

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М. В. ЛОМОНОСОВА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи



Скребкова Анна Сергеевна

**Особенности взаимодействия лизоцима с мирамистином,
амикацином, левофлоксацином и даларгином по данным
радиохимических и спектроскопических методов анализа**

1.4.13. – Радиохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

кандидата химических наук

Научные руководители:
к.х.н., доцент Бадун Г.А.
д.х.н., доцент Чернышева М.Г.

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
1.1. Взаимодействие белков с лекарственными средствами и биологически активными веществами.....	9
1.1.1. Направления исследований взаимодействия белков с лекарственными средствами	9
1.1.2. Модельные белки	11
1.1.3. Лизоцим.....	12
1.1.4. Взаимодействие лизоцима с лекарственными средствами и биологически активными веществами	15
1.1.5. Методы, применяемые для исследования взаимодействий белок-лиганд.....	17
1.2. Адсорбция белков (лизоцима) на межфазных границах	26
1.2.1. Исследование адсорбции белков	26
1.2.2. Исследование взаимодействий белков с лигандами в адсорбционном слое	31
1.2.3. Математические расчеты. Модель Файнермана	34
1.3. Радиохимический подход к исследованию.....	38
1.3.1. Адсорбция белков, меченных углеродом-14.....	40
1.3.2. Получение меченных тритием соединений.....	42
1.3.3. Метод термической активации трития	46
1.3.4. Тритиевая планиграфия биологических макромолекул (белков)	50
1.3.5. Метод сцинтиллирующей фазы (возможности и применение).....	55
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	60
2.1. Материалы.....	60
2.2. Введение тритиевой метки в лизоцим и лекарственные средства и их очистка	63
2.3. Метод сцинтиллирующей фазы	66
2.4. Аминокислотный и пептидный анализ	68
2.5. Методы молекулярной спектроскопии	70
2.5.1. Флуоресцентная спектроскопия	70
2.5.2. Спектроскопия кругового дихроизма	71
2.6. Тензиометрия (метод висящей капли)	71

2.7. Турбидиметрический метод (измерение ферментативной активности).....	72
2.8. Молекулярный докинг	73
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	74
3.1. Получение меченных тритием лизоцима, мирамистина, амикацина, левофлоксацина и даларгина.....	74
3.2. Взаимное влияние лизоцима и лекарственных средств при конкурентной адсорбции на межфазных границах водный раствор/ <i>n</i> -ксилол и водный раствор/воздух	82
3.3. Исследование комплексов лизоцим-лекарственное средство с помощью атомарного трития.....	104
3.4. Влияние комплексообразования с лекарственными средствами на структуру и ферментативную активность лизоцима	111
3.5. Молекулярный докинг	118
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	126
ВЫВОДЫ.....	128
Список сокращений	130
Список литературы	131
Благодарности	158

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Лекарственное средство (ЛС)¹ при попадании в организм может вступать во взаимодействие с белками, в частности с лизоцимом – ферментом, входящим в состав оболочек, контактирующих с окружающей средой, что оказывает непосредственное влияние на биодоступность, биоэквивалентность и эффективность действия препарата. При обратимом связывании с молекулами белков возможно пролонгированное или отсроченное высвобождение ЛС, что увеличивает его эффективность [1]. Исследование таких взаимодействий интересно как с практической, так и с фундаментальной точки зрения. Получение новой системной информации о взаимодействии белок-ЛС на молекулярном уровне позволит на этапе разработки учитывать влияние, которое эти взаимодействия оказывают на эффективность ЛС. Ценную информацию о таких взаимодействиях можно получить *in vitro*. Для попадания вещества в клетку необходимо преодолеть клеточную мембрану, и в качестве простейшей модели клеточной мембраны в экспериментах *in vitro* может выступать межфазная граница вода-органическая жидкость. Поэтому интерес вызывает не только взаимодействие белок-ЛС, но и влияние, которое данное взаимодействие оказывает на способность ЛС проникать через межфазную границу. Определить количество вещества, адсорбированного на межфазной границе, а также перешедшего в органическую фазу можно с использованием меченных тритием соединений и метода сцинтиллирующей фазы.

Степень разработанности темы. Несмотря на то, что количество исследований взаимодействия белков с ЛС растет, исследований взаимодействий ЛС с лизоцимом сравнительно немного. В основном исследования сосредоточены на одном веществе или нескольких веществах, обладающих схожей структурой. Преимущественно исследуется влияние ЛС на флуоресценцию лизоцима, что позволяет сделать вывод об изменении микроокружения вокруг аминокислотных остатков триптофана и, в некоторых случаях,

¹ «Лекарственные средства - вещества или их комбинации, вступающие в контакт с организмом человека или животного, проникающие в органы, ткани организма человека или животного, применяемые для профилактики, диагностики (за исключением веществ или их комбинаций, не контактирующих с организмом человека или животного), лечения заболевания, реабилитации, для сохранения, предотвращения или прерывания беременности и полученные из крови, плазмы крови, из органов, тканей организма человека или животного, растений, минералов методами синтеза или с применением биологических технологий. К лекарственным средствам относятся фармацевтические субстанции и лекарственные препараты.» (Федеральный закон "Об обращении лекарственных средств" от 12.04.2010 N 61-ФЗ (редакция от 14.07.2022), статья 4)

рассчитать константу взаимодействия. Поэтому имеющиеся данные носят фрагментарный характер, также не разработан комплексный подход к исследованию таких взаимодействий. К тому же все исследования проводились в объеме водной фазы и не затрагивали способность проникать через межфазную границу водный раствор-органическая жидкость, которую можно рассматривать как модель клеточной мембраны.

Объектами исследования в данной работе являются белок лизоцим - фермент, который содержится во многих биологических жидкостях организмах, и лекарственные препараты, отличающиеся действием и химической структурой: мирамистин, амикацин, левофлоксацин и даларгин.

Цель работы: определение свойств лизоцима в составе комплексов с ЛС: мирамистином, амикацином, левофлоксацином и даларгином – с помощью комплексного подхода, включающего метод радиоактивных индикаторов и спектроскопические методы анализа. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи:**

1. С помощью метода сцинтиллирующей фазы (МСФ), тензиометрии и спектральных методов выявить взаимодействие лекарственных средств (ЛС) с лизоцимом в системе водный раствор/*n*-ксилол и водный раствор/воздух.
2. Определить параметры конкурентной адсорбции лизоцима и ЛС из совокупности данных МСФ и тензиометрии.
3. Применить метод тритиевого зонда для исследования взаимодействия ЛС с лизоцимом.
4. Выявить влияние ЛС на ферментативную активность лизоцима.
5. С помощью молекулярного докинга и с учетом полученных экспериментальных данных предложить модель взаимодействия ЛС и лизоцима.

Научная новизна работы

1. Впервые получен меченный тритием левофлоксацин, а также разработана методика доочистки меченного тритием амикацина, позволяющая получать препараты с содержанием примесей менее 0,1%, что критически важно для их использования в методе сцинтиллирующей фазы.
2. Усовершенствована методика исследования комплексов лизоцима с ЛС с помощью обработки атомарным тритием безводных смесей веществ с последующим анализом

распределения трития по аминокислотным остаткам белка с помощью тотального гидролиза и трипсинолиза.

3. Впервые применен комплексный подход, включающий метод радиоактивных индикаторов и спектроскопические методы анализа, для описания взаимодействия лизоцима с поверхностно-инактивными веществами.

Положения, выносимые на защиту:

1. Совокупность данных, получаемых с помощью метода сцинтиллирующей фазы и межфазного натяжения на границе водный раствор/*n*-ксилол и водный раствор/воздух, позволяет рассчитать состав сложного адсорбционного слоя для смеси лизоцима с лекарственными средствами различной химической природы на границе водный раствор/воздух, в том числе для веществ, не обладающих поверхностно-активными свойствами на границе раздела с воздухом.

2. Комплексный подход, включающий радиохимические и спектрофотометрические методы исследования, а также молекулярный докинг, позволил выявить места контактов лизоцима и лекарственных средств мирамистина, амикацина, левофлоксацина и даларгина.

3. Обработка атомами трития лиофилизированных комплексов лизоцим-ЛС, полученных в водных растворах, повышает достоверность определения мест контактов благодаря увеличению радиоактивности аминокислотных остатков лизоцима из-за устранения экранирующего эффекта молекул воды.

4. Ферментативная активность лизоцима в присутствии ЛС меняется из-за изменения окружения активного центра белка: увеличивается в комплексе с мирамистином и даларгином, практически не меняется в присутствии левофлоксацина и существенно снижается в комплексе с амикацином.

Теоретическая и практическая значимость. Применение меченных тритием соединений и метода тритиевого зонда расширяет возможности радиохимических методов при проведении биохимических исследований. Разработана экспериментальная методика определения центра связывания белка с ЛС. Метод тритиевого зонда, включающий использование меченных тритием соединений как индикатора количества вещества в составе смешанного адсорбционного слоя, успешно применен для исследования взаимодействия белок-пептид. Использованный комплексный подход позволяет получить информацию о взаимодействии белков с ЛС, как в объеме водной

фазы, так и на границе раздела водный раствор/*n*-ксилол. Данная информация может быть использована при разработке новых лекарственных средств.

Методология и методы исследования. В работе использовались радиохимические методы с применением меченных тритием соединений (метод сцинтиллирующей фазы и тритиевый зонд), традиционные спектрофотометрические методы (спектроскопия кругового дихроизма и флуоресцентная спектроскопия), турбидиметрический метод и тензиометрия (метод висящей капли).

Соответствие паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.4.13 – Радиохимия по области исследований: получение и идентификация меченых соединений; метод радиоактивных индикаторов; химические аспекты использования радионуклидов в биологии и медицине.

Степень достоверности. Достоверность определяется использованием стандартных методик измерения и современного оборудования. На момент проведения измерений все оборудование имело свидетельство о периодической поверке.

Личный вклад автора включает проведение экспериментов по исследованию поведения лизоцима и лекарственных средств в двухфазной системе водный раствор/*n*-ксилол с помощью метода сцинтиллирующей фазы; снятие спектров флуоресценции; измерение ферментативной активности лизоцима и обработка полученных результатов. Анализ распределения трития в аминокислотных остатках лизоцима проведен совместно с к.х.н. Ксенофонтовым А.Л. Спектры кругового дихроизма получены и проинтерпретированы совместно с к.ф.-м.н. Арутюняном А.М. ВЭЖХ-МС анализ триптических пептидов проводили совместно с к.х.н. Байгильдиевым Т.М. Исследование совместной адсорбции лизоцима с амикацином и даларгином, а также влияния амикацина и даларгина на флуоресценцию и ферментативную активность лизоцима проведено совместно с Касперович А.В.

Апробация работы. Основные результаты данной работы были представлены в виде стендовых и устных докладов на Международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2019, 2020, 2021, 2022), III Международной научно-практической конференции "Радиофарма-2019" (Москва, 2019), XXI Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Санкт-Петербург, 2019), Восьмой всероссийской Каргинской конференции «Полимеры — 2020» (Москва, 2020).

Публикации. Основные результаты диссертации отражены в 10 научных работах, в том числе 3-х статьях, опубликованных в международных рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (RSCI, Web of Science и Scopus), а также 7 тезисах докладов на российских и международных научных конференциях.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВ С ЛЕКАРСТВЕННЫМИ СРЕДСТВАМИ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ

1.1.1. Направления исследований взаимодействия белков с лекарственными средствами

Лекарственные средства стали неотъемлемой частью жизни каждого человека. Фармацевтические компании постоянно ведут поиск и разработки новых ЛС для диагностики и лечения различных заболеваний. Для примера в США Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов было одобрено 59 новых ЛС (из них 17 биологических препаратов и 42 новых химических соединения) в 2018 году [2], 48 (10 биопрепаратов, 38 химических соединений) – в 2019 году [3], 53 (13 биопрепаратов, 40 химических соединений) – в 2020 году [4], 50 (14 биопрепаратов, 36 химических соединений) – в 2021 году [5], 37 (15 биопрепаратов, 22 химических соединения) – в 2022 году [6]. Исследования взаимодействий между ЛС и биологически активными молекулами с функциональными белками с каждым годом вызывают все больший интерес в области химии, биохимии, клинической медицины и особенно фармакологии.

В организме человека в биологических жидкостях ЛС может находиться в свободном виде, либо в связанном с биомолекулами состоянии. Связывание препарата с белком приводит к уменьшению свободной концентрации ЛС, от которой зависит его терапевтическая эффективность [7]. Молекулы ЛС несвязанные с белком биодоступны и могут свободно проходить через клеточные мембраны или диффундировать, достигая места действия, в то время как связанное с белком ЛС удерживается в кровотоке и теряет фармакологическую активность. Связывание препарата с белком часто бывает обратимым, это означает, что ЛС связанное с белком может быть эффективным при контролируемом высвобождении ЛС на рецепторе [1]. Связывание ЛС с белком оказывает влияние на распределение по органам и тканям, метаболизм и экскрецию, и, как следствие, на скорость доставки, биобезопасность и токсичность препарата, на фармакологический ответ [8–10]. Следовательно, изучение взаимодействия между

белками и молекулами ЛС позволяет лучше понять биологическое действие ЛС *in vivo*, а также может быть полезно при создании и применении комплексов лекарственных препаратов – белок в терапевтических целях, при контроле концентрации и распределения ЛС [7,11].

Исследования взаимодействий белок–ЛС играют центральную роль в раскрытии структурных особенностей белковых молекул, необходимых для понимания средства к связыванию ЛС [12,13]. Важно изучать изменения конформации и биологических функций белка при взаимодействии с ЛС, поскольку такие исследования позволяют оценить структурные особенности и механизм действия при разработке лекарственного средства. Правильное и полное изучение белково-лекарственных взаимодействий позволяет оценить терапевтический потенциал исследуемых препаратов [13,14], и, в дальнейшем, может быть использовано для быстрого скрининга биологически активных веществ, клинических кандидатов в лекарственные средства и биомаркеров, с целью определения их фармакологических свойств [15,16]. Понимание механизма действия ЛС на молекулярном уровне приведет к их более точному и рациональному использованию в клинической практике [16].

Белки считаются основой клеточных процессов и являются основными мишенями для исследования токсичности экзогенных загрязнителей окружающей среды [14,17]. Взаимодействие лигандов с белками может вызывать значительные конформационные изменения в белке, при этом биологические функции белков преобразовываются, что отрицательно влияет на их сигнальные, клеточные и метаболические пути [8,14]. В последнее время возросло потребление ЛС, в том числе антибиотиков, из-за неполного метаболизма и недостаточной очистки коммунальных сточных вод, некоторые ЛС и их метаболиты были обнаружены в сточных водах, поверхностных и грунтовых водах, а также в питьевой воде. Поэтому исследование взаимодействий лигандов с белками интересно с точки зрения выяснения биологического механизма токсичности этих соединений [17,18].

Известно, что ряд патологических состояний человека, таких как системный амилоидоз, болезни Альцгеймера и Паркинсона, связаны с образованием внеклеточных отложений нерастворимого белка – амилоидных фибрилл в некоторых органах [15,19–21]. Наследование, мутации, старение, стресс, повышенная температура (лихорадка), повышенная концентрация белка – факторы риска, которые влияют на образование

амилоидных фибрилл в организме [20]. С физико-химической точки зрения процесс амилоидо подобной агрегации является общей чертой полипептидных цепей, который возникает из-за нарушения третичной структуры пептида, что может привести к межмолекулярной сборке пептидов и образованию амилоидных фибрилл [19–21]. Также агрегация белков является основной проблемой при производстве многих рекомбинантных терапевтических белков [19,21]. Исследование взаимодействия между ЛС и белками интересно для выяснения механизмов, лежащих в основе агрегации белков, и для поиска низкомолекулярных соединений, способных эффективно ингибировать образование амилоидных фибрилл или приводящих к их дезагрегации.

Таким образом, изучение взаимодействия ЛС с лизоцимом имеет важное значение. Такие исследования полезны для получения информации о структурных особенностях белков при взаимодействии с лекарственными препаратами и для прояснения терапевтической эффективности ЛС [12,13].

1.1.2. Модельные белки

При изучении механизмов связывания ЛС с различными белками прежде всего рассматривают белки, которые содержатся в форменных элементах крови, в плазме крови, в других биологических жидкостях: сывороточный альбумин [22–25], гемоглобин [23–26], лизоцим [27–30], кислый альфа-1-гликопротеин (орозомукоид) [22,31,32], альфа-2-макроглобулин [33], иммуноглобулины [34], трансферрин [35,36], фибриноген [37], трипсин (пищеварительный фермент, выделяемый поджелудочной железой) [17], каталазу (гемсодержащий белок печени) [38]. К модельным белкам относят сывороточный альбумин, гемоглобин и лизоцим, структуры этих белков и их поведение в различных системах наиболее изучены, поэтому они чаще всего используются в исследованиях взаимодействия с лигандами.

Человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) синтезируется печенью и является наиболее распространенным белком в плазме крови, составляющим около 50-60% от общего количества белков. ЧСА выполняет множество физиологических функций: транспорт различных химических веществ, поддержание коллоидно-осмотического артериального давления и рН крови, участвует в метаболических процессах, изоляции свободных радикалов кислорода и инактивации различных токсичных липофильных метаболитов. ЧСА обратимо взаимодействует с широким спектром экзогенных и

эндогенных веществ, обладает высоким сродством к молекулам ЛС [23–25,39,40]. Из-за высокого структурного сходства с ЧСА (около 76%), доступности и низкой стоимости в исследованиях вместо ЧСА часто применяется бычий сывороточный альбумин (БСА) [39–41]. БСА – глобулярный белок (~ 66 кДа), который состоит из 583 аминокислот и трех гомологичных доменов, связанных дисульфидными связями [25].

Гемоглобин – глобулярный белок с молекулярной массой ~64,5 кДа, обнаруживается преимущественно в эритроцитах, а также в небольших количествах в плазме крови. Функция гемоглобина заключается в транспортировке кислорода от легких к тканям и углекислого газа от тканей к легким, кроме того он поддерживает рН крови и помогает в транспортировке ЛС, связан с различными заболеваниями, такими как болезни сердца, лейкемия, анемия и др. [23–25,42,43]. Также как с сывороточным альбумином, в исследованиях часто используют бычий гемоглобин, который на 90% гомологичен человеческому. Бычий гемоглобин – белок с четвертичной структурой, который состоит из двух идентичных α -цепей, содержащих 141 аминокислоту, и двух идентичных β -цепей – 145 аминокислот [25,26].

1.1.3. Лизоцим

Помимо альбумина и гемоглобина широкое распространение в качестве модельного белка получил лизоцим из-за его небольшого размера, высокой стабильности и природного изобилия [44]. С момента своего открытия в 1922 году лизоцим представлял собой молекулу-прототип для понимания сложности структуры и функции белка в физиологии и болезни [21,45–49]. Более того, интерес к лизоциму значительно возрос, поскольку было выявлено, что определенные мутации в этом ферменте делают белок амилоидным [50]. Лизоцим – очень важный и тщательно изученный белок, содержится во многих секретах, таких как слюна, слезы, грудное молоко, слизь, а также присутствует в сыворотке крови, синовиальной жидкости, лимфатических тканях, лизосомах клетки и цитоплазматических гранулах полиморфно-ядерных нейтрофилов [8,9,51]. Лизоцим выполняет множество физиологических функций и обладает целым рядом фармакологических эффектов: антибактериальной и противовирусной активностью, иммуномодулирующим, антигистаминным и противоопухолевым свойствами [8,11,14,17,18], играет важную роль в транспортировке и депонировании жирных кислот, ЛС и гормонов [9,29,52].

Лизоцим сравнительно небольшой мономерный глобулярный белок (3,0×3,0×4,5 нм) с низкой молекулярной массой. Лизоцимы, выделенные из разных источников, различаются по структуре и функциям [10,51]. В исследованиях, в связи с доступностью и функциональными характеристиками, чаще всего применяют лизоцим, полученный из белка куриного яйца, который на 60% гомологичен человеческому лизоциму, оба принадлежат к лизоцимам класса с-типа [10,51,53]. Первичная структура лизоцимов с-типа состоит из 129 аминокислотных остатков с молекулярной массой 14,3 кДа. Структуры человеческого лизоцима и лизоцима, выделенного из белка куриного яйца, приведены на Рис. 1. Аминокислотный каркас лизоцима связан четырьмя дисульфидными связями между аминокислотными остатками цистеина (6Cys – 127Cys, 30Cys – 115Cys, 64Cys – 80Cys и 76Cys – 94Cys), что придает высокую стабильность его структуре [51,54–57]. По сравнению с другими глобулярными белками, лизоцим более устойчив к химической денатурации [58].

В водных растворах с низкой ионной силой при нейтральных значениях pH, благодаря наличию 17 положительно заряженных (6 лизина, 11 аргинина) и девяти отрицательно заряженных аминокислотных остатков (7 аспарагиновой кислоты, 2 глутаминовой кислоты), белок имеет положительный заряд, с суммарным зарядом поверхности +8, изоэлектрическая точка фермента (pI) – 11,35 [7,48]. Также лизоцим содержит шесть аминокислотных остатков триптофана (Trp) расположенных в 28-м, 62-м, 63-м, 108-м, 111-м и 123-м положениях последовательности, три остатка тирозина (Tyr) – 20-м, 23-м, 53-м и три остатка фенилаланина (Phe) – 3-м, 34-м, 38-м [12,51,53].

В глобулярных белках первичная аминокислотная последовательность образует вторичные структуры, α -спирали и β -слои, и организуется в сфероподобную третичную структуру [59]. Рентгеновская структура лизоцима, выделенного из белка куриного яйца, являлась первой трехмерной структурой молекулы фермента с высоким разрешением [50]. Лизоцим представляет одноцепочечный полипептид, который содержит α -спираль, витки β -листов и неупорядоченные структурные элементы [48,52]. Третичная структура лизоцима, определенная при помощи рентгеновской кристаллографии, представляет глобулу, разделенную на два домена с активным центром фермента, расположенным в щели между ними: один домен – аминокислотные остатки 36-84, другой – 1-35 и 85-129 [60]. Первый домен состоит преимущественно из конформаций β -листа, второй представляет в основном α -спираль [44,61,62]. Остатки

триптофана, расположенные в 62-м, 63-м и 108-м положениях последовательности, присутствуют вблизи активного центра фермента и играют значительную роль во время связывания с лигандами, при этом Trp62 и Trp108 придают лизоциму свойство собственной флуоресценции (около 80%) [63,64].

