохраняется на уровне 80–100%) во всем диапазоне исследуемых концентраций (вплоть до $5.0 \cdot 10^{-4}$ М) вне зависимости от длины PGLU (рис. 8). Эти данные согласуются с тем, что активный центр фермента не вовлечен во взаимодействие между ним и блок-сополимерами.

Ранее было установлено, что включение лизоцима в комплексы с PEG_{12k}–pAsp₃₄–NH₂ (аналогом PGLU–PEG) со структурой по типу ядро–оболочка приводило к увеличению активности фермента при гидролизе NP–(GlcNAc)₄ за счет накопления этого субстрата в ядре [9]. Пептидогликан клеточных стенок представляет собой гигантскую полимерную сетку, и его накопление в наночастицах невозможно. В связи с этим важно исследовать активность лизоцима именно при гидролизе высокомолекулярного субстрата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При взаимодействии лизоцима белка куриного яйца с блок-сополимерами PGLU₁₀–PEG, PGLU₁₀₀–PEG поверхностное натяжение на границе раздела вода–воздух определяется

блок-сополимером при мольном соотношении блок-сополимер: фермент выше 2 : 1. При мольном соотношении ниже или равном 2 : 1 возможно существование смешанных адсорбционных слоев. При взаимодействии лизоцима с блок-сополимерами PGLU–PEG в объеме раствора образуются наноразмерные комплексы с отрицательным ζ -потенциалом. Выявлена возможность регуляции размеров комплексов и их структуры путем изменения длины PGLU в молекулах блок-сополимеров. С блок-сополимерами PGLU₁₀₀–PEG лизоцим образует комплексы, в которых на одну молекулу фермента приходится 1–2 молекулы блок-сополимера. PGLU₁₀–PEG при взаимодействии с лизоцимом образует комплексы с оболочкой из PEG и ядром из PGLU и лизоцима, при этом на одну молекулу фермента приходится 2–4 молекулы блок-сополимера. Взаимодействие с блок-сополимерами сопровождается сохранением вторичной и третичной структуры фермента и не приводит к изменению бактерицидной активности лизоцима.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена по госбюджетной тематике НИР 123032300028-0.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

БЛАГОДАРНОСТИ

В работе использовалось оборудование общефакультетской лаборатории электронной микроскопии Биологического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова. Центр коллективного пользования “Электронная микроскопия в науках о жизни”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Basso A., Serban S. Industrial applications of immobilized enzymes—A review // *Molecular Catalysis*. 2019. V. 479. P. 110607. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607>
2. Dong–Mei L., Chen D. Recent advances in nano-carrier immobilized enzymes and their applications // *Process Biochemistry*. 2020. V. 92. P. 464–475. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.02.005>
3. Bilal M., Hussain N., Heloisa J., Américo–Pinheiro P., Almulaiky Y., Iqbal H.M.N. Multi-enzyme co-immobilized nano-assemblies: Bringing enzymes together for expanding bio-catalysis scope to meet biotechnological challenges // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021. V. 186. P. 735–749. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.064>
4. Tan Z., Cheng H., Chen G., Ju F., Fernández–Lucas J., Zdarta J., Jesionowski T., Bilal M. Designing multifunctional biocatalytic cascade system by multi-enzyme co-immobilization on biopolymers and nanostructured materials // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023. V. 227. P. 535–550. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.12.074>
5. Wu F.G., Jiang Y.W., Chen Z., Yu Z.W. Folding behaviors of protein (lysozyme) confined in polyelectrolyte complex micelle // *Langmuir*. 2016. V. 32. № 15. P. 3655–3664. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b00235>
6. Zhao Y., Haney M.J., Klyachko N.L., Li S., Booth S.L., Higginbotham S.M., Jones J., Zimmerman M.C., Lee Mosley R., Kabanov A.V., Gendelman H.E., Batrakova E.V. Polyelectrolyte complex optimization for macrophage delivery of redox enzyme nanoparticles // *Nanomedicine*. 2011. V. 6. № 1. P. 25–42. <https://doi.org/10.2217/nnm.10.129>
7. Lee Y., Ishii T., Cabral H., Kim H.J., Seo J–H., Nishiyama N., Oshima H., Osada K., Kataoka K. Charge-conversional polyionic complex micelles – efficient nanocarriers for protein delivery into cytoplasm // *Angewante Chemie International Edition*. 2009. V. 48. № 29. P. 5309–5312. <https://doi.org/10.1002/anie.200900064>
8. Jundi A. El., Buwalda S.J., Bakkour Y., Garrie X., Nottelet B. Double hydrophilic block copolymers self-assemblies in biomedical Applications // *Advances in Colloid and Interface Science*. 2020. V. 283. P. 102213. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102213>
9. Yuan X., Yamasaki Y., Harada A., Kataoka K. Characterization of stable lysozyme–entrapped polyion complex (PIC) micelles with crosslinked core by glutaraldehyde // *Polymer*. 2005. № 18. V. 46. P. 7749–7758. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.02.121>
10. Harada A., Kataoka K. Novel polyion complex micelles entrapping enzyme molecules in the core: preparation of narrowly-distributed micelles from lysozyme and poly(ethylene glycol)–poly(aspartic acid) block copolymer in aqueous medium // *Macromolecules*. 1998. V. 31. № 2. P. 288–294. <https://doi.org/10.1021/ma971277v>
11. Ferraboschi P., Ciceri S., Grisenti P. Applications of lysozyme, an innate immune defense factor, as an alternative antibiotic // *Antibiotics*. 2021. V. 10. № 12. P. 1534. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121534>
12. Liu Y., Sun Y., Xu Y., Feng H., Fu S., Tang J., Liu W., Sun D., Jiang H., Xu S. Preparation and evaluation of lysozyme–loaded nanoparticles coated with poly- γ -glutamic acid and chitosan // *International*

