КОЛЛОИДНЫЙ ЖУРНАЛ, 2024, том 86, № 2, с. 276–285

УДК 544.77.051.6

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИЗОЦИМА С БЛОК-СОПОЛИМЕРАМИ PGLU–PEG

© 2024 г. Л. Ю. Филатова[1, *], Н. Г. Балабушевич[1]

[1]Московский 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 ($PGLU_{10}$–PEG, $PGLU_{100}$–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 $PGLU_{10}$–PEG и лизоцима со структурой типа ядро–оболочка и комплексов блок-сополимера $PGLU_{100}$–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 обусловливает 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–ацетилмурамовой кислотой и N–ацетил–d–глюкозоамином 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 лиофилизованный, 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 ($PGLU_{10}$ 1.5 кДа и $PGLU_{100}$ 15.0 кДа) и полиэтиленгликоля массой 5 кДа (114 структурных звеньев): $PGLU_{10}$–PEG (M_w 6.5 кДа), $PGLU_{100}$–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 $7.0 \cdot 10^{-6}$ M и концентрациями PGLU–PEG от $7.8 \cdot 10^{-6}$ M до $2.0 \cdot 10^{-3}$ M. Для проведения тензиометрии, спектроскопических исследований, измерения ζ-потенциала и размера частиц pH растворов с pH ниже 7.0 доводили до 7.4–7.5 при помощи растворов NaOH в концентрации 1 M и 0.1 M. 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 $7.8 \cdot 10^{-6}$ M до $5.0 \cdot 10^{-4}$ M*)*. 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 $3.5 \cdot 10^{-7}$ M) 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 ($7.0 \cdot 10^{-6}$ M) с блок-сополимерами PGLU–PEG (концентрация от $7.8 \cdot 10^{-6}$ M до $2.0 \cdot 10^{-3}$ M) 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 ($7.0 \cdot 10^{-6}$ M) в смесях с PGLU–PEG (от $7.8 \cdot 10^{-6}$ M до $5.0 \cdot 10^{-4}$ M) 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 (λ_{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 уранилацетета 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 $PGLU_{10}$–PEG, $PGLU_{100}$–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 $PGLU_{10}$–PEG или $PGLU_{100}$–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 $PGLU_{10}$–PEG или с $PGLU_{100}$–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 $PGLU_{10}$–PEG или $PGLU_{100}$–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 $PGLU_{10}$–PEG или $PGLU_{100}$–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