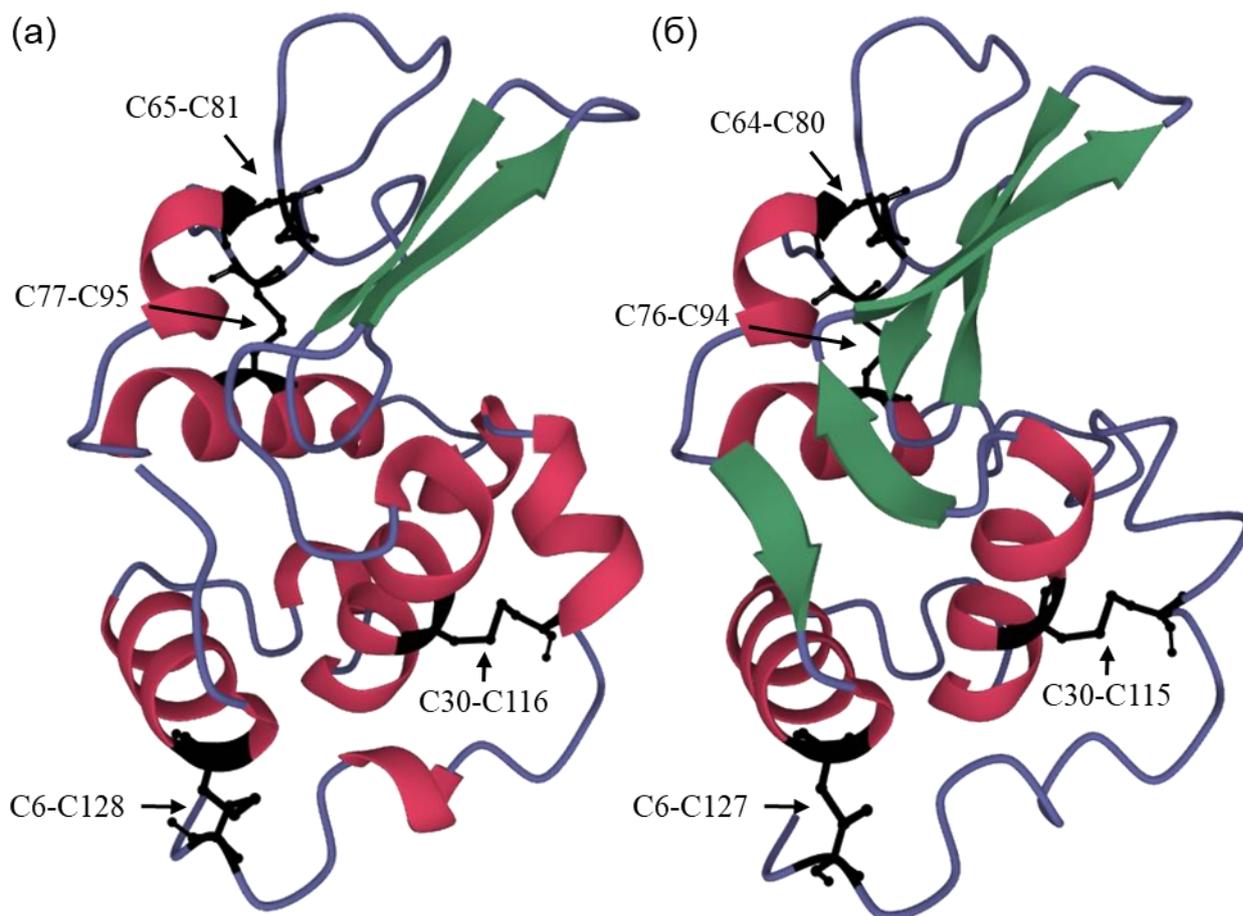


Рис. 1. – Структуры лизоцима: человеческого (PDB: 1JSF) (а) и куриного белка (PDB: 6LYZ) (б). Стрелочками указано положение дисульфидных связей.

Антимикробный белок лизоцим обладает способностью лизировать клеточные стенки бактерий путем гидролиза 1,4-бета-связей между N-ацетилмурамовой кислотой и остатками N-ацетил-D-глюкозамина в пептидогликане и в хитодекстринах [65–67]. Грамположительные бактериальные клетки весьма восприимчивы к такому гидролизу, поскольку их клеточные стенки содержат высокую долю пептидогликана [7]. Основными аминокислотными остатками участвующими в каталитической активности фермента являются аспарагиновая (Asp52) и глутаминовая (Glu35) кислоты, расположенные в 52-м и 35-м положениях полипептидной цепи, соответственно [49,51].

1.1.4. Взаимодействие лизоцима с лекарственными средствами и биологически активными веществами

Наблюдается увеличение числа исследований, в которых изучаются связывающие и обратимые взаимодействия между белком и ЛС [14]. Лизоцим, как и большинство белков, амфотерен, имеет отдельные гидрофильные и гидрофобные участки. ЛС представляют собой экзогенные вещества тоже чаще всего с амфифильной структурой, поэтому ЛС связываются с белками с высоким сродством [44,66]. Взаимодействие ЛС-белок, из-за амфотерности белка и лиганда, становится еще более сложным, когда происходят вызванные рН конформационные изменения каждого домена белка, что может оказывать влияние на сродство связывания [47,68,69]. Однако преимущественно исследования проводятся в водных растворах при физиологическом значении рН на уровне 7,4 с поддержанием постоянной ионной силы растворов [10,70–72].

В организме человека, особенно в жидкостях, ионы металлов принимают участие во многих жизненно важных химических и биологических процессах; эти процессы опосредуются взаимодействием ионов металлов с биологическими макромолекулами, поэтому иногда исследуется влияние присутствия ионов металлов на сродство связывания биологически активных веществ с белком [11,45,47,65]. В работе [65] было показано, что присутствие ионов металлов (Ca^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+}) снижает сродство связывания флавоноидов, нарингина и нарингенина, с лизоцимом. В другом исследовании [11], лишь часть ионов металла (Mg^{2+} , Zn^{2+} и Ba^{2+}) снижала сродство связывания противоопухолевого препарата вандетаниба с лизоцимом, в то время как ионы K^+ , Ca^{2+} , Mn^{2+} и Cu^{2+} не оказывали значительного влияния на константу связывания. Также снижение сродства связывания аналога цефалоспорина, цефотаксима [45] с лизоцимом вызывало присутствие ионов Mg^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Cr^{2+} , Fe^{3+} и Al^{3+} , а в присутствии ионов Co^{2+} и Ni^{2+} константа связывания увеличилась. Снижение значения константы связывания в присутствии ионов металлов может быть результатом взаимодействия ионов металлов с молекулами лиганда, которое препятствует образованию комплекса лизоцим-ЛС.

До настоящего времени проведено большое количество исследований взаимодействия лизоцима с ЛС, относящимися к различным клинико-фармакологическим группам, среди них можно выделить:

1. Бета-лактамыные антибиотики:
 - Пенициллины: клоксациллин, диклоксациллин [73];
 - Цефалоспорины: цефрадин, цефуроксим [45], цефотаксим [45] и цефтриаксон [45], цефтазидим [10], цефпиром [27], цефепим [64];
2. Тетрациклины (антибиотики): тетрациклин [30], хлортетрациклин [30], окситетрациклин [30];
3. Амфениколы (антибиотик): хлорамфеникол (левомицетин) [67];
4. Фторхинолоны (антибиотики): ципрофлоксацин [18], энрофлоксацин [18], левофлоксацин [17,74,75], норфлоксацин [44];
5. Химиотерапевтический препарат: циклофосфамид [13];
6. Противосудорожный препарат: лакосамид [74];
7. Противоопухолевые препараты: вандетаниб (ингибитор протеинкиназы) [11], месалазин [20], 5-фторурацил [29];
8. Нестероидные противовоспалительные средства: аспирин [13], диклофенак [7];
9. Бета-адреноблокаторы: пропранолол и ацебутолол [76];
10. Антикоагулянт: гепарин [28];
11. Желчегонный препарат: берберин [77];
12. Селективный β_2 -адреномиметик: кленбутерол [41];
13. Витамины: L-аскорбиновая кислота (С) [46,78], α -токоферол (Е) [78], тиамин (В1) [66], β -каротин (предшественник витамина А) [78];
14. Антисептики: сангвинарин [79], хелеритрин [80].

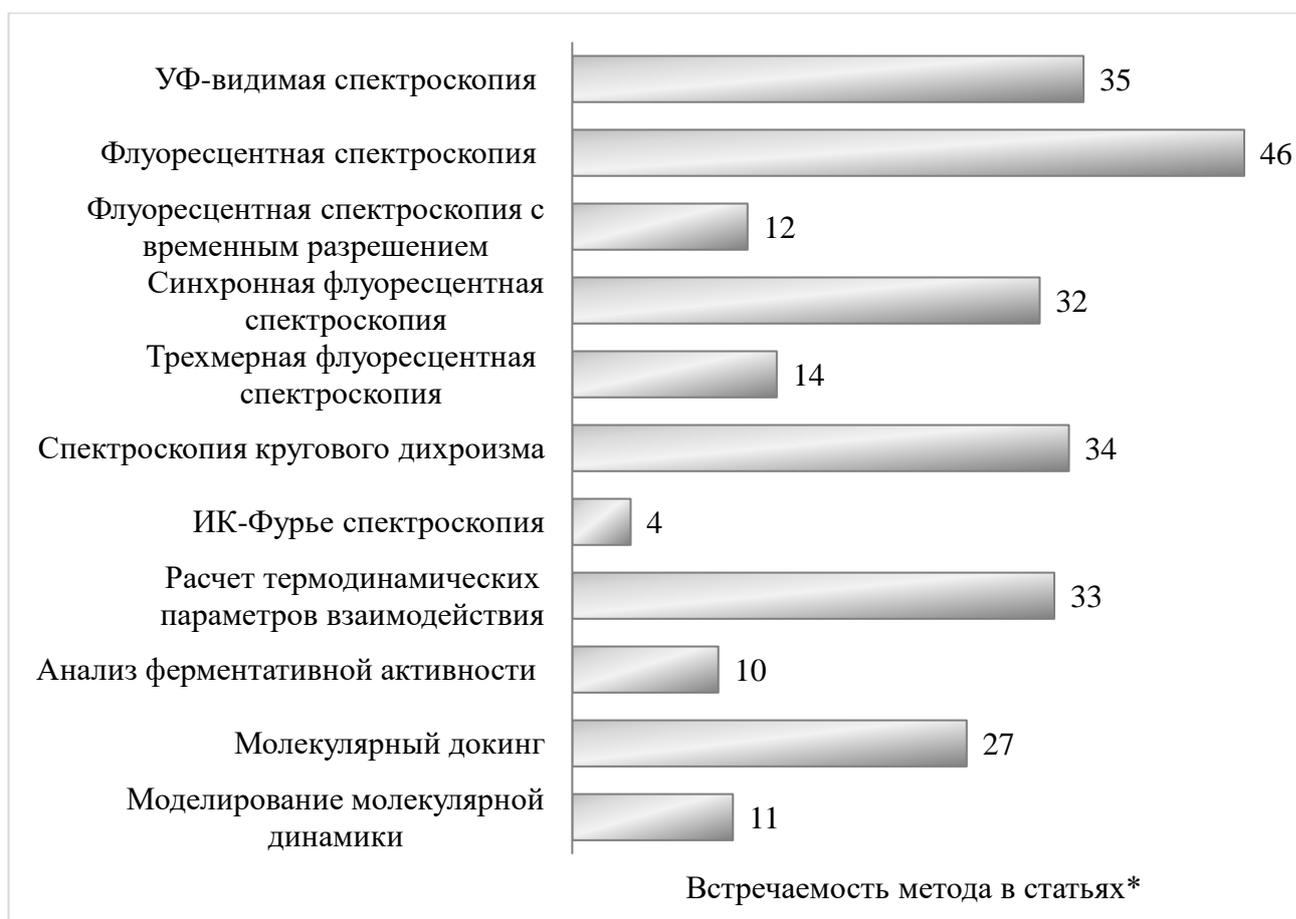
Дополнительно исследуют взаимодействие лизоцима с веществами, обладающими биологической активностью, но еще не являющимися ЛС для получения представления о их транспортировке и возможном метаболизме на молекулярном уровне: юглон [12], куркумин [19], сафранал [81], астаксантин [78], гинзенозиды [82], эскулин и эскулетин (производные кумарина) [83], (-)-эпигаллокатехин галлат и хлорогеновая кислота [84], кофейная кислота и (-)-галлат эпикатехина [85], отдельно можно обратить внимание на флавоноиды, крупнейший класс растительных полифенолов, которые присутствуют в различных растениях и фруктах, являясь их вторичными метаболитами. Флавоноиды привлекли большое внимание из-за их широкого спектра фармацевтических и биологических применений, например, в качестве антиоксидантов, противовоспалительных, противовирусных, противоопухолевых и противораковых

средств [62,86]. Всего известно не менее 10000 различных флавоноидов [86], исследование взаимодействия лизоцима проводили со следующими производными: флавонами (байкалеином [60,68], байкалином [60], лютеолином [87] и неваденсином [72]); флавонолами или гидроксифлавонами (мирицетином [47], кемпферолом [19,53], процианидином В3 [78], 3-гидроксифлавоном [62], 6-гидроксифлавоном [88] и 7-гидроксифлавоном [62]); флаванонами (пиностробиноном [89], гесперетином [69], нарингенином [65,90], нарингином [65] и пальмитат нарингином [71]); гидроксифлаваноном (силимаринном [1]); изофлавоном (пуэрарином [91]); халконами (флавоноидами с незамкнутым пирановым кольцом) [8,14,92]; процианидинами [93].

Всего было найдено 49 статей по исследованию взаимодействия лизоцима с ЛС и биологически активными молекулами, в которых используется широкий спектр методов и их комбинации.

1.1.5. Методы, применяемые для исследования взаимодействий белок-лиганд

Разработано большое количество методов для изучения взаимодействия белков с ЛС [94], наиболее часто встречаемые методы представлены на Рис. 2. Используются различные методы спектроскопии [24], которые можно классифицировать по характеру взаимодействия вещества со спектром: УФ-спектроскопия; флуоресцентная спектроскопия, флуоресцентная спектроскопия с временным разрешением, синхронная флуоресцентная спектроскопия, трехмерная флуоресцентная спектроскопия, спектроскопия кругового дихроизма, ИК-Фурье спектроскопия. На основании экспериментальных данных проводят расчеты термодинамических параметров взаимодействий лиганда с белком. Из-за чувствительности, точности, скорости проведения анализа и простоты использования флуоресцентная спектроскопия и спектроскопия кругового дихроизма являются наиболее широко используемыми методами в исследованиях взаимодействия белок-ЛС [18,24].



*ссылки на статьи приведены в разделе 1.1.4. «Взаимодействие лизоцима с лекарственными средствами и биологически активными веществами».

Рис. 2. – Методы, применяемые для исследования взаимодействия лизоцим-ЛС

Связывание ЛС с белком может затрагивать активный центр фермента, поэтому проводят анализ ферментативной активности лизоцима с использованием турбидиметрического метода. В последнее время активно используют методы молекулярного моделирования: молекулярного докинга и моделирования молекулярной динамики. Молекулярный докинг способен определить предполагаемое место связывания, а также аминокислотные остатки вблизи места связывания, полученные данные можно визуализировать. Моделирование молекулярной динамики помогает понять, как происходит взаимодействие лиганда с белком во времени.

При исследовании взаимодействия белок-лиганд дополнительно используют поляризацию флуоресценции [44,79], динамическое рассеяние света [10], рэлеевское рассеяние света [28,81], изотермическую титрационную калориметрию [73,79,80], атомно-силовую микроскопию [28], масс-спектрометрию с электроионизацией распылением [82] и ион-селективные электроды [7,66]. Однако данные методы

используются очень редко и не будут рассмотрены, как и методы, используемые при исследовании влияния лиганда на образование амилоидных фибрилл лизоцима [19,20,75].

Флуоресцентная спектроскопия

Собственная флуоресценция белка возникает из-за присутствия ароматических аминокислотных остатков, таких как триптофан, тирозин, флуоресценция которого подавляется за счет передачи резонансной энергии или за счет ионизации его ароматической гидроксильной группы, и фенилаланин, который имеет очень низкий квантовый выход флуоресценции [10]. Основной вклад во флуоресценцию лизоцима вносят аминокислотные остатки Trp62 и Trp108, которые к тому же расположены рядом с активным центром фермента [11]. Флуоресцентное излучение лизоцима может предоставить ценную информацию о микроокружении этих аминокислотных остатков [14,29]. При взаимодействии белка с молекулой ЛС, в зависимости от концентрации добавленного лиганда свойство собственной флуоресценции белка может нарушаться, что позволяет проводить мониторинг структурных и конформационных изменений белка при образовании комплекса [9,94].

При образовании комплекса белок-лиганд может происходить уменьшение/увеличение флуоресценции, а также могут наблюдаться красный (батохромный, в длинноволновую область) или синий (гипсохромный, в коротковолновую область) сдвиги максимума на спектре флуоресценции лизоцима. Красный сдвиг указывает на увеличение полярности вокруг флуорофора, такое смещение максимума флуоресценции лизоцима наблюдалось при его взаимодействии с гепарином [28]; нарингенином [65], циклофосфамидом и аспирином [13].

Уменьшение интенсивности флуоресценции лизоцима при взаимодействии с молекулами ЛС связано со статическим или динамическим механизмами тушения, возможно комбинированное динамическое и статическое тушение. Статический механизм тушения флуоресценции реализуется при образовании комплекса между лекарственным средством и белком. Динамический механизм тушения возникает из-за столкновений между молекулами белка и ЛС [14,28,95]. Тушение флуоресценции можно

количественно оценить с помощью широко распространенного уравнения Штерна-Фольмера [1,67,70–72,96]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q], \quad (1.1)$$

где F_0 – интенсивность флуоресценции лизоцима в отсутствие лиганда; F – интенсивность флуоресценции лизоцима в присутствии лиганда; $[Q]$ – концентрация тушителя (лиганда/ЛС); K_{SV} – константа тушения Штерна-Фольмера; K_q – константа скорости тушения флуоресценции биологической макромолекулы; τ_0 – среднее время жизни флуорофора в отсутствие тушителя. Время жизни флуоресценции триптофана лежит в диапазоне от 1 до 6 нс и зависит от его окружения [96]. Для лизоцима используют среднее время жизни (τ_0) от 1,6 [65] до 10 нс [91]. Несмотря на то, что среднее время жизни зависит от условий проведения эксперимента [95], во многих исследованиях используют среднее время жизни из литературных источников [65], и лишь в немногих его определяли непосредственно при проведении исследования [12,29,62].

Определить механизм тушения флуоресценции лизоцима можно по зависимости значения константы тушения от температуры, а также по значению константы скорости тушения, так как максимально возможное значение для динамического механизма тушения ограничено диффузией и составляет $2,0 \times 10^{10}$ л·моль⁻¹·с⁻¹ [28]. При повышении температуры диффузия ускоряется, следовательно, при более высокой температуре степень тушения флуоресценции от столкновений будет выше, в то время как обратимо связанные комплексы дестабилизируются при более высоких температурах, что приводит к уменьшению статического тушения [8].

График Штерна-Фольмера чаще всего представляет линейную зависимость $\frac{F_0}{F}$ от $[Q]$, отклонение от линейности, вогнутость относительно оси ординат, связано либо с комбинированным процессом тушения, либо с дополнительными сайтами связывания [47,65,71,72]. В последнем случае отклонение возникает при более высоких концентрациях лиганда, может наблюдаться точка перегиба, которая связывает две линейные корреляции, то есть с повышением концентрации лиганда увеличивается количество сайтов связывания [47]. При нелинейности графика, для характеристики тушения флуоресценции белков используют модифицированное уравнение Штерна-Фольмера [13,18,67,72]:

$$\frac{F_0}{F_0-F} = \frac{1}{f_a K_{SV}[Q]} + \frac{1}{f_a}, \quad (1.2)$$

где f_a - доля собственной флуоресценции белка, доступной для тушения. Модифицированное уравнение Штерна-Фольмера используется для любого механизма тушения во всем диапазоне концентраций лекарственного средства и показывает хорошую линейную зависимость.

При статическом механизме тушения, данные спектров флуоресценции можно использовать для получения количества сайтов связывания (n). Когда небольшие молекулы независимо связываются с набором сайтов связывания на макромолекуле, равновесие между свободными и связанными молекулами задается двойным логарифмическим уравнением [28,30,60]:

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_a + n \log [Q], \quad (1.3)$$

где K_a - константа связывания. Дополнительно на основании уравнения Штерна-Фольмера были разработаны более сложные уравнения, которые при расчете учитывают концентрацию свободного, не связанного с белком, лекарственного средства [1,27,64]

Оценить константу связывания и стехиометрическое соотношение в комплексе белок-лиганд можно также с использованием модифицированного уравнения Бенези-Хильдебранда [9,14]:

$$\frac{1}{(F_0 - F)} = \frac{1}{(F_0 - F_1)} + \frac{1}{(F_0 - F_1)K[C_{ЛС}]^n}, \quad (1.4)$$

где F_0 – интенсивность флуоресценции лизоцима в отсутствии лиганда; F – интенсивность флуоресценции лизоцима в присутствии промежуточной концентрации лиганда, F_1 – интенсивность флуоресценции комплекса лизоцима с лекарственным средством, K – константа ассоциации ($K = \frac{[Лиз-ЛС]}{[Лиз][ЛС]}$); $[C_{ЛС}]$ – концентрация ЛС; n – количество молекул ЛС в комплексе лизоцим-ЛС. Стехиометрия комплекса определяется из линейности графика зависимости $\frac{1}{(F_0 - F)}$ от $\frac{1}{[C_{ЛС}]^n}$, а значение константы связывания определяют, как тангенс угла наклона прямой [9,14].