- Journal of Biological Macromolecules. 2013. V. 59. P. 201–207.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.065>
13. Vilcacundo R., M'endez P., Reyes P., Romero H., Pinto A., Carrillo W. Antibacterial activity of hen egg white lysozyme denatured by thermal and chemical treatments // *Scientia Pharmaceutica*. 2018. V. 86. № 4. P. 48.
<https://doi.org/10.3390/scipharm86040048>
 14. Cegielska–Radziejewska R., Leśnierowski G., Kijowski J. Properties and application of egg white lysozyme and its modified preparations – a review // *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2008. V. 58. № 1. P. 5–10.
 15. Aminlari L., Mohammadi Hashemi M., Aminlari M. Modified lysozymes as novel broad spectrum natural antimicrobial agents in foods // *Journal of Food Science*. 2014. V. 79. № 6. P. R1077–R1090.
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.12460>
 16. Avila M., Gómez–Torres N., Hernández M., Garde S. Inhibitory activity of reuterin, nisin, lysozyme and nitrite against vegetative cells and spores of dairy–related *Clostridium* species // *International Journal of Food Microbiology*. 2014. V. 172. P. 70–75.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.002>
 17. Tihonov M.M., Kim V.V., Noskov B.A. Impact of a reducing agent on the dynamic surface properties of lysozyme solutions // *Journal of Oleo Sciences*. 2016. V. 65. № 5. P. 413–418.
<https://doi.org/10.5650/jos.ess15247>
 18. Милыева О.Ю. Динамические поверхностные свойства растворов комплексов белков и полиэлектролитов. Дисс. канд. хим. наук. 2015.
 19. Ishimuro Y., Ueberreiter K. The surface tension of poly(acrylic acid) in aqueous solution // *Colloid and polymer Science*. 1980. V. 258. P. 928–931.
<https://doi.org/10.1007/BF01584922>
 20. Айдарова С.Б., Алимбекова Г.К., Оспанова Ж.Б., Мусабеков К.Б., Миллер Р. Поверхностное натяжение водных растворов поливинилового спирта и его бинарных смесей с Тритоном X-100 // *Известия Национальной Академии Наук Республики Казахстан. Серия химии и технологии*. 2012. № 2. С. 49–55.
 21. Файнерман В.Б. Кинетика формирования адсорбционных слоев на границе раздела раствор–воздух // *Успехи химии*. 1985. Т. 54. № 10. С. 1613–1631.
<https://doi.org/10.1070/RC1985v054n10ABEH003150>
 22. Guseman A.J., Speer S.L., Perez Goncalves G.M., Pielak G.J. Surface–charge modulates protein–protein interactions in physiologically–relevant environments // *Biochemistry*. 2018. V. 57. № 11. P. 1681–1684.
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00061>
 23. Filatova L., Emelianov G., Balabushevich N., Klyachko N. Supramolecular assemblies of mucin and lysozyme: Formation and physicochemical characterization // *Process Biochemistry*. 2022. V. 113. P. 97–106.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.12.022>
 24. Shin S.H.R., McAninch P.T., Henderson I.M., Gomez A., Greene A.C., Carnes E.C., Paxton W.F. Self–assembly/disassembly of giant double–hydrophilic polymer–somes at biologically–relevant pH // *Chemical Communications Journal*. 2018. V. 54. № 65. P. 9043–9046.
<https://doi.org/10.1039/C8CC05155K>
 25. D'Auria S., Staiano M., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K. The combined use of fluorescence spectroscopy and X–ray crystallography greatly contributes to elucidating structure and dynamics of proteins // *Reviews in Fluorescence* 2005. Boston: Springer, 2007.
https://doi.org/10.1007/0-387-23690-2_2
 26. Chen B., Zhang H., Xi W., Zhao L., Liang L., Chen Y. Unfolding mechanism of lysozyme in various urea solutions: Insights from fluorescence spectroscopy // *Journal of Molecular Structure*. 2014. V. 1076. P. 524–528.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.08.023>
 27. Blake C.C., Koenig D.F., Mairv G.A., North A.C., Phillips D.C., Sarma V.R. Structure of hen egg–white lysozyme: A three–dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution // *Nature*. 1965. V. 206. № 4986. P. 757–761.
<https://doi.org/10.1038/206757a0>
 28. Filatova L., Balabushevich N., Klyachko N. A physicochemical, structural, microbiological and kinetic study of hen egg white lysozyme in complexes with alginate and chitosan // *Biocatalysis and Biotransformation*. 2022. V. 40. № 5. P. 327–340.
<https://doi.org/10.1080/10242422.2021.1909001>