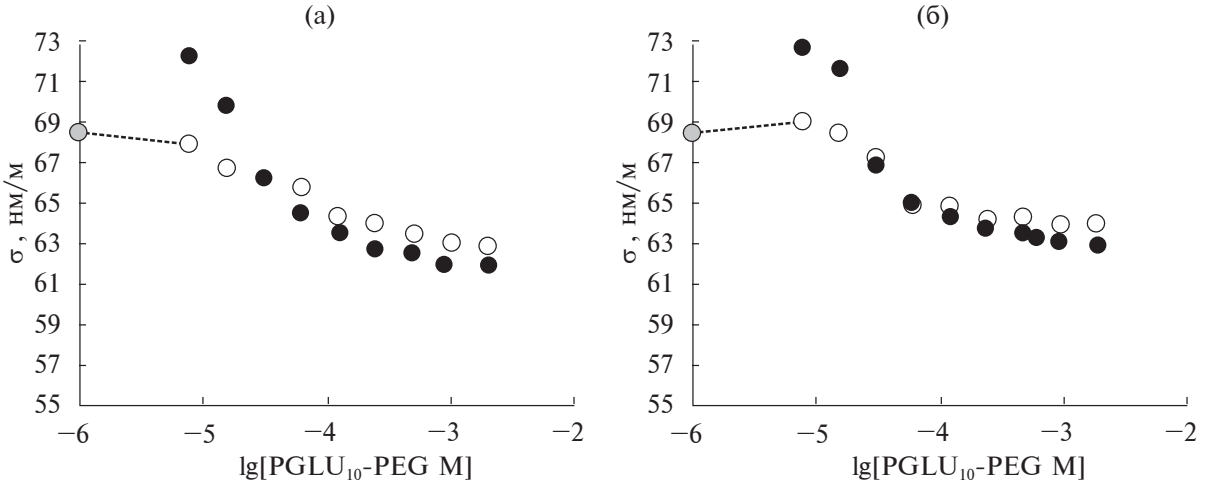

Рис. 1. Изотермы поверхностного натяжения для растворов блок-сополимеров $PGLU_{10}$–PEG (а), $PGLU_{100}$–PEG (б) в свободном состоянии и в смеси с лизоцимом ($7.0 \cdot 10^{-6}$ М) в водной среде при 25°C. Серые значки – лизоцим, черные значки – блок-сополимеры, белые значки – смеси лизоцима и блок-сополимеров.

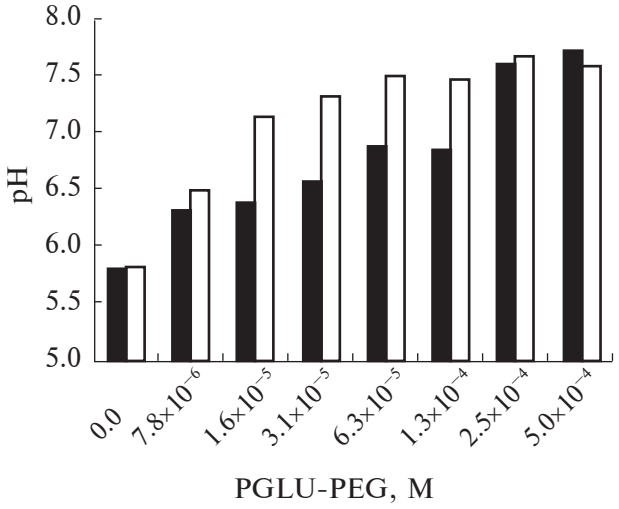

Рис. 2. Зависимость pH среды смесей лизоцима с блок-сополимерами от концентрации блок-сополимера. Черные столбцы – лизоцим с $PGLU_{10}$–PEG, белые столбцы – лизоцим с $PGLU_{100}$–PEG.

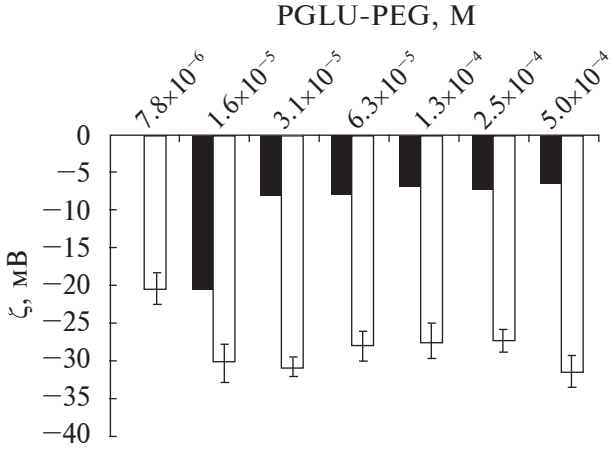

Рис. 3. Зависимость ζ-потенциала смесей лизоцима с блок-сополимерами от концентрации блок-сополимера. Черные столбцы – лизоцим с $PGLU_{10}$–PEG, белые столбцы – лизоцим с $PGLU_{100}$–PEG. Планки погрешностей обозначают разброс среднего значения ζ-потенциала.