Однако графический подход оценки константы ассоциации с помощью уравнений Бенези-Хильдебранда не может учесть важность вклада каждой точки, то есть наклон линии очень чувствителен к значениям точек с наибольшими значениями по оси абсцисс. Поэтому для оценки константы ассоциации в случае, когда предполагается комплекс с соотношением белок:ЛС 1:1, используется уравнение зависимости максимальной флуоресценции от концентрации ЛС, выведенное из уравнения (1.4) [97]:

$$F = \frac{F_0 + F_1 K [C_{ЛС}]}{1 + K [C_{ЛС}]}, \quad (1.5)$$

где значения F_1 и K подбирают методом наименьших квадратов.

Флуоресцентная спектроскопия с временным разрешением

Флуоресцентная спектроскопия с временным разрешением – наиболее эффективный метод, позволяющий определить механизм тушения флуоресценции. Динамический механизм тушения влияет на время жизни флуоресценции лизоцима, однако в случае статического механизма тушения, то есть при образовании комплекса, значения времени жизни остаются стабильными [14,29,60,91].

Синхронная флуоресцентная спектроскопия

Синхронная флуоресцентная спектроскопия предоставляет характерную информацию о молекулярном окружении вблизи функциональных групп флуорофора. Синхронные спектры флуоресценции получают путем одновременного сканирования длин волн возбуждения и эмиссии с фиксированным сдвигом между ними. В сравнении с флуоресцентной спектроскопией можно выделить следующие преимущества: чувствительность, упрощение спектра, сужение ширины спектральной полосы и отсутствие интерференционных эффектов [27,64,67]. Интервал между длиной волны возбуждения и длиной волны излучения устанавливается равным 15 нм или 60 нм, спектр синхронной флуоресценции дает характеристическую информацию о микроокружении остатков тирозина и триптофана в лизоциме, соответственно, и их вкладе во взаимодействие белка с лигандом [13,18,29,46].

Трехмерная флуоресцентная спектроскопия

Трехмерные спектры флуоресценции стали популярным методом флуоресцентного анализа в последние годы и предоставляют всестороннее отображение информации о флуоресценции образца. Типичный 3D-спектр флуоресценции лизоцима представлен на Рис. 3: пик а – пик рэлеевского рассеяния ($\lambda_{ex} = \lambda_{em}$); пик б – пик рассеяния второго порядка ($\lambda_{em} = 2\lambda_{ex}$); пик 1 ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}:280/340$) в основном показывает спектральное поведение остатков триптофана и тирозина (собственная флуоресценция белка); пик 2 ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}:230/340$) также обусловлен локальным окружением ароматических остатков триптофана и тирозина [98], хотя в статьях ошибочно приписывают пик 2 эмиссии полипептидного остова белков ($\pi\text{-}\pi^*$ переходу от связи C=O) [67]. Сдвиг в длине волны

возбуждения или излучения вокруг пика флуоресценции, появление нового пика или исчезновение существующего пика могут предоставить информацию о конформационных изменениях в белке [65,67].

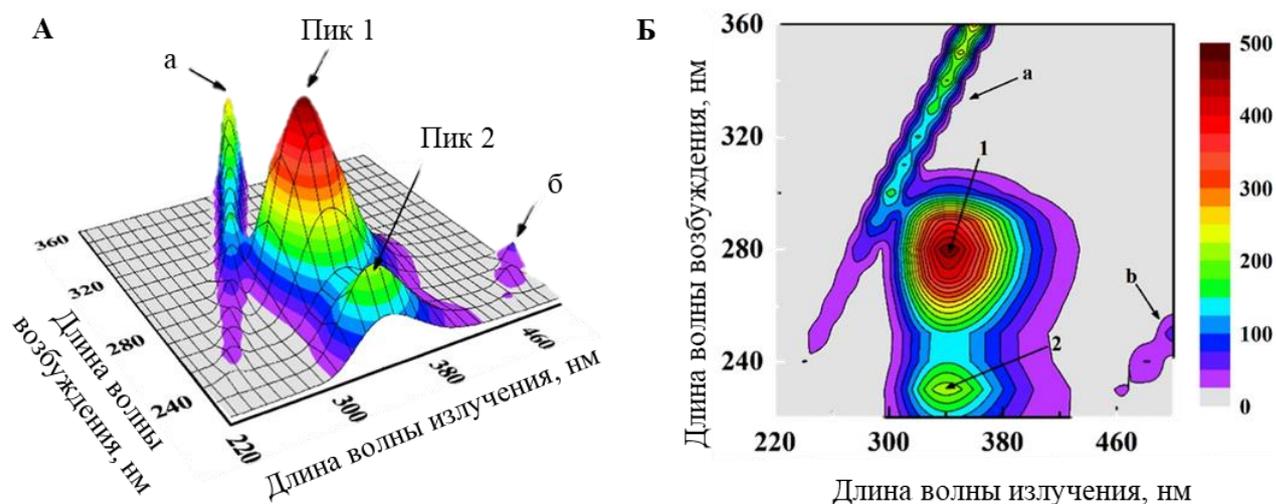


Рис. 3. – Трехмерный спектр флуоресценции лизоцима (А) и его контурная карта (Б) [8].

УФ-видимая спектроскопия

УФ-видимая спектроскопия основана на возбуждении электронов за счет поглощения видимого света и используется для изучения структурных изменений белка и исследования образования комплекса белок-лиганд. В спектрах лизоцима есть два основных пика поглощения. Пик, расположенный в диапазоне от 200 до 230 нм, указывает на вторичную структуру белка (пептидные связи), а полоса от 260 до 300 нм соответствует $\pi - \pi^*$ переходу трех ароматических аминокислотных остатков (тирозина, триптофана и фенилаланина) и указывает на микроокружение хромофора [10,14,18,29]. Изменение положения максимума на спектре связано с изменением полярности вокруг остатков триптофана, которое могло повлиять на конформацию пептидной цепи и гидрофобность белка [71]. Измерение поглощения в УФ-видимой области – простой, но эффективный метод подтверждения вероятного механизма тушения флуоресценции. При динамическом тушении спектры поглощения белка не изменяются, так как тушитель воздействует только на молекулы в возбужденных состояниях, в то время как при статическом механизме тушения флуоресценции в спектрах поглощения белка могут произойти изменения, поскольку лиганд взаимодействует с молекулами белка [17,60,64].

Спектроскопия кругового дихроизма

Круговой дихроизм (КД) — это спектроскопический метод, основанный на дифференциальном поглощении света с левой и правой круговой поляризацией оптически активными молекулами [99]. Спектроскопия КД является достаточно чувствительным спектроскопическим методом, позволяет обнаружить и оценить конформационные изменения в структуре белка вследствие его взаимодействий с молекулами ЛС [14,94]. Спектры КД в дальней УФ-области (190-250 нм) используют для обнаружения структурных элементов вторичной структуры белков, α -спиралей, β -листов и случайных клубков, каждый из которых имеет свои характерные спектры [94]. Так на спектре КД лизоцима в этой области находятся два отрицательных пика: пик при 208 нм соответствует π - π^* переходу α -спирали; пик при 222 нм соответствует переходу n - π^* как для случайной спирали, так и для α -спирали [14]. Структурная информация, полученная из спектров КД, ограничена по сравнению с информацией, полученной с помощью рентгеновской кристаллографии и спектроскопии ядерного магнитного резонанса. Однако спектроскопия КД является ценным дополнением к другим методам структурной биологии, поскольку имеет ряд преимуществ: исследование в широком диапазоне условий растворения и температур, быстрота проведения исследования, небольшой объем пробы [99].

ИК-Фурье спектроскопия

ИК-Фурье спектроскопия используется для исследования вторичной структуры белков, спектры белков демонстрируют ряд амидных полос, которые представляют различные колебания пептидной части [92]. Характерные полосы поглощения, обнаруженные в случае белков, состоят из полосы амида I (1700 – 1600 см^{-1}), возникающей за счет валентных колебаний двойной связи $\text{C}=\text{O}$ амида в полипептидной цепи, и полосы амида II (1575 – 1480 см^{-1}), возникающей в результате изгиба $\text{N}-\text{H}$ связи в сочетании с растяжением $\text{C}\equiv\text{N}$ и обладающей меньшей конформационной чувствительностью по сравнению с областью амида I [65]. Сдвиг положения пиков на спектре лизоцима при комплексообразовании с лигандом ясно указывает на изменение вторичной структуры белка.

Исследование термодинамических параметров взаимодействия

Межмолекулярные силы, которые участвуют во взаимодействии биомолекул с ЛС, могут включать водородные связи, ван-дер-ваальсовы, электростатические и гидрофобные взаимодействия [18,28,45]. Термодинамические параметры могут предоставить информацию о силах, которые приводят к связыванию молекул ЛС и белка [18,28,71]:

- $\Delta G < 0$ (изменение свободной энергии) указывает на спонтанность процесса взаимодействия ЛС и лизоцима;
- если $\Delta H < 0$ (изменение энтальпии) и $\Delta S < 0$ (изменение энтропии), то ван-дер-ваальсовы взаимодействия и водородные связи вносят основной вклад во взаимодействие белок-ЛС;
- если $\Delta H > 0$ и $\Delta S > 0$, то преобладают гидрофобные взаимодействия;
- если $\Delta H < 0$ и $\Delta S > 0$, то преобладает электростатическое взаимодействие.

Термодинамические параметры могут быть определены из констант связывания белок-ЛС (из графика зависимости $\ln K_T$ от $1/T$), полученных по уравнению Штерна-Фольмера при исследовании зависимости тушения флуоресценции лизоцима от концентрации ЛС при разных температурах. Для характеристики действующих сил, участвующих в комплексообразовании между ЛС и лизоцимом, значения изменения энтальпии (ΔH) и изменения энтропии (ΔS) определяются по уравнению Вант-Гоффа [46,72]:

$$\ln K_T = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R}, \quad (1.6)$$

где K_T - константа связывания при соответствующей температуре, R - газовая постоянная, T - абсолютная температура.

Значение изменения свободной энергии Гиббса (ΔG) можно получить из уравнений [30,46,72]:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S, \quad (1.7)$$

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_T. \quad (1.8)$$

Турбидиметрический метод (анализ ферментативной активности лизоцима)

Для дополнительной оценки влияния ЛС на молекулу белка проводят анализ ферментативной активности чистого лизоцима и лизоцима в присутствии лиганда [29,65,69]. В результате взаимодействия белок-ЛС активность фермента может

увеличиться или уменьшиться, а может и не измениться, если при взаимодействии ЛС с белком не был затронут активный центр фермента. Взаимодействие белок-ЛС может привести к полной потере ферментативной активности при нарушении нормального связывания лизоцима с субстратом [93]. Ферментативную активность лизоцима можно косвенно измерить с помощью турбидиметрического метода по изменению поглощения при 450 нм с использованием в качестве субстрата бактериальных клеток *Micrococcus lysodeikticus* (*Micrococcus luteus*), которые со временем разлагаются лизоцимом [47,72].

1.2. АДСОРБЦИЯ БЕЛКОВ (ЛИЗОЦИМА) НА МЕЖФАЗНЫХ ГРАНИЦАХ

Адсорбция белков на границе раздела жидкость-газ и жидкость-жидкость, а также поведение белков в адсорбированном состоянии, как индивидуально, так и в присутствии лигандов, представляют фундаментальное и практическое значение [100–103]. Одна из целей таких исследований – понимание изменений конформации белков по мере их адсорбции на границе раздела, определение структуры адсорбированных белков [102,103]. Адсорбция глобулярных белков на межфазной поверхности раздела представляет собой сложный процесс, включающий контролируемое диффузией перемещение белка к поверхности раздела, структурную деформацию, разворачивание и перестройку, а также межбелковую агрегацию и образование сети [59]. Поскольку белки содержат как гидрофобные, так и гидрофильные аминокислоты, то есть представляют амфифильные полиэлектролиты, они легко адсорбируются на поверхности раздела между водой и гидрофобными жидкостями. В водных растворах белки обретают такую конформацию, чтобы максимум гидрофобных групп находилось в ядре, окруженных гидрофильными группами, которые находятся в непосредственном контакте с водой или другим полярным растворителем [104]. При адсорбции на межфазной границе с воздухом или фазой с другой полярностью существует тенденция изменения структуры, конформации белка, его разворачивания, вплоть до денатурации белка, и взаимодействия внутренних гидрофобных участков цепи с поверхностью раздела [55,94,104,105].

1.2.1. Исследование адсорбции белков

Для изучения адсорбции белков на границах раздела фаз жидкость-газ и жидкость-жидкость используются различные экспериментальные методы, которые позволяют

получить определенный набор данных. Кинетика адсорбции лизоцима на границе раздела фаз изучалась рядом методов, включая динамическое поверхностное натяжение [106–111], метод радиоактивных индикаторов [101,106,110,112–116] и эллипсометрию [109,111,113] для определения изотерм адсорбции, а также поверхностно-чувствительную спектроскопию [56,108,117,118] для определения вторичной структуры адсорбированного белка.

Исследование поверхности раздела при помощи рентгеновских лучей, метода зеркального отражения нейтронов и эллипсометрия дают информацию о размере белков, а точнее позволяют узнать толщину и состав адсорбционного слоя [57,105,118–121]. Данный ряд методов использует отклонение волн или частиц, направленных к поверхностям и границам раздела фаз, метод отражения нейтронов измеряет отношение нейтронов в зеркальном отражении к нейтронам в падающем луче, этот же принцип используется в отражательной способности рентгеновских лучей, в эллипсометрии применяется поляризованный свет [94]. С помощью метода зеркального отражения нейтронов было выяснено, что при адсорбции лизоцима на границе раздела водный раствор/воздух сохраняется глобулярная структура, а ориентация молекулы белка зависит от его концентрации в фосфатном буфере. С увеличением концентрации лизоцима боковая ориентация сменяется вертикальной [120], что согласуется с результатами эллипсометрии [109]. При вертикальной ориентации белка (длинная ось белка перпендикулярна поверхности раздела) его плотно заряженный карбоксильный конец погружен в воду, также была определена степень погружения адсорбционного слоя в воду [120]. При низкой ионной силе раствора (0,02 М) конформационные переходы лизоцима хорошо коррелируют с изменением числа результирующих зарядов при изменении рН, адсорбция лизоцима достигает максимума при рН 11 (изоэлектрическая точка). С увеличением ионной силы раствора происходит экранирование зарядов в молекуле лизоцима, поэтому количество предпочтительных конформаций лизоцима уменьшается [121].

С помощью инфракрасной спектроскопии, инфракрасной отражательно-абсорбционной спектроскопии (IRRAS), можно получить информацию об ориентации элементов вторичной структуры (спиралей или нитей) на поверхности раздела [94,105,109,118]. В течение первого часа процесса адсорбции лизоцима из водного раствора на границе с воздухом видимых пиков амида I и амида II нет, поэтому

предположили [109], что лизоцим начинает адсорбцию в полностью развернутом состоянии, в течение первых 8 часов происходит реорганизация молекул лизоцима на границе раздела и полосы амида I и амида II становятся более заметными. При помощи инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье было показано, что вторичная структура молекул лизоцима сохраняется при адсорбции на границе раствор–воздух (рН 11) [56]. При исследовании влияния денатурирующих агентов на структуру лизоцима на поверхности раздела вода/воздух [122,123] обнаружено, что повышенная эластичность лизоцима указывает на отсутствие серьезного нарушения глобулярной структуры белка при адсорбции. Хотя результаты отражения нейтронов и эллипсометрия показывают, что лизоцим сохраняет свою глобулярную структуру без значительной денатурации [109,120] измерения поверхностно-чувствительной ИК-спектроскопии [108] и рентгеновской рефлектометрии [57,118] при нейтральном значении рН показали, что первоначально лизоцим адсорбируется в плоской развернутой структуре и содержит антипараллельные β -слои, отсутствующие в нативной структуре [108], однако, при помощи данного метода, нельзя напрямую оценить третичную структуру. При исследовании адсорбции лизоцима при помощи рентгеновской рефлектометрии [118] было обнаружено, что межфазный слой, образованный нативным лизоцимом, сравним со слоем, образованным частично денатурированным мочевиной лизоцимом. В процессе образования адсорбционного слоя взаимодействие с другими молекулами приводит к изменению конформации лизоцима [57]. Данные, полученные при исследовании адсорбции лизоцима с помощью разных методов, и их интерпретация не позволяет сделать однозначный вывод о структуре лизоцима в адсорбционном слое, в литературе нет единого мнения относительно степени разворачивания лизоцима [56–58,94,120,122,124,125]. Даже при сохранении размеров глобулы нельзя исключить некоторые изменения в конформации белка, может происходить изменение относительного содержания разноупорядоченных элементов вторичной структуры [56]. Отсутствие достаточно надежной информации о третичной структуре белка в адсорбционном слое, связано с крайне ограниченным числом подходящих экспериментальных методик [122].

Изменение динамического поверхностного натяжения отражает процесс формирования адсорбционного слоя, дает представление о времени запаздывания адсорбции белка, а конечные равновесные значения позволяют построить изотерму адсорбции [109]. Для измерения динамического поверхностного натяжения и для

исследования вязкоупругих характеристик межфазных слоев растворов белков используют следующие методы тензиометрии: метод пластины Вильгельми [101,107,108,110,114,115,126], метод максимального давления в пузырьке (метод Ребиндера) [109,127], метод формы подвешенной капли [102,107,109,111,127]. При достаточно длительном времени наблюдения за процессом адсорбции достигается состояние равновесия, которое позволяет построить изотермы адсорбции.

Реологические величины (дилатационная эластичность и вязкость), полученные в результате экспериментов по релаксации после нестационарных или гармонических межфазных возмущений, очень чувствительны к составу межфазных слоев, реологическое поведение при сдвиге качественно отражает состав поверхностного слоя [119]. Адсорбированный слой лизоцима в основном эластичен при сдвиге со слабой частотной зависимостью. Предполагается, что необратимо адсорбированная фракция лизоцима доминирует в динамической реологической реакции [128].

Изменения межфазной реологии и поверхностного давления на границе раздела вода-воздух не происходят немедленно, при pH 7,4 период индукции (время запаздывания адсорбции белка) составил примерно 20 мин, в течение 2-х часов состояние равновесия не было достигнуто [129], что согласуется с результатами измерений динамического поверхностного натяжения [109], которые характеризуются нулевым поверхностным давлением, при этом в начальный момент времени поверхностная концентрация лизоцима не равна нулю [106,109]. Длительный индукционный период при адсорбции лизоцима можно объяснить его жесткой глобулярной структурой, которая препятствует изменению его конформации на поверхности раздела фаз, а значит, и межмолекулярным контактам [109].

Так же как и на границе жидкость/воздух, при адсорбции на поверхности раздела жидкость/жидкость белки, частично разворачиваются и перестраиваются в межфазной области, причем для глобулярных белков, к которым относится лизоцим, динамика адсорбции и изменение конформации в межфазной области происходят чрезвычайно медленно [55,130–132]. Адсорбция белков на поверхности раздела жидкостей сильно зависит от природы гидрофобной фазы, более медленно адсорбция происходит на более полярных границах раздела масло/вода [55,59,133]. Кинетика адсорбции лизоцима очень медленная, что является результатом высокой стабильности его структуры [133]. Результаты, полученные с помощью спектроскопии кругового дихроизма с

использованием синхротронного излучения, показали, относительно небольшое снижение содержания α -спирали, которое зависело от полярности масляной фазы, большее снижение интенсивности наблюдалось на границе раздела гексадекан/вода, чем на границе раздела трикаприн/вода. Лизоцим претерпевает небольшое изменение своей вторичной структуры со значительным сохранением своей третичной структуры при адсорбции на границах раздела нефть/вода. [55].

На основании экспериментальных данных предполагается, что сначала белки адсорбируются на границе раздела и разворачиваются, при этом поверхностное натяжение остается практически неизменным (период индукции). Однако адсорбция лизоцима на поверхности раздела на ранних этапах, даже при ее диффузионном контроле, происходит относительно быстро, на этой стадии адсорбированные молекулы белка остаются близкими к их нативной структуре и практически не взаимодействуют друг с другом. Длительный период индукции лизоцима можно объяснить его жесткой глобулярной структурой, которая препятствует его разворачиванию на поверхности раздела [109], однако даже в присутствии небольшого количества анионного поверхностно-активного вещества (ПАВ) индукционный период лизоцима исчезает [134]. Длительность индукционного периода достаточно различается даже при одинаковых концентрациях лизоцима, что приводит к значительным различиям между кинетическими зависимостями динамических свойств поверхности, и, вероятнее всего, связана с некоторыми кинетическими эффектами, при этом кинетические зависимости поверхностных свойств растворов лизоцима качественно согласуются [122].

С течением времени увеличивается межфазная концентрация лизоцима и уменьшается поверхностное натяжение, далее продолжаются адсорбционные и конформационные перестройки, может происходить образование нескольких адсорбционных слоев и межфазная агрегация [109,130–132]. До начала процессов агрегации, при адсорбции лизоцима на межфазной границе преобладают внутрибелковые взаимодействия, лизоцим все еще сохраняет большую часть своей нативной конформации. С течением времени сильные белковые внутримолекулярные взаимодействия, которые стабилизируют нативную конформацию лизоцима, становятся сильными межмолекулярными взаимодействиями при разворачивании белка, индуцированном поверхностью раздела фаз. Таким образом белки медленно диффундируют и образуют межфазную сетчатую структуру, делая адсорбированный

слой практически необратимым, что связано с большой энергией адсорбции белковых молекул [94,104,130–132]. Несмотря на общую схожесть процессов адсорбции на границах вода/воздух и вода/масло, скорость и равновесная адсорбция белков в одинаковых объемных условиях сильно отличаются, тип и природа раздела фаз влияют на адсорбционное поведение белков [101].

В дополнение к экспериментальным исследованиям для изучения межфазной адсорбции и структуры белков использовали методы моделирования молекулярной динамики: крупнозернистую модель на границе водный раствор/воздух [125] и метод обмена репликами на границе раздела водного раствора с 1,2-дихлорэтаном [135] и с октаном [105]. Лизоцим адсорбируется неспецифическим образом, с использованием кластерного анализа было обнаружено 18 возможных различных конформаций лизоцима на межфазной границе, с преобладанием одной компактной конформации, которая стабилизируется внутримолекулярными взаимодействиями, в том числе дисульфидными связями, и не отличается от нативной структуры белка [105,135]. В основном моделирование адсорбции сосредоточено на начальных стадиях межфазной адсорбции с целью определения факторов, которые опосредуют адсорбцию белков. Стоит отметить, что в рассматриваемых процессах моделирования рассматривается адсорбция одной молекулы на поверхности раздела и не учитываются влияние других адсорбированных белков на конформацию, которая может изменяться в результате боковых электростатических и стерических взаимодействий между молекулами адсорбированного белка [103].

1.2.2. Исследование взаимодействий белков с лигандами в адсорбционном слое

Изменение конформации белка при взаимодействии с ПАВ в объеме водной фазы и на границе раздела может отличаться, а строение комплексов белок/ПАВ и состав адсорбционного слоя зависит от структуры белка (гибкая или жесткая), типа ПАВ (водорастворимое или маслорастворимое, ионогенное или неионогенное), концентрации исследуемых соединений, ионной силы и pH водной фазы, температуры [104,111,119,127,136–138]. Свойства адсорбционных слоев на границе вода/масло и на границе вода/воздух могут существенно отличаться, поэтому взаимодействия белков и ПАВ активно исследуются и на границах раздела вода/воздух [111,119,136,137,139], и на границах вода/масло [119,137,139–141].

Конформация комплексов белок/ПАВ, образующихся на границе раздела вода/масло, позволяет частям молекул белка проникать глубже в масляную фазу, за счет взаимодействия гидрофобных частей белка с органической фазой, что приводит к более толстому адсорбционному слою [104,138]. Исследование на границе вода/масло вызывает большой интерес, с точки зрения анализа роли поверхности раздела фаз в биологических процессах. Некоторые биологические вещества обладают противоположной полярностью, фермент может быть гидрофильным, а субстрат – липофильным, поверхность раздела фаз вода/масло является подходящей для модуляции таких взаимодействий [137].

Кинетику адсорбции из смешанных растворов белок/ПАВ можно изучить с помощью двух различных экспериментальных подходов: последовательной или одновременной адсорбции [111,136]. Межфазные свойства адсорбционных слоев белок/ПАВ, сформированных разными способами, могут существенно различаться, что связано с образованием комплексов белок/ПАВ, которое при одновременной адсорбции происходит в объеме раствора, а при последовательной адсорбции ПАВ образуют комплексы с предварительно адсорбированным белком только на границе раздела [104,138]. Наибольший интерес представляет процесс одновременной адсорбции, так как большинство биологических жидкостей изначально представляют смеси белка с различными соединениями.

Общая картина смешанных адсорбционных слоев основана на сочетании комплексообразования между молекулами белка и ПАВ и конкурентной адсорбции между этими комплексами и свободными (несвязанными) молекулами ПАВ на поверхности раздела жидкости [119]. Комплексообразование может происходить за счет электростатического притяжения между заряженными группами ПАВ и ионными остатками белков и гидрофобного взаимодействия между аполярной частью ПАВ и гидрофобными участками молекул белков. Ионное взаимодействие может приводить к связыванию катионных ПАВ с остатками Glu и Asp, а анионных ПАВ – к остаткам Lys, Arg и His [94]. Для неионогенных ПАВ ионное взаимодействие отсутствует, и молекулы ПАВ могут образовывать комплексы с белком только за счет гидрофобных взаимодействий, одновременно происходит конкурентная адсорбция белка и ПАВ на межфазной границе.

На начальной стадии процесса адсорбции скорость адсорбции ПАВ пропорциональна их концентрации в растворе. Поэтому, если концентрация ПАВ существенно выше концентрации белка, сначала адсорбируется ПАВ, а затем его можно вытеснить более поверхностно-активным веществом – белком [137].

Динамическая поверхностная тензиометрия может предоставить изотермы адсорбции и уравнения состояния смешанных слоев белок/ПАВ, отражающие молекулярные свойства, такие как параметры поверхностной активности. Даже через 24 часа поверхностное натяжение смесей лизоцима/ПАВ на границе водный раствор/воздух продолжает изменяться, динамика адсорбционного слоя зависит от диффузии молекул к границе раздела и последующих конформационных изменений структуры белка [94,104]. Последовательная адсорбция белков и ПАВ может быть исследована при помощи динамического капельного тензиометра, состоящего из коаксиального капилляра в сочетании с системой двойного дозирования, обеспечивающей обмен раствора капли [136–138]. Белки легче вытесняются с поверхности раздела фаз при последовательной адсорбции [137].

Реология межфазного сдвига и дилатационная реология адсорбированных белковых пленок чрезвычайно чувствительна к очень малым количествам ПАВ и предоставляет дополнительную информацию, которая позволяет сделать выводы о структуре смешанных адсорбционных слоев белок/ПАВ, а также определить вытеснение молекул белков молекулами ПАВ с межфазной границы [111,137,138,142].

Увеличение концентрации оксида децилдиметилфосфина (неионогенное ПАВ) в смеси с лизоцимом приводит к постепенному равномерному уменьшению равновесного поверхностного натяжения, дилатационной эластичности и адсорбции лизоцима, что связано с конкурентной адсорбцией лизоцима и ПАВ. Также, в случае неионогенного ПАВ, возможно гидрофобное взаимодействие неионогенного ПАВ с белком, которое приводит к образованию более гидрофильного и менее поверхностно-активного комплекса [104,111]. А в присутствии додецилсульфата натрия ([ДСН] ионогенное, отрицательно-заряженное ПАВ) происходит резкое снижение поверхностного натяжения в диапазоне концентраций от 10^{-5} до 10^{-4} М, которое сопровождается максимумами дилатационной эластичности и адсорбции [111,134]. В случае ионогенного ПАВ сначала происходит образование комплексов белок/ПАВ за счет электростатических взаимодействий, с нейтрализацией зарядов белка противоположно заряженной группой

ПАВ, образовавшиеся комплексы обладают большей гидрофобностью и более высокой поверхностной активностью, чем чистый белок. При дальнейшем увеличении концентрации ПАВ происходит гидрофобное взаимодействие комплексов белок/ПАВ с молекулами ПАВ, комплекс становится более гидрофильным и менее поверхностно-активным, происходит вытеснение молекул белков из межфазных слоев за счет гидрофиллизации комплекса белок/ПАВ («ороженное замещение») и конкурентной адсорбции ПАВ [58,104,111,119,127,137,138]. При превышении определенной концентрации ПАВ, обычно при критической концентрации мицеллообразования (ККМ), из-за образования комплексов и конкурентной адсорбции происходит истощение белка в адсорбционном слое, вплоть до полного вытеснения белка с поверхности раздела молекулами ПАВ, динамическое поверхностное натяжение будет полностью контролироваться поверхностно-активным веществом, поверхность раздела может быть покрыта только свободными молекулами поверхностно-активного вещества [111,137].

При низких концентрациях ПАВ структура глобулярных белков сохраняется, и комплексы белок/ПАВ ведут себя как нативные белки [94]. Взаимодействие ДСН с лизоцимом приводит к уменьшению вклада α -спиралей во вторичную структуру белка и искажению третичной структуры, которое может происходить и в объеме водной фазы, и на границе раздела фаз, при этом результаты малоуглового нейтронного и рентгеновского рассеяния показывают, что сохраняется компактная глобулярная структура комплекса ДСН/лизоцим [58].

1.2.3. Математические расчеты. Модель Файнермана

Тензиометрия является одним из наиболее часто используемых методов на границе раздела фаз, однако анализ получаемых результатов не всегда приводит к однозначному пониманию механизмов на границах раздела и их связи с процессами, происходящими в объеме фаз [94]. Адсорбированные молекулы белка занимают большую площадь, по сравнению с ПАВ, и имеют большое количество конформаций, которые приводят к значительному увеличению неидеальности поверхностной энтропии [104,132]. При большой концентрации белка возможно образование вторичного адсорбционного слоя, который обусловлен, в основном, гидрофобными взаимодействиями. Также стоит отметить время достижения адсорбционного равновесия, которое может достигать десятки часов, и очень медленный процесс десорбции, поэтому адсорбцию белков можно

рассматривать как полуюобратимый или практически необратимый процесс [94,132]. По этой причине самые простые модели изотерм (например, Генри, Ленгмюра) не могут быть использованы для описания адсорбции белка [132]. Было предложено значительное количество теоретических моделей, которые описывают адсорбцию белка [109,132], но наиболее часто используют модель разработанную Файнерманом и его группой [94,109,132,143]. которая учитывает особенности адсорбции белков на границе раздела фаз, в том числе парные взаимодействия между молекулами в адсорбционном слое, наличие заряда на поверхности молекулы белка и возможное агрегирование. Подгонка данных поверхностной тензиометрии к разработанным математическим моделям предоставляет такие полезные данные, как молярная площадь для адсорбированных комплексов, которые имеют важное значение для понимания развертывания и возможного рефолдинга адсорбированных белков [94].

Модель Файнермана, основанная на уравнении двумерного давления Фрумкина, предполагает разворачивание белка, которое происходит при адсорбции на поверхности жидкости, и учитывает, что молекулы белков сосуществуют на границе раздела с различными молярными площадями, которая в насыщенном адсорбционном слое изменяется от минимального значения ($\omega_{min} = \omega_1$) при высоком поверхностном давлении до максимального значения ($\omega_{max} = \omega_n$) при низком поверхностном давлении. Причем молярные площади двух «соседних» конформаций отличаются друг от друга приращением молярной площади ω_0 примерно равной молярной площади растворителя и намного меньше ω_{min} [102,109,142,144,145]. Тогда площадь, занимаемая молекулой белка, для i -го состояния ($1 \leq i \leq n$, где n – количество состояний белка) определяется как:

$$\omega_i = \omega_1 + (i - 1)\omega_0 \quad (1.9)$$

Изотерма двумерного давления индивидуального белка с учетом неидеальной энтропии и энтальпии смешения для поверхностного слоя описывается уравнением:

$$-\frac{\Pi\omega_0}{RT} = \ln(1 - \theta_p) + \theta_p \left(1 - \frac{\omega_0}{\omega}\right) + \alpha_p \theta_p^2 \quad (1.10)$$

где $\Pi = \gamma_0 - \gamma$ – двумерное давление, γ_0 – поверхностное натяжение растворителя, γ – поверхностное натяжение исследуемого раствора, R – газовая постоянная, T – температура, α_p – параметр межмолекулярного взаимодействия между молекулами белка (постоянная Фрумкина), $\theta_p = \omega\Gamma = \sum_{i=1}^n \omega_i \Gamma_i$ – степень заполнения поверхности молекулами белка, $\Gamma = \sum_{i=1}^n \Gamma_i$ – общая адсорбция белка во всех n состояниях,

ω – средняя площадь, занимаемая белком в насыщенном адсорбционном слое [109,119,146].

Изотерма адсорбции для каждого i -го состояния адсорбированной белковой молекулы описывается уравнением:

$$b_{Pi}c_P = \frac{\omega\Gamma_i}{(1-\theta_P)^{\omega_i/\omega}} \exp\left[-2\alpha_P\left(\frac{\omega_i}{\omega}\right)\theta_P\right] \quad (1.11)$$

где c_P – концентрация белка в растворе, b_{Pi} – константа адсорбционного равновесия белка в i -м состоянии [109,119].

Уравнения (1.9) – (1.11) не совсем подходят для описания адсорбции белка из растворов с высокими концентрациями белка, так как не учитывают образование второго адсорбционного слоя или агрегацию белка в адсорбционном слое, когда поверхностное натяжение раствора и двумерное давление имеет практически постоянное значение, а вот адсорбция белка увеличивается. Для описания адсорбции белков из растворов с высокими концентрациями белка, когда образуются два и более адсорбционных слоев, используются более сложные уравнения [109,132,147]. Образование вторичного адсорбционного слоя, обусловленного, в основном, гидрофобными взаимодействиями [104].

Теоретический анализ, полученных экспериментальных данных по адсорбции лизоцима, указывает на диффузионно-контролируемую адсорбцию на ее начальной стадии, далее наблюдается отклонение между теоретической диффузионно-контролируемой моделью и экспериментальными данными, что, скорее всего связано со структурными межфазными изменениями. При высоких концентрациях лизоцима поверхностное давление достигает плато, и сопутствующее увеличение поверхностной концентрации указывает на многослойное образование, что также подтверждается термодинамической моделью [109].

Аналогичные уравнения, описывающие адсорбционные свойства смешанных растворов белков/ионных ПАВ, изотермы двумерного давления и адсорбции, были выведены для смесей белок с ионогенным ПАВ [100], которые учитывают образование комплексов, связанное с возможным кулоновским взаимодействием (индекс P относится к белку, а индекс S – к ПАВ, PS – к комплексу белок/ПАВ):

$$-\frac{P\omega_0^*}{RT} = \ln(1 - \theta_{PS} - \theta_S) + \theta_{PS}\left(1 - \frac{\omega_0}{\omega}\right) + \alpha_{PS}\theta_{PS}^2 + \alpha_S\theta_S^2 + 2\alpha_{SPS}\theta_{PS}\theta_S \quad (1.12)$$

$$b_{PS}(c_P^m c_S)^{1/(1+m)} = \frac{\omega\Gamma_i}{(1-\theta_{PS}-\theta_S)^{\omega_i/\omega}} \exp\left[-2\alpha_{PS}\left(\frac{\omega_i}{\omega}\right)\theta_{PS} - 2\alpha_{SPS}\theta_S\right] \quad (1.13)$$

$$b_S(c_S c_C)^{1/2} = \frac{\theta_S}{(1-\theta_{PS}-\theta_S)} \exp[-2\alpha_S \theta_S - 2\alpha_{SPS} \theta_{PS}] \quad (1.14)$$

где $\omega = (\sum_{i=1}^n \omega_i \Gamma_i) / \Gamma$ (индекс PS опущен), $\omega_0^* = (\omega_0 \theta_{PS} + \omega_S \theta_S) / (\theta_{PS} + \theta_S)$, $\theta_{PS} = \omega \Gamma$ – степень заполнения поверхности комплексами белок-ПАВ, α_{PS} – параметр, описывающий взаимодействие свободных молекул ПАВ с белком, α_{SPS} – параметр, описывающий взаимодействие свободных молекул ПАВ с комплексом белок/ПАВ, α_S – параметр межмолекулярного взаимодействия между молекулами ПАВ (постоянная Фрумкина), m – заряд белка, c_C – концентрация противоиона ПАВ (в отсутствие неорганической соли $(c_S c_C)^{1/2} = c_C$), $(c_P^m c_S)^{1/(1+m)}$ – средняя активность ионов, участвующих в реакции [100,119].

Изотермы двумерного давления и адсорбции для смесей белок/неиногенное ПАВ описываются следующими уравнениями [119,138,144]:

$$-\frac{\Pi \omega_0}{RT} = \ln(1 - \theta_P - \theta_S) + \theta_P \left(1 - \frac{\omega_0}{\omega}\right) + a_P \theta_P^2 + a_S \theta_S^2 + 2a_{PS} \theta_P \theta_S \quad (1.15)$$

$$b_P c_P = \frac{\omega \Gamma_i}{(1-\theta_P-\theta_S) \omega_i} \exp \left[-2a_P \left(\frac{\omega_i}{\omega} \right) \theta_P - 2a_{PS} \theta_S \right] \quad (1.16)$$

$$b_S c_S = \frac{\theta_S}{(1-\theta_P-\theta_S)} \exp[-2\alpha_S \theta_S - 2\alpha_{PS} \theta_P] \quad (1.17)$$

Для описания адсорбционного поведения белков в модели Файнермана используются следующие параметры, которые соответствуют индивидуальному раствору белка: ω_0 , ω_{min} , ω_{max} , α_P и b_{Pi} . Параметры минимальной и максимальной молярной площади поверхности ω_{min} и ω_{max} могут быть определены из геометрических размеров молекулы белка: ω_{min} соответствует геометрическим размерам белка в предельно свернутом состоянии и ω_{max} – в предельно развернутом. Величина ω_0 практически одинакова для всех белков и находится в диапазоне от 2×10^5 м²моль⁻¹ до 5×10^5 м²моль⁻¹. Параметры ω_0 , α_P и b_i получают путем подбора исходя из экспериментальных зависимостей поверхностного натяжения и адсорбции от концентрации [100,109]. Три параметра относятся к отдельному раствору ПАВ (ω_0 , a_S и b_S) и могут быть определены из экспериментальной зависимости Π от c_S с использованием изотермы Ленгмюра или Фрумкина. Параметр m либо известен из независимых экспериментальных данных, либо может быть оценен путем подбора переменных модели к экспериментальным данным для смесей, как и остальные параметры модели. Значение двумерного давления на исследуемой межфазной границе, можно вычислить из межфазного натяжения σ , например, с использованием метода висящей капли. Значения адсорбции ПАВ и белка,

находящихся в смеси можно определить с помощью метода сцинтиллирующей фазы [148], а из них вычислить степень заполнения поверхности каждым компонентом [146].

Изотермы поверхностного натяжения и адсорбции, рассчитанные при помощи модели Файнермана, достаточно хорошо согласуются с данными, полученными из экспериментов для глобулярных белков, лизоцима [109], БСА и ЧСА [132,144], и для белков с более гибкой структурой, β -казеин [132], и достаточно удовлетворительно согласуются для смесей белка с ПАВ: лизоцима [111], ЧСА и β -казеина [144] с оксидом децилдиметилфосфина, лизоцима с ДСН [111], ЧСА с гексадецилтриметиламмонием бромида и β -лактоглобулина с ДСН [146]. Из теоретической модели и набора экспериментальных данных следует, что происходит комплексообразование между молекулами белка и ПАВ, которая сочетается с конкурентной адсорбцией комплексов белок/ПАВ и свободными молекулами ПАВ на поверхности раздела фаз. Для неионогенных ПАВ комплексообразование с белком может происходить только за счет гидрофобных взаимодействий, для ионогенных ПАВ – за счет ионных и гидрофобных взаимодействий, образующийся комплекс оказывается более гидрофобным, чем индивидуальные молекулы белка [119,127].

1.3. РАДИОХИМИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ИССЛЕДОВАНИЮ

Введение радиоактивных изотопов в молекулы белков и другие органические молекулы позволяет с высокой чувствительностью отследить и количественно оценить перемещение меченых молекул при проведении исследований [149]. К числу наиболее распространенных радионуклидов, используемых для биологических и биохимических исследований, относятся ^{14}C , ^{32}P и ^{33}P , ^{35}S , ^3H и изотопы йода ^{124}I , ^{125}I и ^{131}I [150]. Изотопы фосфора, серы и йода применяются достаточно редко, в основном для молекулярной биологии при исследовании обмена веществ в живых организмах [151]. Введение ^{32}P в молекулу белка осуществляют с использованием аденозинтрифосфорной кислоты, меченной ^{32}P , при фосфорилировании белков протеинкиназами, также возможно введение радиоактивной метки химически, путем модификации боковых цепей аминокислот, что может привести к потере активности белка. Получить радиоактивно меченый белок можно в процессе биосинтеза при трансляции белка в присутствии ^{35}S -

метионина/цистеина или с помощью аминокислот, меченных ^3H или ^{14}C , которые можно получить с использованием ферментативного метода синтеза [152]. При выборе аминокислоты необходимо учитывать их участие в метаболических путях, специфическую активность и период полувыведения. При получении меченого белка с помощью биосинтеза сохраняется активность белка, но появляется необходимость его очистки [153–155].

Из изотопов йода, благодаря ядерно-физическим характеристикам, наиболее подходящим изотопом для мечения биологических соединений является йод-125, данный радионуклид распадается путем электронного захвата (период полураспада 59,4 дней) с последующим испусканием мягкого γ -излучения (35,5 кэВ) и характеристического рентгеновского излучения [150]. Для введения изотопов йода в органические молекулы используют йодид натрия или калия, реакцию проводят в присутствии мягких окислителей, таких как йодоген (1,3,4,6-тетрахлор-3 α ,6 α -дифенилглюколурил) или хлорамин Т (N-хлортолуолсульфонамид). Хлорамин-Т является водорастворимым реагентом, а йодоген не растворим в водном растворе, что упрощает очистку меченого препарата. В большинстве случаев такие соединения не повреждают меченые белки, но требуется контроль времени проведения реакции и степени йодирования молекулы, для предотвращения чрезмерного введения радиоактивной метки или окислительного повреждения. Йодоген окисляет I до I⁺, который способен модифицировать аминокислотные остатки тирозина, встраиваясь в орто-положение относительно гидроксильной группы, имидазольные группы гистидина и либо модифицировать сульфгидрильные группы, либо катализировать их окисление до дисульфидов [150,156]. Йодирование белка по тирозиновым группам может изменить его спектральные характеристики в растворе, аминокислотные остатки тирозина могут быть модифицированы двумя атомами йода [150].