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

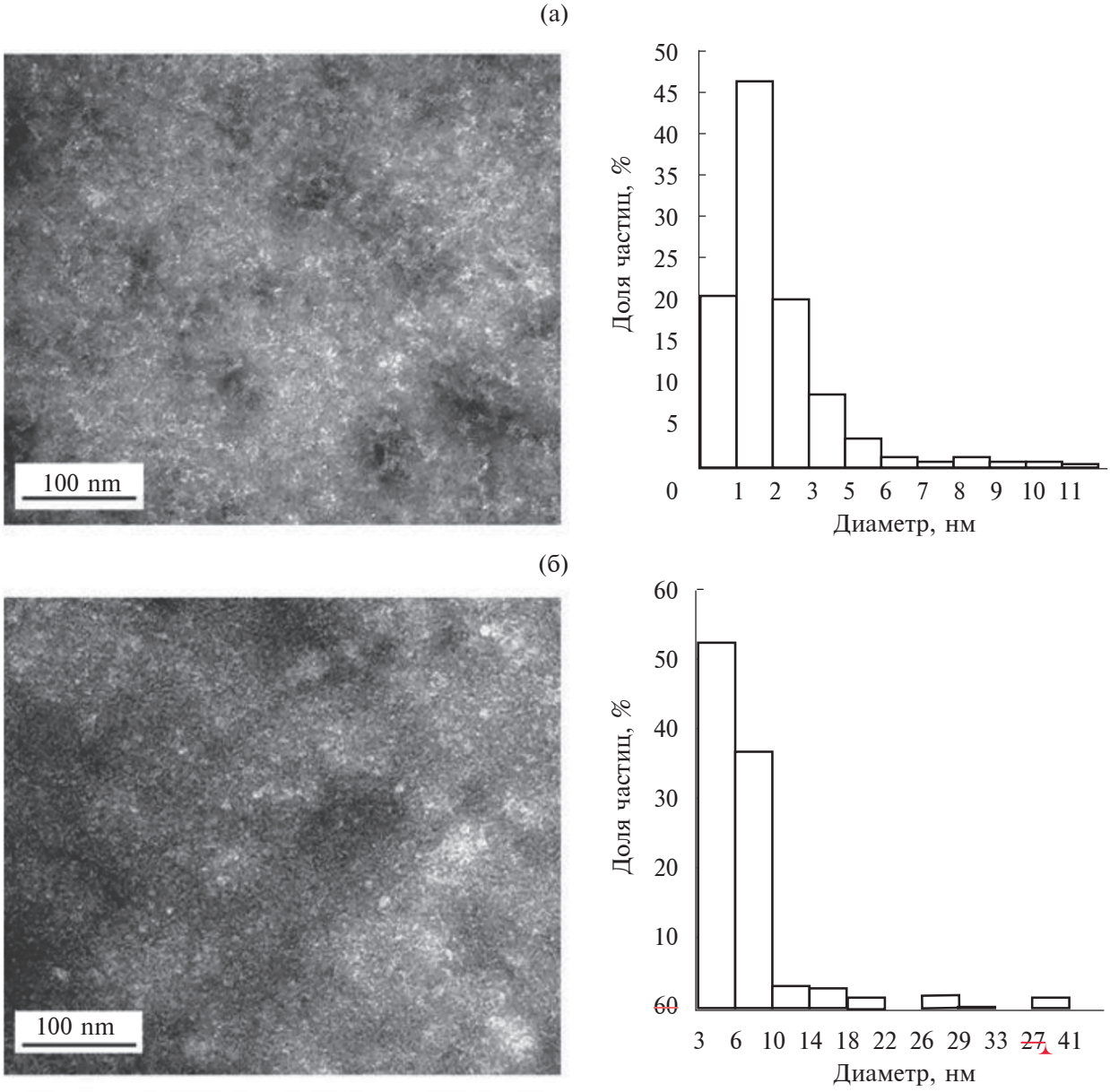

Рис. 4. ПЭМ–изображения и распределения частиц по размерам для блок-сополимера $PGLU_{100}$–PEG (а) и лизоцима с блок-сополимером $PGLU_{100}$–PEG, Z 18 : 1 (б).