Белки меченные йодом-125 используют для исследования адсорбции на твердых фазах и полимерных материалах [157–160]. Исследование связывания лизоцима с эластином [161] проводили с использованием лизоцима меченого йодом-125, который вводили в молекулы лизоцима при помощи Na[^{125}I] в пробирках, покрытых йодогеном (1,3,4,6-тетрахлор-3 α ,6 α -дифенилглюколурила). Удалось обнаружить, что лизоцим не только связывается с эластином, но таким образом защищает эластин от деградации несколькими классами эластолитических протеаз. При исследовании адсорбции

лизоцима на поверхности слюды с помощью метода радиоактивных индикаторов (лизоцим, меченный ^{125}I), спектроскопии флуоресценции полного внутреннего отражения и рентгеноэлектронной спектроскопии [160] наблюдалось хорошее совпадение общего вида изотерм адсорбции, но абсолютные значения адсорбции полученные с использованием белка, меченного ^{125}I , давало сильно завышенные результаты, что связано с изменениями адсорбционных свойств лизоцима, меченного ^{125}I , и эффектами краевой адсорбции поверхностей слюды, к которым не чувствительны спектроскопия флуоресценции полного внутреннего отражения и рентгеноэлектронная спектроскопия. Так как йод-125 является гамма-излучающим радионуклидом, меченные им препараты не подходят для исследования адсорбционных явлений на границах жидкость/жидкость и жидкость/газ.

1.3.1. Адсорбция белков, меченных углеродом-14

Несмотря на большое количество методов по исследованию адсорбции белков на границе раздела фаз, единственным методом для прямого количественного определения белка на межфазной границе является метод радиоактивных индикаторов [112]. В основе метода лежит небольшой пробег β -частиц, испускаемых радионуклидом в результате β -распада, которые к тому же конденсированной фазой ослабляются сильнее, чем воздухом, что позволяет определить количество вещества, находящегося непосредственно вблизи межфазной границы. В качестве радионуклидов испускающих β -частицы для исследования адсорбции в основном применяют белки меченные углеродом-14 [101,106,110,113,115] и тритием [148,162,163]. Так как углерод и водород являются основными компонентами органических молекул, при замене на углерод-14 и тритий изменениями физико-химических и биохимических свойств чаще всего можно пренебречь.

Углерод-14 является природным радиоактивным изотопом и постоянно образуется в верхних слоях атмосферы в результате поглощения атомами азота тепловых нейтронов. Период полураспада углерода-14 составляет 5730 лет, а энергия излучаемых при распаде β -частиц – 156,5 кэВ.

Распространенными методами введения углерода-14 в молекулы белка является ацетилирование ^{14}C уксусным ангидридом [106,113] и восстановительное метилирование ^{14}C формальдегидом с использованием цианоборгидрида

натрия [101,110,112,115,116,154,155,164] аминокислотных остатков лизина и N-конца белка. В результате реакции ацетилирования происходит нейтрализация заряда, что увеличивает гидрофобность белка [106,112]. Реакции восстановительного метилирования Джентофта и Дирборна приводит к дериватизации лизоцима с сохранением заряда белка. Graham и Phillips [106,113] исследовали адсорбцию ^{14}C -ацетилированного лизоцима, β -казеина и БСА на границе вода/воздух [106] и вода/толуол (с добавлением 0,1% не поверхностно-активного сцинтиллятора 2,5-ди(5-бутил-2-бензоксазол)тиофена) [113], обнаружили многослойную адсорбцию при высокой концентрации белка и необратимо адсорбированный монослой, при проведении экспериментов по десорбции. Hunter и др. [112] использовали восстановительное метилирование для получения меченого лизоцима и учли адсорбцию лизоцима на стенках тефлонового контейнера, при построении изотерм адсорбции на границе вода/воздух, смогли обнаружить монослойную адсорбцию лизоцима, изменение ориентации лизоцима при увеличении его концентрации в водной фазе и многослойную адсорбцию при высоких концентрациях белка.

Xu и Damodaran [115] обнаружили, что поверхностная концентрация лизоцима в течение 60-100 мин с момента начала адсорбции уменьшалась со временем, а затем быстро возрастала, рассчитали энергетический барьер активации для адсорбции лизоцима на границе вода/воздух, который составляет около 12 ккал/моль. На основании полученных результатов предположили, что движущей силой адсорбции белков на границах раздела является градиент химического потенциала, а не градиент концентраций.

Метод радиоактивных индикаторов позволил изучить кинетику адсорбции лизоцима и БСА [116], а также лизоцима и β -казеина [165] на границе раздела вода/воздух из их бинарных смесей. Было обнаружено, что белки адсорбируются независимо друг от друга, взаимная адсорбция происходит не по механизму конкурентной адсорбции Ленгмюровского типа. Количество каждого белка в адсорбционном слое зависит не только от концентрации белка, но и от его скорости диффузии из объема водной фазы к поверхности раздела, а также от свободных площадей поверхности раздела фаз, доступных для адсорбции каждого белка. Исследование последовательной адсорбции белков показало, что ни β -казеина, ни БСА не способны вытеснить адсорбированный лизоцим с

поверхности раздела, одновременно лизоцим не способен вытеснить адсорбированный β -казеина и адсорбированный БСА.

Sengupta и Damodaran [110] разработали новый метод для исследования адсорбции на границе вода/органическая жидкость, который заключается в формировании триглицеридной пленки толщиной 1000 Å на поверхности водной фазы с одновременным измерением межфазного давления и межфазной концентрации белка. Продолжением данной работы являлось исследование адсорбции лизоцима, β -казеина и БСА на границах раздела вода/воздух и вода/триолеин [101], с целью анализа полученных результатов с точки зрения вклада различных молекулярных сил в энергию взаимодействия белков с поверхностями раздела фаз. Для лизоцима скорость адсорбции была на порядок выше его объемного коэффициента диффузии на границе триолеин/вода, и на порядок ниже на границе раздела вода/воздух. Медленная скорость адсорбции лизоцима на границе вода/воздух объясняется наличием энергетического барьера. Лизоцим, β -казеин и БСА адсорбировались на границах вода/воздух и вода/триолеин с различной скоростью, что связано с разной потенциальной энергией взаимодействия белков с поверхностями раздела фаз. На основании полученных результатов и произведенных расчетов было установлено, что основную роль в определении адсорбции белков на поверхностях раздела играют дисперсионные силы.

1.3.2. Получение меченных тритием соединений

Прежде чем перейти к рассмотрению исследований адсорбции белков и их взаимодействия с лигандами в объеме фаз и на межфазной границе при помощи атомарного трития и меченных тритием соединений, будут кратко рассмотрены методы введения трития в биологически активные молекулы и в молекулы белков. Преимуществами использования трития являются его большой период полураспада (12,3 года), небольшая энергия β -частиц (максимальная энергия 18,6 кэВ, средняя энергия – 6,5 кэВ), высокая удельная активность получаемых препаратов. Большой период полураспада позволяет проводить достаточно длительные эксперименты без введения поправки на распад. Небольшая энергия β -частиц трития обеспечивает радиохимическую стабильность, а также дает возможность проводить исследования без специальных мер защиты от излучения. Основным недостатком использования трития является риск нестабильности меченного тритием соединения, вызванный изменением рН или

ферментативным окислением, в результате часть трития из целевой молекулы может перейти в воду, что приведет к искажению результатов измерений. Избежать данной проблемы можно путем введения трития в такие положения, из которых невозможна его потеря, также возможно провести предварительные эксперименты по оценке стабильности включения метки в меченное тритием соединение [149,166].

Введение атомов трития в молекулы белков возможно с помощью методов биосинтеза, химического синтеза, изотопного обмена или физико-химического подхода [167–169]. Источниками трития для проведения химических синтезов меченых соединений могут служить: газообразный тритий в реакциях каталитического гидрирования ненасыщенных органических соединений и дегалогенирования [170–172]; тритиевая вода при гидролитическом разложении солей Гриньяра или литийорганических соединений [170]; бортритид натрия, литий триметоксибортритид ($\text{LiB}(\text{OMe})_3\text{T}$) и другие тритиды металлов в реакциях восстановления альдегидов, кетонов, хлорангидридов и лактонов [170–176]. Преимуществом прямого химического синтеза является получение меченой молекулы с высокой удельной активностью, в которой радионуклид будет находиться в определенном положении, однако синтетические методы ограничены существующими реакциями получения органических веществ и сложностью синтеза [169,170]. Так ввести тритий в небольшие пептиды можно с использованием меченых предшественников, например, меченых аминокислот, или при помощи реакций гидрирования и дегалогенирования из ненасыщенных или галогенированных производных, соответственно. Получение меченого белка, обладающего нативной третичной структурой, таким способом не представляется возможным. Для получения меченого тритием белка можно использовать окислительное йодирование белка с последующим дейодированием и восстановлением путем обработки газообразным тритием в присутствии катализатора [171], или восстановительное метилирование пептидов и белков, которое заключается в образовании основания Шиффа с аминокислотными остатками лизина при добавлении формальдегида, с последующим восстановлением NaB^3H_4 , в результате происходит замена атома водорода у первичного амина лизина на $[\text{}^3\text{H}]$ метильную группу [154,155,177].

При получении меченых соединений сложного состава перед химическими методами синтеза метод изотопного обмена имеет преимущество из-за универсальности

и одностадийности, в результате образуется идентичная молекула, обладающая такими же биологическими и химическими свойствами, как и исходная молекула. Для введения трития в молекулы белков не подходит изотопный обмен с тритиевой водой, поскольку для проведения реакции необходим нагрев, который приводит к денатурации белка [171]. Поэтому получение меченных тритием белков осуществляют путем изотопного обмена с газообразным тритием в присутствии катализаторов на основе переходных металлов: палладия, платины, марганца, никеля, кобальта, родия, рутения, их смесей и наночастиц этих металлов при гетерогенном изотопном обмене; при гомогенном изотопном обмене в качестве катализаторов используют различные комплексы палладия, платины, рутения, родия и иридия [171,178–181]. Гетерогенный катализ с Pd-катализатором можно использовать и для получения соединений меченных дейтерием, при этом достигается высокая степень замещения водорода на дейтерий [182,183]. Модификация поверхности катализатора в сочетании с органическими основаниями при гетерогенном изотопном обмене влияет на эффективность изотопного обмена, в качестве подложек используют C, Al₂O₃, CaCO₃, BaSO₄ [180]. Метод высокотемпературного твердофазного каталитического изотопного обмена, основанный на воздействии газообразного трития на высокодисперсную смесь вещества и катализатора на основе переходного металла без растворителя при температурах 130 – 180 °С, оказался эффективным для введения трития в молекулы пептидов и белков, реакция протекает под действием спилловера водорода [184–188]. Эффект спилловера водорода представляет собой распространенное межфазное явление, при котором активные атомы водорода, в нашем случае трития, образующиеся в результате диссоциации T₂ на поверхности переходного металла, мигрируют по подложке и участвуют в каталитической реакции с субстратом, адсорбированного на этом участке [172,189]. Несмотря на то что последние десятилетия проводились различные исследования, до сих пор нет всестороннего понимания спилловера водорода, предполагают, что миграция водорода может происходить за счет переноса пар протонов и электронов, в виде сольватированного протона или атомарного водорода [185–189].

С помощью метода высокотемпературного твердофазного каталитического изотопного обмена удалось получить меченные тритием β-галактозидазу [190], β-глюкозидазы [190], коллаген [186], коллагеназа [186], лихеназа [186], гемоглобин [191] рекомбинантный человеческий инсулин [192] с высокой удельной активностью и полным

сохранением ферментативной активности. Скорость и эффективность изотопного обмена зависит от условий протекания реакции, радиационно-химический выход возрастает с повышением температуры, но введение трития в сложные органические соединения важно проводить в более мягких условиях для сохранения их структуры и биологической активности, поэтому необходимо подбирать оптимальные условия проведения реакции [178,190–192]. До сих пор продолжаются разработки различных комплексов переходных металлов с целью использования в качестве катализаторов изотопного обмена для достижения региоселективности и высокой эффективности включения трития в молекулы при более мягких условиях [178].

Метод отдачи имеет ограниченное применение из-за низкого выхода и трудностью отделения целевого меченого вещества от побочных продуктов. В процессе ядерной реакции, когда частицы вылетают из ядра, образуются атомы или ионы отдачи, которые способны взаимодействовать с другими молекулами, которые присутствуют в мишени. Соединения меченные тритием получают в реакторе по реакции ${}^6\text{Li}(n,\alpha){}^3\text{H}$, для этого образец смешивают с солью лития и облучают в реакторе, замещение трития преимущественно происходит в результате изотопного обмена [193]. Преимуществом данного метода является сохранение молекулярной структуры, поскольку происходит только замещение атомов водорода атомами трития. Метод отдачи нашел применение для введения трития в молекулы природных органических соединений, для которых неизвестен химический метод синтеза. С помощью метода отдачи был введен тритий в мембрану куриной яичной скорлупы (удельная активность 18 МБк/г) для исследования распределения в органах и тканях мышей [194]. Высокая энергия атомов отдачи приводит к плохому выходу и, следовательно, к низкой удельной активности меченого продукта.

Меченные тритием соединения можно получить с использованием метода Вильцбаха, по сути это изотопный обмен между атомами трития и органической молекулой инициированный β -распадом трития, в результате которого энергия, выделившаяся при β -распаде, расходуется на возбуждение и ионизацию молекул трития и органических молекул. Метод Вильцбаха заключается в выдерживании субстрата в течении нескольких дней или недель в атмосфере газообразного трития (с активностью несколько Кюри) при $-196\text{ }^\circ\text{C}$ или при комнатной температуре. Несмотря на мягкие температурные условия недостатком метода является образование побочных

высокоактивных продуктов, которые возникают под действием β -распада трития и с трудом отделяются от целевого меченого соединения [171,187].

Улучшить метод Вильцбаха удалось, уменьшив давление газообразного трития ниже 6,65 Па и время проведения реакции, количество используемого трития снизилось примерно в 1000 раз, а белки меченые таким образом: термолизин, бычья рибонуклеаза А и свиная панкреатическая эластаза сохраняли около 95 % своей активности [171,195]. Более высокой удельной активности белков без потери биологической активности получилось добиться с использованием ускоренного пучка газообразных ионов трития, который при столкновении с твердой мишенью приводил к обмену водорода на тритий, так были полученные меченные тритием рибонуклеаза А, свиная панкреатическая эластаза, термолизин, соевый ингибитор трипсина, альфа1-протеиназы ингибитор и два пептидных альдегида лейпептин и антипаин [167]. Увеличить скорость введения трития можно с использованием электрического или микроволнового разряда, УФ и γ -излучения, однако чаще всего в результате помимо целевого меченого соединения образуется значительное количество побочных продуктов [171,187,196].

1.3.3. Метод термической активации трития

Получить активные формы трития для взаимодействия с субстратом можно при помощи метода термической активации трития (МТАТ). В основе МТАТ лежит каталитическая диссоциация газообразного трития на вольфрамовой проволоке, нагретой при помощи электрического тока до высокой температуры (1500 – 2200 К), далее «горячие атомы» трития взаимодействуют с твердой мишенью, расположенной на стенках сосуда, при температуре 77 или 295 К. Максимальной эффективности введения атомов трития в мишень удастся достичь при низких давлениях газообразного трития, когда длина свободного пробега атомов трития равна расстоянию от поверхности вольфрамовой проволоки до мишени, при этом атомы трития практически не теряют свою энергию [197].

Для введения трития в целевую молекулу, раствор вещества равномерно наносят тонким слоем на стенки стеклянного реакционного сосуда и, лиофилизацией для водных растворов или воздухом для спиртовых растворов, удаляют растворитель. При проведении реакции вольфрамовая проволока расположена в центре реактора, что обеспечивает равномерность введения метки по всей площади взаимодействия.

Замещение протия «горячими атомами» трития может происходить в любом положении органической молекулы. Замещение протия тритием в СН-связи приводит к целевому меченому соединению, при замещении в функциональной группе образуется лабильная метка, в этом случае, при растворении меченого вещества в протонном растворителе, возможна обратная замена трития на протий. Поэтому для дальнейшей работы с меченым веществом проводят его очистку от атомов трития находящихся в лабильных положениях путем многократного упаривания раствора или с помощью диализа. Взаимодействие «горячих атомов» трития с веществом может приводить к замене функциональных групп (гидроксильной, аминогруппы и галогена) на атомы трития и элиминированию диоксида углерода и галогена, также возможно тритирование кратных связей, что приводит к образованию побочных продуктов. В случае аминокислот необходимо учитывать возможность реакций дезаминирования и декарбоксилирования, что актуально и в случае введения трития в молекулы белков [198,199].

Введение трития в органические молекулы с помощью МТАТ не оказывает влияние на их структуру и функциональную стабильность, поэтому данный метод был использован для получения меченных тритием органических соединений различных классов: аминокислот (глицина, аланина, норлейцина, валина, норвалина, лизина, аргинина, аспарагиновой кислоты, серина и пролина) [163,197,198,200]; производных пантотеновой кислоты (гомопантотеновой кислоты, пантотенат натрия, пантетин) [197]; аминокликозида (амикацина) [201]; ионогенных ПАВ (ДСН, додецилтриметиламмоний бромида [ДТАБ], тетрадецилтриметиламмоний бромида [ТТАБ], цетилтриметиламмоний бромида, мирамистина, кокоамидопропил бетаина) [197–199,202]; неионогенных ПАВ (Бридж-35, Тритон Х-100 и плуроников L61 и P123) [197,203,204]; пептида (даларгина) [205]; производных полисахаридов (кагоцела) [206]; биополимеров (гиалуроновой кислоты, хитозана) [207,208]; белков (лизоцима, БСА, ЧСА, α -химотрипсина) [162,197,209]; гуминовых веществ, выделенных из бурого угля, угля леонардит, почвы и торфа (гуминовых кислот, фульвокислот и гиматомелановых кислот) [163,210,211].

Можно выделить три основных требования предъявляемых к меченым соединениям для дальнейшего проведения исследований с их использованием: идентичность меченого соединения исходному, высокая радиохимическая чистота и

высокая молярная радиоактивность. Все эти параметры и радиохимический выход меченого соединения находятся под сильным влиянием условий введения трития.

Для обеспечения высокой удельной радиоактивности меченого соединения с минимальным содержанием побочных продуктов осуществляют подбор оптимальных условий введения трития в целевую молекулу: способа приготовления мишени, массы мишени, температуры атомизатора (вольфрамовой проволоки) и мишени (стенок сосуда), давления трития в реакционном сосуде, продолжительности воздействия трития на мишень [197,198,210].

Температура атомизатора устанавливает интенсивность потока атомов трития и их начальную энергию, и, в случае низкого давления газообразного трития, когда реализуется ситуация свободного пробега атомов трития до мишени, энергию «горячих атомов» перед взаимодействием. Повышение температуры вольфрамовой проволоки приводит к увеличению доли реакционноспособных частиц и скорости образования атомов трития. Изменение температуры атомизатора оказывает влияние на соотношение продуктов реакции [198,212,213].

Для большинства биологически активных молекул зависимость выхода целевого меченого продукта от температуры вольфрамовой проволоки носит экстремальный характер [197,198]. Для лизина максимум удельной радиоактивности наблюдался при 1800 К, для аспарагиновой кислоты – 1900 К [198], для лизоцима – 1850 ± 50 К [162,197], для меченых алкилтриметиламмоний бромидов радиохимический выход не зависел от температуры проволоки [198]. Более высокая температура вольфрамовой проволоки приводит к снижению выхода меченого целевого соединения, при этом увеличивается радиоактивность побочных продуктов [198,207]. Снижение температуры вольфрамовой проволоки приводит к замедлению образования меченого продукта, увеличения удельной активности можно добиться, увеличив продолжительность реакции, но при этом так же увеличится выход побочных продуктов [214].

Скорость реакций замещения зависит от энергий взаимодействующих частиц, а при столкновении с молекулами газа «горячие атомы» трития теряют свою энергию, поэтому максимальная эффективность введения трития в вещество реализуется при длине свободного пробега атома трития равной расстоянию от вольфрамовой проволоки до мишени. [212]. При увеличении давления газообразного трития увеличивается скорость атомизации трития на вольфрамовой проволоке, однако уменьшается количество атомов,

которые долетают до мишени без столкновений, поэтому использование больших давлений для введения трития не целесообразно [214,215]. Давление подбирается так, чтобы обеспечить пролет атомов трития от вольфрамовой проволоки до мишени без столкновений и, как следствие, без потери энергии, такую систему можно рассматривать как неравновесную [198,213]. Для реакционного сосуда диаметром 6 см при температуре мишени 77 К длина свободного пробега реализуется при давлении газообразного трития менее 0,5 Па [197].

Атомизация водорода на нагретой вольфрамовой проволоке под действием приложенного электрического напряжения была открыта И. Ленгмюром в 1912 году [216], впервые применена к тритию в 1964 году [217]. Введение трития осуществили в молекулы глюкозы и сахарозы, реакцию проводили около 30 мин, удалось достичь активности порядка 5 мКи/мг. В дальнейших исследованиях [212] было показано, что включение нагрева проволоки на короткие промежутки времени (~ 15 с) с интервалами для охлаждения (20-30 с) позволят получать препараты с удельной активностью порядка $10^3 - 10^4$ мКи/г. А позже [214] количество трития в системе увеличивали обновлением состава газовой фазы, обнаружили, что максимальная радиоактивность меченого вещества достигается за 10-30 с, при увеличении времени проведения реакции радиоактивность целевого вещества либо не изменяется, либо начинает уменьшаться, что, вероятно связано с побочными реакциями, которые разрушают меченый препарат. Таким образом было установлено, что нет необходимости проводить реакцию в течение длительного времени, а для веществ, имеющих в своем составе лабильные группы, длительное воздействие атомарным тритием может привести к низкому радиохимическому выходу и деструкции меченого вещества [198]. Максимальная радиоактивность целевого продукта при оптимальной температуре атомизатора достигается за ~10 с, а далее начинает уменьшаться, хотя общая радиоактивность мишени растет [214]. Даже в случаях, когда с увеличением времени радиоактивность целевого меченого соединения возрастает, параллельно возрастает количество побочных продуктов, что приводит к усложнению процедур очистки препарата [197].

При первом применении МТАТ для получения меченых соединений [213,217], помимо длительного нагревания вольфрамовой проволоки, использовали мишень достаточно большой массы (100 мг). Позже [214] было показано, что ограничением МТАТ для получения меченых веществ с высокой удельной радиоактивностью является

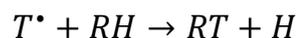
низкая проникающая способность атомов трития. Принято считать, что глубина реакционной зоны составляет всего 0,5 нм. Следовательно, максимально развитая поверхность мишени и небольшие навески вещества позволяют добиться большей удельной радиоактивности при прочих равных условиях [214].

Температура мишени также оказывает влияние на выход, так увеличив температуру мишени с 77 К до 295 К удалось увеличить удельную радиоактивность меченого тритием лизоцима в 40-60 раз. На примере лизоцима, было показано, что температура мишени влияет на распределение трития по аминокислотным остаткам лизоцима. Стоит отметить, что при изменении температуры мишени, для достижения максимальной радиоактивности вещества, необходимо скорректировать остальные параметры, в особенности давление газообразного трития в системе, для температуры мишени 295 К оптимальное давление преимущественно составляет $1,1 \pm 0,1$ Па [162,197].

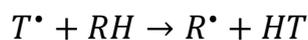
1.3.4. Тритиевая планиграфия биологических макромолекул (белков)

МТАТ позволяет ввести атомы трития в С-Н связи биологических объектов с сохранением их пространственной структуры и биологических функций [218]. Образование целевого меченого вещества может происходить в результате двух разных процессов:

1. в одну стадию путем прямого замещения водорода горячим атомом трития (пороговая энергия 1,5 эВ)



2. в две стадии путем отрыва атома водорода от целевой молекулы с образованием свободного радикала (пороговая энергия 0,3-0,4 эВ) с последующей рекомбинацией с атомом трития (нулевая энергия активации)



Дополнительно во всем диапазоне энергий происходит замедление атомов трития в результате нерекционных столкновений, причем сечение реакций замедления на порядок превышает сечение целевых взаимодействий. Радикальные реакции, протекающие в системе, нельзя описать как изотермический процесс, в котором не учитывается термализация атомов трития. При бомбардировке мишени атомами трития

реализуется неравновесный процесс, в котором кинетика и механизм реакций зависят от энергии атомов [197].

Для атомов трития с энергией меньше 1,5 эВ возможен только отрыв атома водорода, чтобы снизить энергию атомов трития с 1,5 эВ до 0,3 эВ необходимо около 10 столкновений. Для исследования структуры биологической макромолекулы атомами трития необходимо, чтобы реакция с горячим атомом трития происходила только при первом столкновении. Данное условие выполняется при начальной энергии «горячих» атомов около 0,4 эВ, уже после первого нереакционного столкновения у атомов трития недостаточно энергии для отрыва атома водорода, так при температуре вольфрамовой проволоки 2000 К только около 20% атомов трития имеют энергию выше 0,3 эВ. Возможны вторичные реакции свободного радикала, образовавшегося в результате реакции отрыва водорода, вероятность протекания которых можно уменьшить, понизив температуру мишени. При температуре мишени 77 К преимущественно будет протекать реакция рекомбинации свободного радикала с атомами трития с образованием целевой меченой молекулы, а локализация метки будет определяться стерической доступностью соответствующего участка молекулы. Так для белков замена атомов водорода на тритий в основном происходит в аминокислотных остатках, расположенных на поверхности белка. Определив положение нелабильного трития, можно смоделировать структуру макромолекулы. Анализ структуры биологических макромолекул с помощью бомбардировки мишени «горячими» атомами трития называют «тритиевой планиграфией» [197,213,219–221].

С помощью тритиевой планиграфии были исследованы структуры макромолекул и надмолекулярных структур: белков (миоглобина, λ -*cro*-репрессора, парвальбумина карпа, лизоцима, α -лактальбумина, ЧСА, рибонуклеазы А) [222–224]; экспозиции белков на поверхности рибосом [225]; делипидированных фрагментов бактериородопсина [226,227]; вируса табачной мозаики [228–230]; Х-вируса картофеля [231–233]; картофельного вируса А [234]; вируса гриппа А [235–241]. Было обнаружено, что для белков распределение трития по аминокислотным остаткам соответствует их доступным площадям поверхности, определенных из результатов рентгеноструктурного анализа [242].

«Модель первого столкновения» достаточно удовлетворительно описывает результаты, полученные в экспериментах, однако она не способна полностью объяснить

некоторые данные [197,229,242,243]. Например, при исследовании вируса табачной мозаики мечеными оказались несколько аминокислотных остатков находящихся на внутренней поверхности центрального канала, расположенных в ~ 7 нм от поверхности вируса [228].

Потеря энергии атомом трития в результате нереакционного взаимодействия зависит от центра масс рассеяния и угла рассеяния. При попадании атома трития в среду с высокой электронной плотностью после столкновения он либо вступает во взаимодействие, либо покидает мишень. В случае, если происходит несколько столкновения с углом рассеяния $< \pi/2$, атом трития попадает внутрь мишени с минимальными потерями энергиями, осуществляется, так называемый, «эффект соскальзывания» [197,213,244]. В липидной бислойной мембране и других молекулярных структурах, где молекулы в мишени имеют параллельную ориентацию, атомы трития способны «соскальзывать» в глубину мишени, поэтому «модель первого столкновения» неприменима для интерпретации результатов, полученных при исследовании липидных мембран [243,244]

Для определения положения атомов трития в молекулах белка после облучения мишени необходимо: удалить лабильные атомы трития, провести выделение и дополнительную очистку от примесей целевой макромолекулы, разделить на субъединицы (пептиды или аминокислотные остатки), провести анализ субъединиц с определением радиоактивности, определить распределение радиоактивности по субъединицам [245]. Для анализа распределения трития в молекулах белка проводят либо ферментативный, либо тотальный кислотный гидролиз, который разделяет белок на аминокислоты. Ферментативный гидролиз приводит к смеси пептидов, которые можно разделить и идентифицировать с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). При проведении кислотного гидролиза каждого пептида можно получить информацию об удельной активности аминокислот каждого типа в этом пептиде. Идеальной считается ситуация, когда в результате ферментативного гидролиза произошло разделение белка на пептиды так, что в любом образовавшемся пептиде каждая аминокислота встречается не более одного раза, однако на практике такое встречается не часто. На основании полученных данных можно смоделировать пространственную структуру макромолекулы, определить доступную поверхность белка и изучить конформационные переходы [213,222,223,246]. В сравнении с

рентгеноструктурным анализом тритиевую планиграфию можно использовать как для кристаллов, так и для растворов биологических макромолекул, что является бесспорным преимуществом наряду с высокой чувствительностью, которая позволяет обнаружить конформационные переходы, которые не получается определить даже с помощью спектральных методов [218,221].

Ряд экспериментов с модельными соединениями выявил корреляцию между площадью доступной поверхности и включением трития в молекулы аминокислот [198,200], пептидов [247] и белков [221]. В этих работах были определены нормировочные коэффициенты, которые характеризуют возможность реакции аминокислотных остатков с атомами трития с образованием меченого соединения. Нормировочные коэффициенты, полученные для разных модельных систем, отличаются, как и условия проведения эксперимента. В таблице 1 приведены коэффициенты, полученные при определении распределения трития в пептидах как моделях полностью развернутой цепи [247], так как время реакции и количество соединения приближено к условиям, в которых в последнее время проводились аналогичные исследования [248–250].

Таблица 1 – Нормировочные коэффициенты, характеризующие способность аминокислотных остатков взаимодействовать с атомарным тритием [247]

Аминокислотный остаток	К	Аминокислотный остаток	К
Asp-Asn	0,97	Val	15,05
Thr	1,81	Ile	20,40
Ser	1,13	Leu	19,10
Glu-Gln	0,87	Tyr	3,06
Pro	2,64	Phe	3,54
Gly	1,00	Lys	1,42
Ala	1,95		

Метод тритиевой планиграфии также применяют для исследования адсорбционных слоев на границе раздела жидкость–газ, в том числе многокомпонентных систем, для которых радиоактивность каждого вещества пропорциональна его содержанию в приповерхностном слое [251]. При бомбардировке адсорбционных слоев атомы трития будут преимущественно локализованы в молекулах или фрагментах

молекул, расположенных на границе раздела жидкость/газ и непосредственно контактирующих с газовой фазой [252]. На основании данных, полученных в результате исследования адсорбции лизоцима на границе вода/воздух с помощью метода зеркального отражения нейтронов, был сделан вывод о том, что молекулы белка в насыщенном адсорбционном слое имеют предпочтительную продольную ориентацию, погружены С-концом в воду [120]. Однако, при бомбардировке атомы трития интенсивно встраивались в аминокислотные остатки, находящиеся на противоположных концах молекулы, что позволило предположить, что молекулы лизоцима при концентрации 2 мг/мл могут иметь две равновероятные противоположные ориентации на границе раздела фаз [213,246]. Дальнейшее исследование адсорбционных слоев лизоцима с разной концентрацией [248] показало, что при низких концентрациях (0,1 мг/мл) лизоцим в адсорбционном слое ориентирован остатками фенилаланина к воздушной фазе. Увеличение концентрации лизоцима приводит к реорганизации молекул в адсорбционном слое и вращению молекул лизоцима таким образом, что вероятны оба положения. А при концентрации лизоцима 2 мг/мл в водном растворе происходит образование димеров, в которых молекулы лизоцима ориентированы в противоположных направлениях [248].

При исследовании адсорбционных слоев растворов белков (инсулина, панкреатического ингибитора трипсина, рибонуклеазы S, лизоцима, миоглобина, α -химотрипсина, субтилизина BNP', термолитина, карбоксипептидазы A) было обнаружено, что большая часть глобулы белка погружена в раствор, а над поверхностью раствора, в контакте с газовой фазой, находится незначительная часть глобулы. При этом доля белковой глобулы, выступающая над поверхностью раствора, не коррелирует с гидрофобностью белка [252].

С помощью метода тритиевой планиграфии было исследовано влияние на адсорбцию лизоцима на границе водный раствор/воздух ионогенных (ДТАБ и ДСН) [248] и неионогенных ПАВ (Бридж-35, плуроников L121, P123 и F127) [249,250]. Добавление ионогенных ПАВ (ДТАБ и ДСН) к растворам лизоцима [248] приводит к существенному снижению удельной радиоактивности лизоцима, что связано с вытеснением лизоцима из адсорбционного слоя. При этом дальнейшее увеличение концентрации ПАВ не вызывает значительного изменения радиоактивности лизоцима, вероятно, в исследуемых диапазонах концентраций адсорбционный слой состоит из молекул белка и ПАВ.

Добавление ДТАБ и ДСН снижает радиоактивность всех аминокислотных остатков, однако при мольном соотношении лизоцим-ДСН 1:10 наблюдали увеличение радиоактивности гидрофобных аминокислотных остатков, из-за повышения их доступности для взаимодействия с атомами трития в результате образования комплекса лизоцим-ДНС.

Добавление неионогенных ПАВ (Бридж-35 и плуроника P123) к лизоциму [249], напротив, приводило к увеличению его удельной радиоактивности аминокислотных остатков и белка в целом, что, вероятно, связано с образованием мягких комплексов, проницаемых для атомов трития и обеспечивающих мечение приповерхностного слоя. Значимых изменений в распределении трития по аминокислотным остаткам не было обнаружено, при этом изменилось соотношение удельных активностей аминокислотных остатков фенилаланина и пролина, которые расположены на разных концах молекулы. На основании полученных данных был сделан вывод, что добавление неионогенных ПАВ приводит к вытеснению 40–75% белка из адсорбционного слоя, а оставшиеся молекулы белка переориентируются так, что аминокислотные остатки пролина направлены к воздушной фазе. Переориентация молекул лизоцима наблюдалась и в присутствии плуроников L121 и F127 [250], однако увеличение удельной активности лизоцима было не таким выраженным, как при добавлении Бридж-35 и Плуроника P123.

1.3.5. Метод сцинтиллирующей фазы (возможности и применение)

На кафедре радиохимии химического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова в 1990-х годах была разработана методика определения концентрации белков, на примере БСА и ЧСА, на межфазной границе двух несмешивающихся жидкостей с использованием меченных тритием соединений и жидкостной сцинтилляционной спектрометрии [253]. Разработанный метод радиоактивных индикаторов получил название «метод сцинтиллирующей фазы», в основе которого лежит регистрация β -частиц, испускаемых тритием в составе молекул, находящихся в органической фазе, обладающей сцинтилляционными свойствами, и вблизи межфазной границы.

В качестве неполярной органической фазы, ограниченно смешивающейся с водой, могут выступать прежде всего ароматические углеводороды (толуол, *n*-ксилол) [126,163,211]. В молекулах толуола и *n*-ксилола имеются делокализованные π -электроны, которые при переходе из возбужденных состояний в основное испускают

кванты света, то есть данные молекулы обладают сцинтилляционными свойствами, к ним дополнительно добавляют только 2,5-дифенилоксазол (0,4 %) для улучшения регистрационных характеристик. Можно также использовать предельные углеводороды (октан, гексан, циклогексан, декан) и высшие спирты (октанол) [148,203,254]. К предельным углеводородам и спиртам дополнительно добавляют нафталин (от 4 до 6 %) для придания сцинтилляционных свойств и 2,5-дифенилоксазол (0,4 %) [148,202,203,254].

При сравнении МСФ с предыдущими аналогичными исследованиями [112,113,115] можно выделить два основных преимущества. Первое заключается в простоте и универсальности проведения исследования, что дает возможность использовать любой жидкостно-сцинтилляционный спектрометр в отличие от специально сконструированного прибора. Второе – в использовании меченных тритием соединений, а не метелированных или ацелированных производных белков, меченных углеродом-14. Использование трития вместо углерода-14 позволяет наблюдать за более тонким межфазным слоем, что связано с энергией и пробегом β -частиц. Максимальный пробег β -частиц, испускаемых атомами углерода-14, в воздухе составляет 20 см, в воде – 250 мкм (средний пробег около 30 мкм), а β -частиц, испускаемых атомами трития, составляет в воздухе – 5,7 мм, в воде – 6,0 мкм (средний пробег 1,6 мкм) [166,254].

В дальнейшем метод был усовершенствован: стеклянные флаконы объемом 20 мл заменили полиэтиленовыми объемом 7 мл, что позволило снизить влияние краевых эффектов в месте контакта трех фаз и адсорбцию вещества на стенках флаконах; измерение радиоактивности аликвоты органической фазы и остатка двухфазной системы вместо экстраполяции скорости счета к нулевому объему сцинтиллирующей фазы повысило точность измерения экспериментальных данных [148,163]. С помощью МСФ возможно определить кинетику перераспределения меченого вещества между фазами, его равновесные концентрации в водной и органических фазах, коэффициент распределения между ними, который дополнительно позволяет оценить степень гидрофобности вещества, и адсорбцию на межфазной границе [163]. Коэффициент распределения вещества в системе октанол/вода является мерой его гидрофильности/липофильности [211,255,256]. Вместо октанола иногда используют другие органические неполярные растворители [148,163,211,257]. Коэффициент распределения считается биологически важным физическим параметром, так как

коррелирует со способностью биологически активных веществ проникать через клеточную мембрану [162,258].

Преимуществом использования МСФ для исследования адсорбции перед традиционными, не радиохимическими, методами заключается в непосредственном измерении избыточного количества вещества на межфазной границе путем регистрации его радиоактивности, что позволяет проводить анализ, не нарушая целостности системы, а чувствительность метода определяется лишь удельной радиоактивностью меченого вещества [148,259]. Поэтому с помощью МСФ можно исследовать адсорбцию ПАВ при их концентрации много ниже ККМ, веществ с низкой поверхностной активностью, одного соединения в присутствии смеси других веществ, а также распределение в двухфазной системе с определением коэффициентов распределения [148,254]. К недостаткам можно отнести длительность эксперимента, время установления равновесия в двухфазной системе зависит от размера молекулы и составляет от нескольких часов (третиевая вода) до нескольких дней (гуминовые вещества) [148], и возможность образования микроэмульсий в поверхностном слое при низких поверхностных натяжениях из-за незначительных встряхиваний в ходе эксперимента. Данные обстоятельства нужно учитывать при интерпретации результатов, а также при сравнении с результатами, полученными с помощью других методов [254].

При помощи МСФ впервые удалось оценить гидрофобность и поверхностную активность гуминовых веществ различного происхождения, сравнить их между собой. Было установлено, что с увеличением средних значений молекулярной массы гуминовых веществ возрастает максимальная адсорбция на межфазной границе вода/толуол, дополнительно влияние на адсорбцию оказывает соотношение атомов Н/С в молекуле [211]. При помощи МСФ было исследовано поведение в двухфазной системе вода/неполярная органическая жидкость (толуол, *n*-ксилол, циклогексан, октан) и адсорбция на межфазной границе следующих веществ: катионных ПАВ (ДТАБ, ТТАБ, бромида цетилтриметиламмоний) [126,148,254,260], анионного ПАВ (ДСН) [148,254] неионогенного ПАВ (Тритон X-100, плуроников) [148,203,250], белков (лизоцим, ЧСА) [162,261,262], гуминовой кислоты, выделенной из угля, и других гуминовых веществ [261,263]. Исследование поведения лизоцима в двухфазных системах вода/октан, вода/*n*-ксилол и вода/октанол с определением радиохимических коэффициентов распределения и изотерм адсорбции позволило выявить, что взаимодействие

гидрофобных аминокислотных остатков белка с границей раздела играет значительную роль в распределении белка [262], за счет которого поверхностная активность лизоцима выше на границе вода/органическая жидкость по сравнению вода/воздух [162].

Практическим преимуществом МСФ является возможность определения адсорбции на межфазной границе и распределения в двухфазной системе одного компонента в присутствии многих других, а также состава смешанных адсорбционных слоев при проведении серии экспериментов, в которых радиоактивная метка содержится в одном из компонентов смеси. Так МСФ был успешно применен для исследования взаимного влияния и конкурентной адсорбции:

1. смесей неионогенного и ионогенного ПАВ: Бридж-35 и ДСН, Бридж-35 и ДТАБ в системе вода/октан [264], плуроника Р123 и ТТАБ в системе вода/*n*-ксилол [265], тритон Х-100 и ТТАБ, тритон Х-305 и ТТАБ, плуроника Р123 и ТТАБ в системе вода/*n*-ксилол [260];
2. смесей белка и ПАВ: ЧСА и ДТАБ, ЧСА и ДСН в системе вода/*n*-ксилол [259], лизоцима и ДТАБ, лизоцима и ДСН в системе вода/*n*-ксилол [266] и в системе вода/октан [267], лизоцима и кокоамидопропил бетаина (цвиттерионного ПАВ) в системе вода/октан [202], лизоцима и Бридж-35, лизоцима и плуроника Р123 [204,249], лизоцима и плуроников (L121, Р123 и F127) в системе вода/*n*-ксилол [250];
3. смесей гуминовых кислот, выделенных из угля, и белка: ЧСА и лизоцима в системе вода/*n*-ксилол [268].

С помощью МСФ обнаружено, что добавление ионных ПАВ (ДТАБ и ДСН) в молярном соотношении 0,1 и 0,5 к раствору лизоцима приводит к вытеснению лизоцима с поверхности раздела фаз вода/*n*-ксилол в органическую фазу, но даже при 100-кратном избытке ДТАБ не полностью замещает белок в поверхностном слое. Расчеты параметров взаимодействия показывают отталкивание между комплексом лизоцим-ДТАБ и свободными молекулами ДТАБ, и притяжение между комплексом лизоцим-ДСН и свободными молекулами ДСН, что свидетельствует о неполной компенсации заряда в комплексе, в обоих случаях комплексы лизоцим-ПАВ оказываются более гидрофобными по сравнению со свободным белком [266]. В системе вода/октан, несмотря на разные механизмы образования, у комплексов лизоцим-ДСН и лизоцим-ДТАБ приблизительно одинаковые гидрофобность и поверхностная активность при концентрации ПАВ менее

10^{-5} моль/л. При низких концентрациях ПАВ (до 3×10^{-6} моль/л) электростатические взаимодействия между положительно заряженными участками лизоцима и ДСН, отрицательно заряженными аминокислотными остатками белка и ДТАБ приводят к гидрофобизации белка, увеличение концентрации ПАВ запускает гидрофобные взаимодействия, которые приводят к гидрофилизации белка, уменьшению его растворимости в органическом растворителе и вытеснению из поверхностного слоя свободными молекулами ПАВ [267]. Неионогенные ПАВ, высокомолекулярный плуроник Р123 и низкомолекулярный Бридж-35, вытесняют лизоцим с поверхности раздела водный раствор/*n*-ксилон, при этом адсорбция лизоцима не зависит от ионной силы раствора и типа анионов, присутствующих в буферном растворе, что предполагает связывание ПАВ с белком за счет гидрофобных взаимодействий [204].

Комплексное использование меченных тритием соединений в качестве радиоактивного индикатора (МСФ и др.) и тритиевой планиграфии для определения состава и строения смешанных адсорбционных слоев, а также для определения условий образования и состава молекулярных комплексов, в сочетании с данными полученными с помощью других методов и с помощью компьютерного моделирования, получило название метод «тритиевого зонда» [213].

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. МАТЕРИАЛЫ

В работе использовали лизоцим куриного яйца (MP Biomedicals) и лекарственные средства: мирамистин (Инфамед), амикацин (АреxBio), левофлоксацин (Sigma-Aldrich) и даларгин (Эллара). Выбор данных ЛС обусловлен их различной химической структурой, а также разным действием, которое они оказывают на организм. Структурные формулы лекарственных средств приведены на Рис. 4.