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 $PGLU_{10}$–PEG и $PGLU_{100}$–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

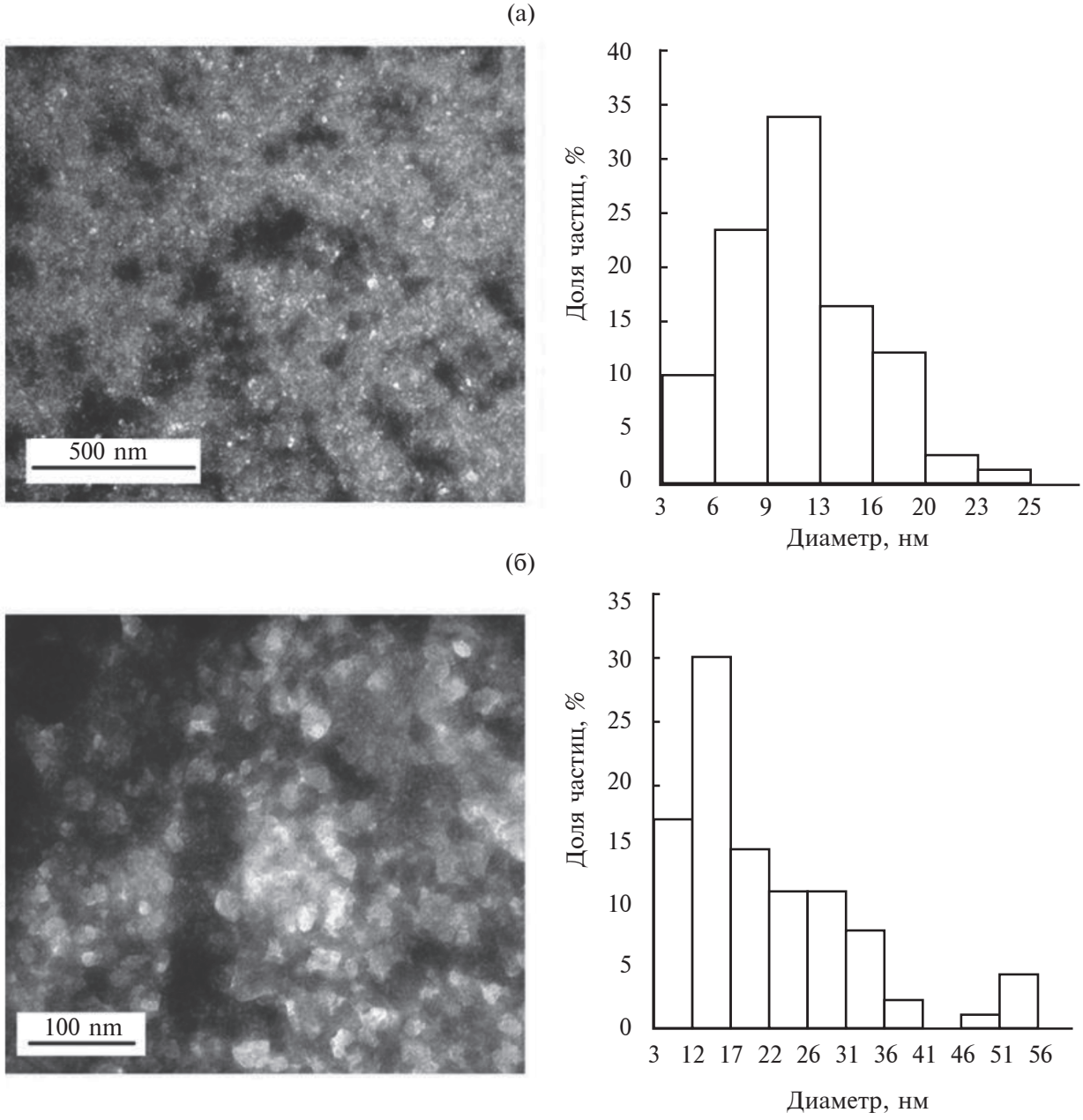

Рис. 5. ПЭМ-изображения и распределения частиц по размерам для блок-сополимера $PGLU_{10}$–PEG (а) и лизоцима с блок-сополимером $PGLU_{10}$–PEG, Z 18 : 1 (б).

с блок-сополимерами характеризуются небольшими отрицательными значениями, находящимися между ζ-потенциалами лизоцима и блок-сополимеров (рис. 3). ζ-потенциал продуктов взаимодействия лизоцима с $PGLU_{10}$–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 $PGLU_{100}$–PEG имеют достаточно высокий ζ-потенциал, это означает, что вероятнее всего образуются “обычные” комплексы полимер–белок.