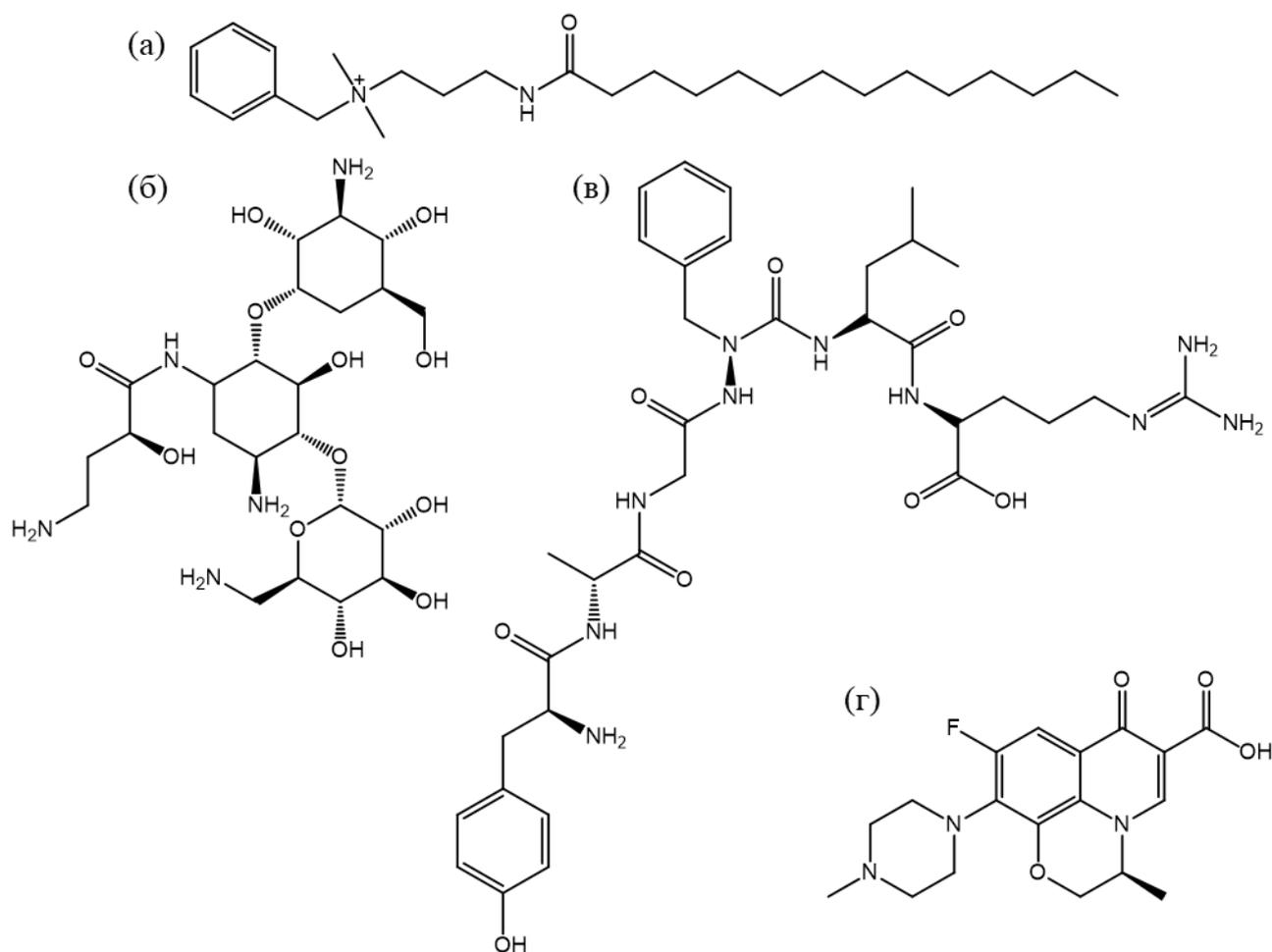


Рис. 4. – Структурные формулы ЛС: (а) мирамистин; (б) амикацин; (в) даларгин и (г) левофлоксацин.

Мирамистин (бензилдиметил[3-(миристоиламино)пропил]аммоний хлорид) относится к классу четвертичных аммониевых соединений, обладает поверхностной активностью и широким спектром антимикробного действия, оказывает бактерицидное, противогрибковое и противовирусное действие. Фармакокинетика мирамистина по

отношению к слизистым оболочкам предполагает взаимодействие с белками слизи, такими как лизоцим.

Амикацин ((S)-0-3-Амино-3-дезоксид-альфа-D-глюкопиранозил-(1-6)-0-[6-амино-6-дезоксид-альфа-D-глюкопиранозил-(1-4)-N1-(4-амино-2-гидрокси-1-оксобутил)-2-дезоксид-D-стрептамин) – бактерицидный антибиотик широкого спектра действия, аминогликозид III группы, активный в отношении большинства грамотрицательных и грамположительных аэробных микроорганизмов. Даже после внутримышечного введения амикацин всасывается быстро и полностью, концентрация в крови может достигать 38 мкг/мл, связывается с белками плазмы крови и хорошо распределяется во внеклеточные жидкости, где тоже возможно взаимодействие с белками.

Левифлоксацин ((-)-(S)-9-Фтор-2,3-дигидро-3-метил-10-(4-метил-1-пиперазинил)-7-оксо-7H-пиридо[1,2,3-de]1,4-бензоксазин-6-карбоновая кислота гемигидрат) – фторхинолоновый антибиотик широкого спектра действия, активный преимущественно в отношении грамотрицательных бактерий, и используется для лечения ряда бактериальных инфекций. При приеме внутрь левифлоксацин быстро и практически полностью всасывается, концентрация в крови может достигать 5,2 мкг/мл, при проведении инфузий концентрация в плазме крови в среднем составляет 6,2 мкг/мл. После инстилляций в глаз левифлоксацин хорошо сохраняется в слезной пленке, через 4 часа его концентрация в ней составляет 17 мкг/мл, часть препарата попадает в кровь, концентрация в плазме крови не более 2,5 нг/мл. Левифлоксацин связывается с белками плазмы, при инстилляциях в глаз может взаимодействовать с белками слезной пленки.

Даларгин (тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинин диацетат) – это синтетический аналог лейцин-энкефалина, пептид, состоящий из остатков 6 аминокислот (гексапептид), агонист дельта-опиоидных рецепторов, применяется для лечения язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. Максимальная разовая доза – 5 мг, суточная – 20 мг. Исследований фармакокинетики препарата не проводилось. Также данное вещество лежит в основе препарата лейтрагин, которое применяется в виде ингаляций (дозировка 10 мг 1 раз в сутки), в составе комплексной терапии новой коронавирусной инфекции (COVID-19) среднетяжелого течения. В системный кровоток поступает менее 10% от введенной дозы, возможно взаимодействие с белками слизистых оболочек полостей рта и носа, а также легких.

В работе использовали фосфатно-солевой буфер (PBS, pH 7,3±0,1) следующего состава: Na₂HPO₄ 8 мМ, K₂HPO₄ 2 мМ, NaCl 146 мМ. В качестве консерванта в буферный раствор добавляли 8 мМ NaN₃. Соли имели классификацию о.с.ч. и х.ч. PBS готовили с использованием физиологического раствора (0,9% NaCl) (SoloPharm). Анионы хлора сильно поглощают УФ-излучение при длинах волн ниже 200 нм [269], поэтому для снятия спектров кругового дихроизма фосфатные буферные растворы готовили на деионизированной воде, очищенной с помощью системы Milli-Q (Millipore). Растворы исследуемых веществ и суспензии клеток для изучения ферментативной активности лизоцима готовили в PBS без добавления азиды натрия, использовали лиофилизированные грамположительные бактериальные клетки *Micrococcus luteus* («Sigma», США).

Дополнительно при проведении очистки и анализа меченых ЛС, в качестве составляющих подвижных фаз (ПФ) и реагентов для десорбции вещества, использовали: аммиак, ацетонитрил, диоксан, метанол, соляную кислоту, трифторуксусную кислоту (ТФУ), хлороформ, этанол, для проявления хроматограмм – нингидрин. Все отечественные реактивы, использованные в работе, имели классификацию ч.д.а. и х.ч.

Измерение радиоактивности растворов меченных тритием веществ проводили с помощью метода жидкостной сцинтилляционной спектрометрии с применением сцинтилляционных жидкостей UltimaGold, OptiPhase Hisafe 3, Ultima-Flo M (Perkin Elmer), ScintiLene BD (FisherBiotech). Также готовили сцинтилляционную жидкость – аналог ЖС-8, добавляя к 1 л диоксана 60 г нафталина, 4 г 2,5-дифенилоксазола и 0,2 г 1,4-бис-2-(5-фенилоксазолил)бензола.

Для проведения экспериментов при помощи МСФ в качестве органической фазы использовали *n*-ксилол с добавлением 8 г/л 2,5-дифенилоксазола. При анализе распределения трития в белке для проведения тотального гидролиза белка использовали смесь соляной и трифторуксусной кислот 2:1 (v/v), с добавлением 0,001% β-меркаптоэтанола, для проведения ферментативного гидролиза – фермент трипсин.

2.2. ВВЕДЕНИЕ ТРИТИЕВОЙ МЕТКИ В ЛИЗОЦИМ И ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА И ИХ ОЧИСТКА

С помощью метода термической активации трития на вольфрамовой проволоке по описанной в литературе методике [197] проводили получение меченных тритием лизоцима и ЛС, которое включало следующие этапы: подготовку мишени; проведение реакции по включению трития в вещество; сбор продукта, очистка и анализ полученного меченого вещества. Подготовка мишени заключалась в приготовлении раствора вещества, который затем равномерно распределяли по стенкам стеклянного реактора, с последующей лиофилизацией для водных растворов лизоцима, мирамистина, амикацина и левофлоксацина или сушкой в токе газа метанольного раствора даларгина. Приготовленный реакционный сосуд с мишенью подсоединяли к установке для работы с газообразным тритием, при помощи вакуумной системы откачивали воздух до остаточного давления 0,01 Па, наполняли газообразным тритием. В работе использовали тритий (ПО «Маяк», Россия) и его смеси с протием. Для предотвращения термического разложения веществ температуру стенок реакционного сосуда с мишенью поддерживали 77 К с помощью их охлаждения жидким азотом. Использовали также режим, когда охлаждали жидким азотом только дно реактора, а температура стенок составляла около 295 К. Для активации реакции при помощи электрического тока в течение 10 с нагревали вольфрамовую проволоку (атомизатор), расположенную в центре реакционного сосуда. После проведения реакции откачивали остаточную газовую смесь, отсоединяли реактор и смывали вещество со стенок водой или метанолом (даларгин). Условия введения трития в исследуемые вещества и их удельная радиоактивность приведены в Таблице 2.

Лизоцим смывали со стенок реакционного сосуда PBS. Для удаления трития из лабильных положений лизоцима использовали диализ против фосфатного буфера (0,018 М, рН 7,3±0,1) в течение 7 суток через мембраны MWCO 12 кДа. Внешний раствор периодически заменяли свежим буфером. Меченые ЛС (мирамистин, амикацин, левофлоксацин, даларгин) неоднократно растворяли в воде, упаривали растворы с помощью роторного испарителя для удаления лабильного трития, находящегося в функциональных группах, до достижения постоянного значения радиоактивности. С момента сбора меченого продукта на каждой стадии очистки вещества отбирали аликвоту раствора, смешивали с жидким сцинтиллятором Ultima Gold (PerkinElmer) и измеряли

радиоактивность на жидкостном сцинтилляционном спектрометре RackBeta 1215 (LKB Wallac, Финляндия).

Таблица 2 – Условия введения трития в исследуемые молекулы

Параметр	Вещество					
	Лизоцим	Мирамистин	Амикацин ¹	Левифлоксацин	Даларгин ²	
Масса мишени, мг	0,60	0,60	0,22	0,55	0,15	0,15
Температура атомизатора, К	1850	1800	1850	1850	1850	1850
Температура мишени, К	77	77	77	77	77	295
Давление, Па	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1,5
Удельная радиоактивность ³ , Ки/г	0,24	3,8	2,1	6,0	5,4	5,1
Удельная радиоактивность ⁴ , ТБк/моль	194	155	92	123	462	434

¹сульфат амикацина

²даларгина диацетат

³реальная величина

⁴пересчет на 100% тритий с учетом его содержания в используемой смеси водорода и трития.

Дальнейшую очистку лизоцима от побочных продуктов проводили с использованием эксклюзионной ВЭЖХ (колонка – Superdex200 Increase 10/300 GL, GE Helthcare или Ultrahydrogel Column, 1000 Å; ПФ – PBS, 0,16 М, pH 7,3±0,1). Анализ проводили с определением УФ-поглощения при длине волны 280 нм (время удерживания – 30 мин).

Анализ мирамистина проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в системе с ПФ метанол – хлороформ – аммиак 4:1:0,15 (коэффициент подвижности – 0,1) или хлороформ – этанол – аммиак 11:21:6 (коэффициент подвижности – 0,4), положение мирамистина на пластинке ТСХ определяли под УФ (256 нм). Очистку проводили при помощи ВЭЖХ (колонка – Eclipse XDB-C8; размер колонки – 0,46×15 см; ПФ – линейный градиент 1% ТФУ – ацетонитрил; скорость потока ПФ: 1,5 мл/мин), мирамистин

регистрировали по УФ-поглощению при длине волны 260 нм (время удерживания – 2,4 мин).

Анализ амикацина и очистку от радиоактивных примесей проводили с применением ТСХ (пластинки – TLC Plates, Silica Gel on Aluminium, 20 X (Sigma-Aldrich), ПФ – диоксан – аммиак – вода (1:1:3)). Используя нерадиоактивный стандарт и нингидриновый реагент определяли положение меченого амикацина, который десорбировали раствором 0,5 М соляной кислоты. Дополнительно проводили очистку от примесей экстракцией ксилолом.

Меченый левофлоксацин после удаления лабильной метки анализировали с помощью тонкослойной хроматографии и ВЭЖХ. ТСХ анализ проводили на пластинках TLC Plates, Silica Gel on Aluminium, 20 X (Aldrich) в системе хлороформ-метанол-аммиак конц. (10:12:5) (коэффициент подвижности – 0,53). Положение левофлоксацина на пластинке определяли с помощью УФ-лампы.

Для очистки [³H]левофлоксацина использовали препаративную ТСХ. Зону на пластинке определяли под УФ-лампой, вещество с сорбента элюировали водой и метанолом.

Также проводили ВЭЖХ меченого препарата с помощью хроматографической системы Waters (Breeze) на колонке Waters Nova-Pak C18 (3,9×300 мм, размер гранул 4 мкм). Использовали градиентный режим элюирования 0,1%-ым водным раствором трифторуксусной кислоты и 0,1%-ым раствором трифторуксусной кислоты в ацетонитриле, скорость элюирования 0.5 мл/мин, левофлоксацин регистрировали по УФ-поглощению при 284 нм.

Выделение меченого тритием даларгина проводили обращено-фазовой ВЭЖХ (колонка: Waters Nova-Pak C18; размер колонки – 3,9×300 мм; размер гранул – 4 мкм; ПФ – градиент 0,1%-ый водный раствор ТФУ и 0,1%-ый раствор ТФУ в ацетонитриле; скорость потока ПФ: 1 мл/мин), регистрировали даларгин по УФ-поглощению при длинах волн 215 нм и 280 нм (время удерживания – 34 мин).

Радиоактивность при проведении ВЭЖХ всех меченных тритием веществ контролировали, собирая фракции элюента и измеряя активность аликвот, собранных фракций, с помощью жидкостной сцинтилляционной спектрометрии. Идентичность меченого и исходного препаратов, а также равномерность распределения трития по компонентам, определяли по совпадению хроматографических профилей УФ-

поглощения и радиоактивности. При анализе препаратов методом ТСХ распределение радиоактивности контролировали следующим образом: пластинку с меченым веществом после ТСХ высушивали, смачивали сцинтилляционной жидкостью ScintiLene BD (FisherBiotech, Германия), заклеивали прозрачной липкой лентой и определяли распределение трития по пластинке с помощью сканера радиоактивности БетаХром или разрезали пластинку на части и измеряли радиоактивность каждой части на жидкостном сцинтилляционном спектрометре RackBeta 1215. По результатам измерения строили профиль распределения радиоактивности вдоль пластинки, который соотносили с положением стандарта на хроматограмме, определенным при помощи УФ для мирамистина или нингидринового реагента для амикацина.

Меченные тритием соединения использовали для определения концентрирования веществ на межфазной границе и определения их концентрации в объеме контактирующих фаз при помощи МСФ.

2.3. МЕТОД СЦИНТИЛЛИРУЮЩЕЙ ФАЗЫ

Метод сцинтиллирующей фазы основан на регистрации β -излучения трития в органической фазе и на межфазной границе. С помощью МСФ можно определить коэффициент распределения вещества между фазами и адсорбцию на межфазной границе. В работе использовали МСФ для определения взаимного влияния лизоцима и ЛС при конкурентной адсорбции на межфазной границе водный раствор – *n*-ксилол. При проведении исследования МСФ тритиевая метка содержалась в одном из компонентов смеси. Проводилось 2 серии экспериментов, в первой использовался меченный тритием лизоцим, а ЛС не содержало тритиевую метку, во второй, наоборот, тритиевая метка была включена в ЛС. Данный подход позволил выявить поведение каждого компонента смеси.

Исследуемые растворы готовили в PBS, концентрация лизоцима оставалась постоянной и была равна $7,0 \times 10^{-7}$ М (0,01 г/л), дополнительно проводили эксперименты с концентрациями лизоцима $7,0 \times 10^{-6}$ М (0,1 г/л) и $3,5 \times 10^{-5}$ М (0,5 г/л), а концентрации ЛС изменяли: мирамистин от $2,5 \times 10^{-8}$ М до $1,1 \times 10^{-4}$ М ($1,1 \times 10^{-5}$ г/л – $5,0 \times 10^{-2}$ г/л), амикацин от $1,7 \times 10^{-3}$ М до $1,4 \times 10^{-1}$ М (1 г/л – 80 г/л), левофлоксацин от 1×10^{-6} М до 1×10^{-3} М ($3,6 \times 10^{-4}$ г/л – $3,6 \times 10^{-1}$ г/л) и даларгин от $1,4 \times 10^{-6}$ М до $7,0 \times 10^{-4}$ М (0,001 г/л – 0,5 г/л). При приготовлении растворов водной фазы для уменьшения удельной активности меченых

веществ к растворам меченых соединений добавляли немеченые вещества, для исследования влияния на поведение в двухфазной системе добавляли второй компонент.

В сцинтилляционный полиэтиленовый флакон объемом 7 мл вносили 1 мл исследуемого водного раствора (V_w , мл), к которому аккуратно, чтобы избежать перемешивания слоев, добавляли 3 мл органической фазы (V_{org} , мл), обладающей сцинтилляционными свойствами (раствор 2,5-дифенилоксазола в *n*-ксилоле концентрации 8 г/л). Для достижения равновесного распределения компонентов между водной и органической фазой и межфазной границей систему выдерживали в течение 48 часов при температуре 25 °С. Ранее было показано, что за это время в системе достигается равновесие [262].

Через 48 часов проводили измерение скорости счета на жидкостном сцинтилляционном спектрометре Rack Beta 1215:

1. двухфазной системы (I , имп/мин);
2. отобранной аликвоты органической фазы (I_{al} , имп/мин), как правило 1 мл (V_{al});
3. оставшейся (после отбора) системы (I_{res} , мл).

К остатку добавляли еще 1 мл сцинтиллятора, выдерживали систему в течение 48 часов при температуре 25 °С, опять проводили измерение скорости счета всей системы и аликвоты органической фазы. Скорость счета двухфазной системы складывается из активности трития в объеме органической фазы (I_v) и в поверхностном (адсорбционном) слое (I_s).

Концентрацию меченого тритием вещества в объеме органической фазы (C_{org}) рассчитывали по уравнению:

$$C_{org} = \frac{I_{al}}{\varepsilon V_{al} a_{sa}} \quad (2.1)$$

где a_{sa} – удельная радиоактивность меченого тритием вещества (Бк/мл), ε – эффективность регистрации бета-излучения трития, определяли из характеристик спектра при помощи кривой гашения, которая была получена в независимых экспериментах.

Концентрацию меченого вещества в водной фазе (C_w) определяли по разности между его содержанием в исходном водном растворе и его содержанием в органической фазе по уравнению:

$$C_w = \frac{C V_w - C_{org} V_{org}}{V_w} \quad (2.2)$$

где C – начальная концентрация меченого вещества в приготовленном растворе водной фазы.

Коэффициент распределения меченого тритием лизоцима в системе водный раствор/ксилол (D) рассчитывали, используя полученные значения концентраций вещества в водной (C_w) и органической (C_{org}) фазах, по уравнению:

$$D = \frac{C_{org}}{C_w} \quad (2.3)$$

Для ЛС коэффициент распределения в системе двух несмешивающихся жидкостей (D) определяли по тангенсу угла наклона прямой зависимости концентрации мирамистина в органической фазе от его концентрации в водной фазе.

Значение адсорбции (Γ) рассчитывали двумя способами: по активности аликвоты органической фазы и по активности оставшейся (после отбора) системы, по уравнению:

$$\Gamma = \frac{I - \frac{I_{al} V_{org}}{V_{al}}}{\frac{1}{2} \varepsilon a_{sa} S} = \frac{I_{res} - \frac{I_{al} V_{res}}{V_{al}}}{\frac{1}{2} \varepsilon a_{sa} S} = \frac{I_s}{\frac{1}{2} \varepsilon a_{sa} S} \quad (2.4)$$

где $V_{res} = V_{org} - V_{al}$ – объем органической фазы после отбора аликвоты, S – площадь границы раздела фаз, которая равна $2,6 \times 10^{-4} \text{ м}^2$; коэффициент $\frac{1}{2}$ учитывает уменьшение эффективности регистрации трития из поверхностного слоя в 2 раза.

2.4. АМИНОКИСЛОТНЫЙ И ПЕПТИДНЫЙ АНАЛИЗ

Влияние исследуемых ЛС оказываемое на конформацию лизоцима при их взаимодействии исследовали с помощью атомарного трития, при этом проводили два типа экспериментов – для исследования влияния в адсорбционном слое и в объеме водной фазы. Растворы готовили в PBS и выдерживали при 25°C в течение суток. Концентрация лизоцима во всех экспериментах составляла $0,5 \text{ мг/мл}$ ($3,5 \times 10^{-5} \text{ моль/л}$), концентрация всех исследуемых ЛС – $3,5 \times 10^{-5} \text{ моль/л}$, что соответствует молярному соотношению белок-лиганд 1:1.