По мере увеличения концентрации блок-сополимера $PGLU_{10}$–PEG при постоянной концентрации лизоцима ζ-потенциал падает и при Z 4 : 1 принимает постоянное значение. При взаимодействии лизоцима с блок-сополимером $PGLU_{100}$–PEG выход ζ-потенциала на плато наблюдается при Z 2 : 1. Появление постоянного значения ζ-потенциала может означать окончание связывания лизоцима.

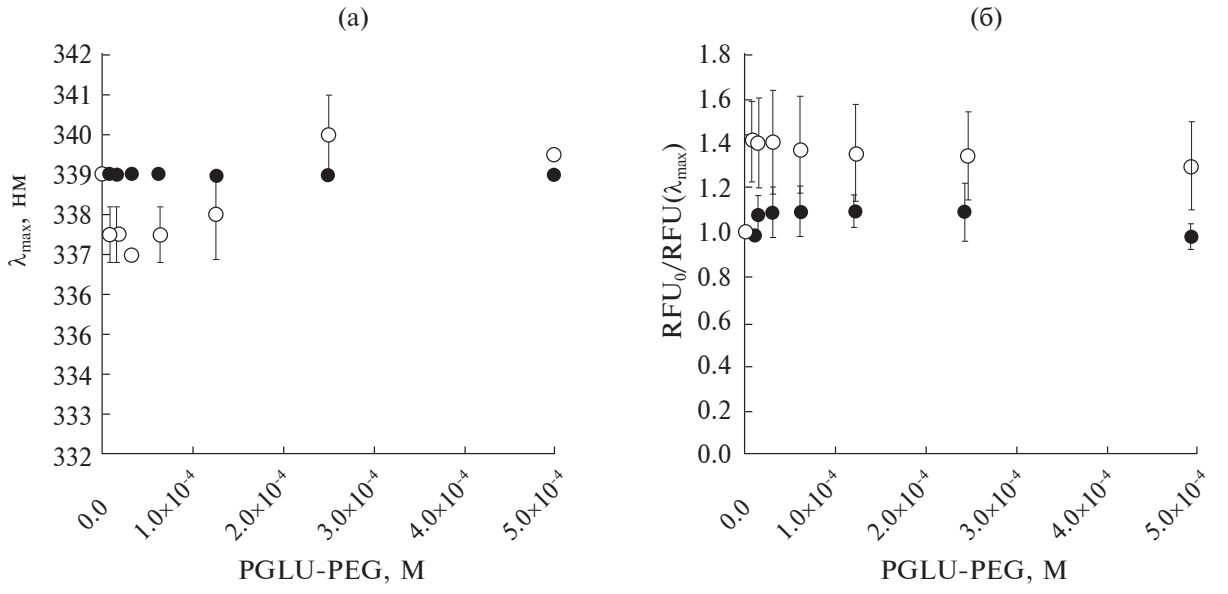

Рис. 6. Влияние блок-сополимеров на положение максимума интенсивности флуоресценции лизоцима (а), влияние блок-сополимеров на интенсивность максимума флуоресценции лизоцима (б). Черные значки – лизоцим с $PGLU_{10}$–PEG, белые значки – лизоцим с $PGLU_{100}$–PEG. λ_{max} – длина волны максимума интенсивности 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. RFU_0/RFU (λ_{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 $PGLU_{10}$–PEG образует сферические или эллипсоидальные ассоциаты диаметром 10–15 нм с узким распределением по размерам. Блок-сополимер $PGLU_{100}$–PEG не склонен к ассоциации, в растворе находятся очень мелкие частицы диаметром 1–2 нм (рис. 4а, 5а). Молекулы блок-сополимеров $PGLU_{100}$–PEG обладают высоким значением ζ-потенциала, и межмолекулярное электростатическое отталкивание, вероятно, препятствует образованию ассоциатов.

При взаимодействии лизоцима с $PGLU_{100}$–PEG и $PGLU_{10}$–PEG значительного увеличения размеров частиц (по сравнению с размерами блок-сополимера) не наблюдается (рис. 4б, 5б). Взаимодействие $PGLU_{100}$–PEG с лизоцимом (Z 18 : 1) приводит к укрупнению частиц от 1–2 нм (для $PGLU_{100}$–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 $PGLU_{10}$–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 $PGLU_{10}$–PEG. С блок-сополимерами $PGLU_{100}$–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 $PGLU_{10}$–PEG, $PGLU_{100}$–PEG вызывает колебания положения максимума флуоресценции фермента (λ_{max}) в пределах погрешности измерения (рис. 6а). Слабое тушение

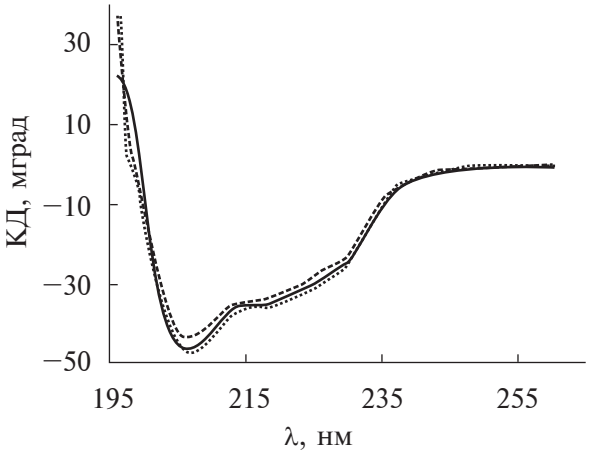

Рис. 7. КД-спектры свободного лизоцима и фермента в составе ассоциатов с блок-сополимерами $PGLU_{10}$–PEG, $PGLU_{100}$–PEG. Черная линия – свободный лизоцим, черный пунктир – лизоцим с $PGLU_{100}$–PEG (Z 18 : 1), серый пунктир – лизоцим с $PGLU_{10}$–PEG (Z 18 : 1).

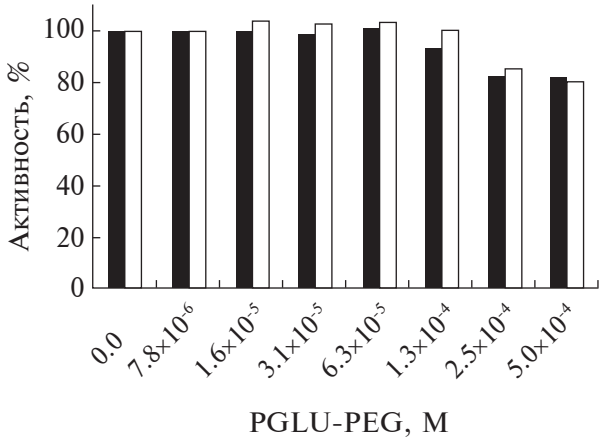

Рис. 8. Влияние блок-сополимеров на активность лизоцима. Черные столбцы – лизоцим с $PGLU_{10}$–PEG, белые столбцы – лизоцим с $PGLU_{100}$–PEG.

флуоресценции лизоцима (возрастание RFU_0/RFU, где RFU_0 – 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 $PGLU_{100}$–PEG) или при Z 2 : 1 (для $PGLU_{10}$–PEG) и далее с увеличением Z остается постоянным. Увеличение длины PGLU способствует усилению тушения флуоресценции лизоцима от 7–10% (для $PGLU_{10}$–PEG) до 30–40% (для $PGLU_{100}$–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 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}–$pAsp_{34}$–NH_2 (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 $PGLU_{10}$–PEG, $PGLU_{100}$–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 $PGLU_{100}$–PEG лизоцим образует комплексы, в которых на одну молекулу фермента приходится 1–2 молекулы блок-сополимера. $PGLU_{10}$–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., Garric 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., Le´snierowski 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., G´omez–Torres N., Hern´andez 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. *Миляева 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 Х-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 polymersomes 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