Для формирования равновесного адсорбционного слоя лизоцима и смесей лизоцима с ЛС приготовленные растворы равномерно распределяли на стенках реакционного сосуда, сосуд закрывали пробкой для исключения испарения раствора и выдерживали в течение 30 минут. Время выдерживания выбрали на основании ранее

проведенных экспериментов для смесей лизоцима с ПАВ [248,249], а также из результатов изменения поверхностного натяжения для смесей лизоцима с исследованными ЛС. После выдерживания раствор на стенках быстро замораживали с помощью жидкого азота.

Далее сосуд подсоединяли к установке для работы с газообразным тритием, стенки охлаждали жидким азотом и удаляли воздух до остаточного давления 0,01 Па. Наполняли систему смесью трития и водорода (давление 0,5 Па) и инициировали реакцию с атомами трития нагреванием вольфрамовой проволоки до 1950 К в течение 10 с. После чего остаточный газ откачивали, наполняли сосуд новой порцией трития и снова проводили атомизацию. Эту процедуру повторяли 3 раза. Суммарное время обработки атомами трития составило 30 с. После этого сосуд отсоединяли от установки и раствор смывали со стенок добавлением 1 мл воды. После удаления раствора из сосуда повторно промывали стенки еще одной порцией воды. Всего обрабатывали атомарным тритием по три мишени каждой смеси лизоцима и ЛС, а также проводили аналогичный эксперимент с раствором лизоцима без добавки ЛС.

Для исследования изменения конформации лизоцима в объеме водной фазы выдержанные в течение 24 часов растворы равномерно наносили на стенки реакционного сосуда и сразу же замораживали жидким азотом. После чего воду удаляли с помощью лиофильной сушки. Далее эксперимент по обработке атомами трития проводили аналогично описанному выше для замороженных растворов с единственным отличием – использовали только один напуск трития и время обработки атомами трития безводной мишени составило 10 с. Смывали вещество со стенок 2 мл воды, а затем промывали стенки еще одной порцией воды. Использовали по 3 мишени для каждой смеси лизоцима и ЛС, а также обрабатывали атомами трития лизоцим без добавок ЛС.

После проведения реакции с атомарным тритием проводили очистку меченых соединений от лабильного трития и радиоактивных побочных продуктов, которая состояла из следующих этапов: сбор продукта, лиофилизация и последующее растворение, очистка белка с помощью равновесного диализа против PBS через мембраны с размером пор 12 кДа и мембранной фильтрации (10 кДа).

Часть полученного препарата подвергали тотальному гидролизу с применением смеси 37% соляной и концентрированной трифторуксусной кислот в объемном отношении 2:1, с содержанием 0,001% β-меркаптоэтанола [270]. Гидролиз проводили в

запаянных стеклянных ампулах при 155 °С в течение часа. Ампулы вскрывали, подвергали лиофильной сушке, далее неоднократно растворяли в воде и вновь упаривали, после последнего упаривания препарат растворяли в 0,1 М растворе соляной кислоты. Анализ аминокислот проводили на аминокислотном анализаторе Amino Acid Analyzer Hitachi L-8800 (Hitachi, Япония), количество вещества контролировалось с помощью нингидриновой реакции, для определения радиоактивности собирали фракции элюента, активность собранных фракций измеряли на жидкостном сцинтилляционном спектрометре Rack Beta 1215.

Другую часть полученного меченого препарата подвергали ферментативному гидролизу с помощью трипсина, который расщепляет пептидные связи после остатков аргинина и лизина. К препарату добавляли раствор трипсина в соотношении масс фермент:субстрат 1:100, гидролиз проводили при 37 °С в течение 1 часа, затем добавляли раствор трипсина до соотношения фермент:субстрат 1:50 (по массе) и проводили гидролиз еще 1 час при 37 °С. Полученные пептиды разделяли с помощью ВЭЖХ с анализом их радиоактивности.

2.5. МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

2.5.1. Флуоресцентная спектроскопия

Интенсивность флуоресценции лизоцима измеряли на спектрофлуориметре FluoroMax-3 (Horiba Jobin Yvon, Франция) в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 см. Измерения проводили на длине волны возбуждающего света 280 нм. Эмиссионные спектры фиксировали в диапазоне 290 – 400 нм. Время измерения одной точки – 0,5 с. Ширина щелей возбуждения и испускания была установлена 5,0 нм. Для коррекции фона флуоресценции из измеренных спектров вычитали спектр буферного раствора. Для сопоставления спектров флуоресценции исходного лизоцима и лизоцима в присутствии ЛС рассчитывали величины относительной флуоресценции. Данные были использованы при расчёте констант ассоциации комплексов лизоцим-ЛС по уравнениям (1.2) – (1.5), описанным в литературном обзоре. Концентрация лизоцима была постоянна и составляла 0,01 г/л ($7,0 \times 10^{-7}$ М), концентрацию ЛС варьировали: мирамистина от $2,5 \times 10^{-8}$ М до $2,0 \times 10^{-4}$ М ($1,1 \times 10^{-5}$ г/л – $9,1 \cdot 10^{-2}$ г/л); амикацина от $1,7 \times 10^{-3}$ М до $1,7 \times 10^{-$

1 M ($1 \text{ г/л} - 100 \text{ г/л}$), левофлоксацина от $2 \times 10^{-6} \text{ M}$ до $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ ($7,2 \times 10^{-4} \text{ г/л} - 3,6 \times 10^{-3} \text{ г/л}$), даларгина от $1,4 \times 10^{-6} \text{ M}$ до $7,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ($0,001 \text{ г/л} - 0,5 \text{ г/л}$). Дополнительно для мирамистина провели серию экспериментов, в которых концентрация лизоцима составляла $0,1 \text{ г/л}$, концентрацию мирамистина изменяли от $2,5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ до $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. А для даларгина провели серию экспериментов, в которых концентрация даларгина составляла $0,02 \text{ г/л}$ ($2,8 \times 10^{-5} \text{ M}$), а концентрацию лизоцима варьировали от $0,005 \text{ г/л}$ до $0,1 \text{ г/л}$ ($2,5 \times 10^{-7} \text{ M} - 7,0 \times 10^{-6} \text{ M}$).

2.5.2. Спектроскопия кругового дихроизма

Спектры кругового дихроизма измеряли в области $190\text{-}260 \text{ нм}$ на КД-спектрометре Chirascan (Applied Photophysics, Англия) в кварцевых кюветах с длиной оптического пути $0,1 \text{ мм}$ при температуре $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Концентрация лизоцима составляла 1 г/л (70 мкМ), концентрация ЛС соответствовала соотношению белок-лиганд $1:1$ и $1:10$, то есть 70 мкМ и 700 мкМ , соответственно.

2.6. ТЕНЗИОМЕТРИЯ (МЕТОД ВИСЯЩЕЙ КАПЛИ)

Измерение поверхностного натяжения проводили при помощи системы измерения оптического контактного угла и контурного анализа «Contact Angle System OCA15» (Dataphysics, Германия), используя метод висящей капли. Формировали каплю водного раствора $8 - 10 \text{ мкл}$ для границы раздела с воздухом и $5 - 7 \text{ мкл}$ для границы с ксилолом, далее каплю фотографировали в течение 60 минут (около 2000 измерений) и определяли значение поверхностного натяжения по уравнению Юнга-Лапласа с помощью программного пакета DataPhysics. При расчете поверхностного натяжения использовали следующие значения плотности для PBS $1,0059 \pm 0,0001 \text{ г/см}^3$ и для растворов лизоцима в PBS и его смесей с ЛС – $1,0061 \pm 0,0001 \text{ г/см}^3$, которые были измерены с помощью «Density/Specific Gravity Meter DA-640».

2.7. ТУРБИДИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД (ИЗМЕРЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ)

Ферментативную активность лизоцима в присутствии и отсутствии лекарственных средств определяли по отношению к грамм-положительным бактериальным клеткам *Micrococcus luteus* (Sigma, США) с использованием турбидиметрического метода. Данный метод заключается в измерении скорости уменьшения оптической плотности суспензии клеток после добавления лизоцима, которая пропорциональна уменьшению количества клеток в реакционной смеси, и является характеристикой активности фермента [271,272].

Измерения проводили на спектрофотометре Hitachi Spectrophotometer U-5100 при температуре 298 К, использовали пластиковые кюветы с длиной оптического пути 1 см. Готовили суспензию лиофилизированных клеток *Micrococcus luteus* в PBS 4,9±0,2 мг/мл и использовали в течение двух часов после ее приготовления. В кювету вносили 950 мкл буфера и 30 мкл приготовленной суспензии клеток и в течение 5 мин измеряли оптическую плотность при длине волны 650 нм для определения фонового осаждения клеток. Концентрацию суспензии клеток подбирали так, чтобы оптическая плотность суспензии (OD) при длине волны 650 нм была около 0,5. Через 5 минут к суспензии клеток добавляли 20 мкл раствора индивидуального вещества или смеси лизоцим – ЛС определенной концентрации, смесь перемешивали, и продолжали проводить измерение оптической плотности, фиксировали изменение оптической плотности суспензии в результате лизиса клеток.

Для оценки ферментативной активности A_E использовали изменение оптической плотности в течение первых 20 секунд после добавления к суспензии клеток раствора лизоцима или смеси лизоцим – ЛС:

$$A_E = \lim_{t \rightarrow 0} \left(- \frac{dOD}{dt} \right) \quad (2.5)$$

Во всех исследуемых растворах концентрация лизоцима оставалась постоянной и была равна 0,01 г/л, а концентрации лекарственных средств изменяли. Концентрацию мирамистина изменяли от $2,5 \times 10^{-8}$ до 1×10^{-5} М, амикацина от $1,7 \times 10^{-3}$ до $9,4 \times 10^{-2}$ М, левофлоксацина от 1×10^{-6} до 1×10^{-3} М и даларгина от $7,0 \times 10^{-5}$ до $1,4 \times 10^{-3}$ М.

Для определения влияния ЛС на ферментативную активность лизоцима рассчитывали относительную ферментативную активность лизоцима (Ω), которая

представляла отношение активности лизоцима в присутствии препаратов к активности чистого лизоцима:

$$\Omega = \frac{dA_{650}(\text{лизоцим+ЛС})/dt}{dA_{650}(\text{лизоцим})/dt} \quad (2.6)$$

2.8. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ

Для оценки структуры комплекса, образующегося при взаимодействии лизоцима с ЛС, выполнили молекулярное моделирование с использованием следующих программ:

- Nex 8.0.0. позволяет определить центр связи, соответствующий минимальной полной энергии системы;
- Autodock 4 позволяет определить энергию связывания белок-лиганд в заданных координатах;
- Chimera 1.3.1. позволяет визуализировать комплексы;
- Discovery Studio 2021 Client позволяет визуализировать результаты, полученные при помощи Autodock 4, и строить двумерные картинки.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. ПОЛУЧЕНИЕ МЕЧЕННЫХ ТРИТИЕМ ЛИЗОЦИМА, МИРАМИСТИНА, АМИКАЦИНА, ЛЕВОФЛОКСАЦИНА И ДАЛАРГИНА

Для исследования взаимного влияния лизоцима и ЛС при конкурентной адсорбции на межфазной границе водный раствор-ксилол и распределении в объеме системы несмешивающихся жидкостей с помощью метода термической активации трития были получены меченные тритием лизоцим, мирамистин, амикацин, левофлоксацин и даларгин. Для очистки препаратов использовали различные варианты хроматографии, а для лизоцима – также и диализ. Методики получения меченых веществ и их очистки описаны в разделе 2.2.

В работе уделили особое внимание радиохимической чистоте полученных препаратов, так как присутствие радиоактивных примесей может сильно повлиять на результат. Далее приводится анализ результатов очистки меченых препаратов.

Лизоцим

Для очистки лизоцима использовали два типа колонок. Хроматографические профили, полученные при анализе и очистке на разных колонках меченого лизоцима, приведены на Рис. 5.

С помощью колонки Ultrahydrogel 1000Å удалось разделить мономерную и димерную фракции белка, в то время как с колонки Superdex200 лизоцим элюировался одним пиком [273]. Отметим, что из-за высоких значений поверхностной концентрации белка на границе раздела фаз жидкость-жидкость наличие в меченном тритием препарате меченого димера не влияет на результат, полученный с помощью метода сцинтиллирующей фазы по адсорбции лизоцима, однако коэффициенты распределения между водной и органической фазами для димера и мономера будут различными [274].

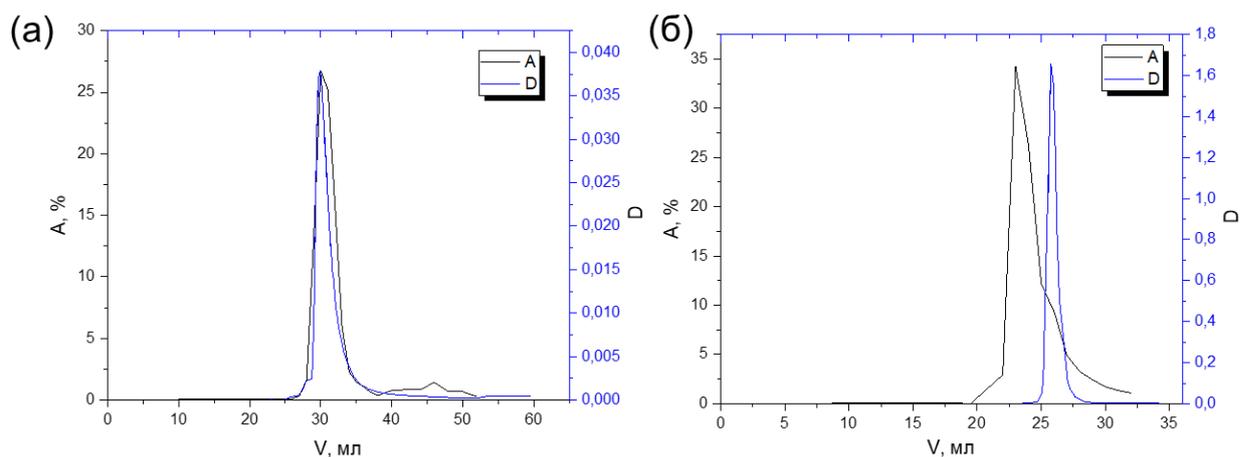


Рис. 5. – Профили радиоактивности элюата при проведении эксклюзионной хроматографии лизоцима (черная линия) и УФ-поглощение при 280 нм (синяя линия) (а) колонка Superdex200 Increase 10/300 GL (GE Helthcare) (б) колонка Ultrahydrogel Column, 1000Å.

Было найдено, что после диализной очистки и с последующей хроматографической очисткой на колонке Superdex200 коэффициент распределения лизоцима между водной фазой и *n*-ксилолом составляет в среднем 10^{-2} , что характерно для преобладания мономерной фракции лизоцима, и что в 10 раз выше, чем коэффициент распределения приведенный ранее [266], когда хроматографическую очистку проводили на колонке Fractogel TSK Gel HW-40. В работе для проведения экспериментов методом сцинтиллирующей фазы использовали мономерную фракцию лизоцима. Удельная радиоактивность выделенного препарата составила 0,24 Ки/г (8,8 ГБк/г).

Мирамистин

Ранее были найдены условия введения трития в мирамистин с помощью метода термической активации, когда образуется мало побочных продуктов, однако его очистка затруднена тем, что мирамистин обладает высокой поверхностной активностью и хорошо связывается с хроматографическими сорбентами [275]. Поэтому тонкослойная хроматография использовалась только для определения радиохимического выхода меченого продукта и контроля чистоты очищенного соединения. Использование обращенно-фазной ВЭЖХ на колонке Eclipse XDB-C8 позволило эффективно отделить [^3H]мирамистин от радиоактивных примесей с минимизацией его потерь. Профили радиоактивности элюата при проведении ВЭЖХ очистки меченого тритием мирамистина приведены на Рис. 6а, соответственно. Фракции препарата объединили и упарили досуха, концентрацию определили с помощью УФ спектрометрии.

Дополнительно провели анализ чистоты меченого мирамистина с помощью ТСХ (Рис. 6б). Удельная радиоактивность очищенного [^3H]мирамистина составила 3,8 Ки/г (141 ГБк/г).

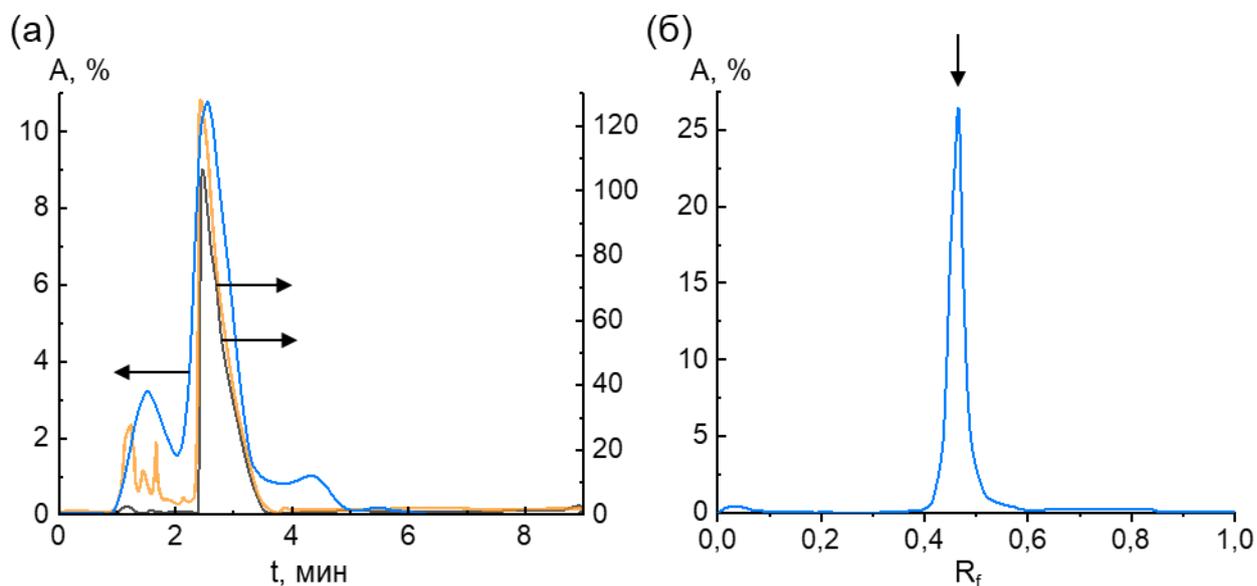


Рис. 6. – Профиль радиоактивности элюата при проведении хроматографии мирамистина (синяя линия) и УФ-поглощение при 280 нм (оранжевая линия – меченный тритием мирамистин, серая линия – стандарт мирамистина 1 мг/мл) (а). Профиль ТСХ меченого тритием мирамистина (система: хлороформ:этанол:аммиак 11:21:6) (б). Стрелкой показано положение мирамистина.

Амикацин

Методики получения [^3H]амикацина с помощью метода термической активации трития и очистки с помощью ТСХ были разработаны ранее и успешно применены для исследования адсорбции амикацина на различных типах наноалмазов детонационного синтеза [201,276,277]. Однако анализа влияния условий реакции с атомарным тритием на удельную радиоактивность амикацина проведено не было. Поэтому в рамках данной работы проведено исследование влияния температуры вольфрамового атомизатора на выход меченого тритием амикацина (Рис. 7). Показано, что с ростом температуры происходит рост радиоактивности меченого амикацина.

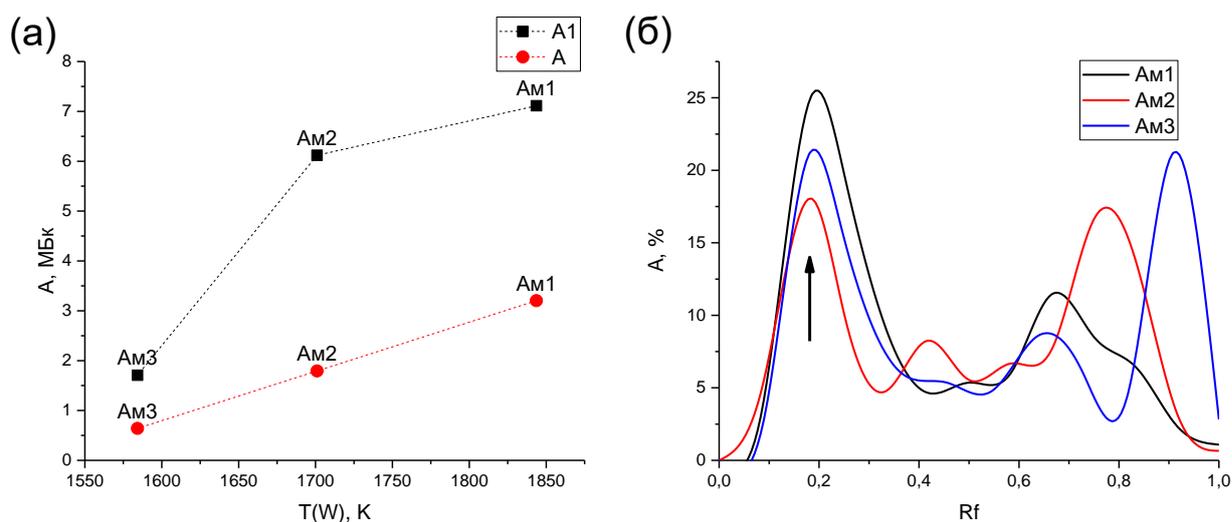


Рис. 7. – (а) Зависимость радиоактивности амикацина после удаления лабильной метки (А1) и амикацина по анализу ТСХ (А) от температуры атомизатора. (б) Профили радиоактивности ТСХ амикацина, меченого при разных температурах атомизатора.

Для выделения амикацина использовали метод ТСХ: при проведении эксперимента фракции зону сорбента с амикацином счищали, вещество смывали 0,5 М соляной кислотой.

После выделения амикацина проводили контроль его чистоты методом ТСХ согласно фармакопейной методике 01/2010:1289 [278]. Профиль радиоактивности приведен на Рис. 8.

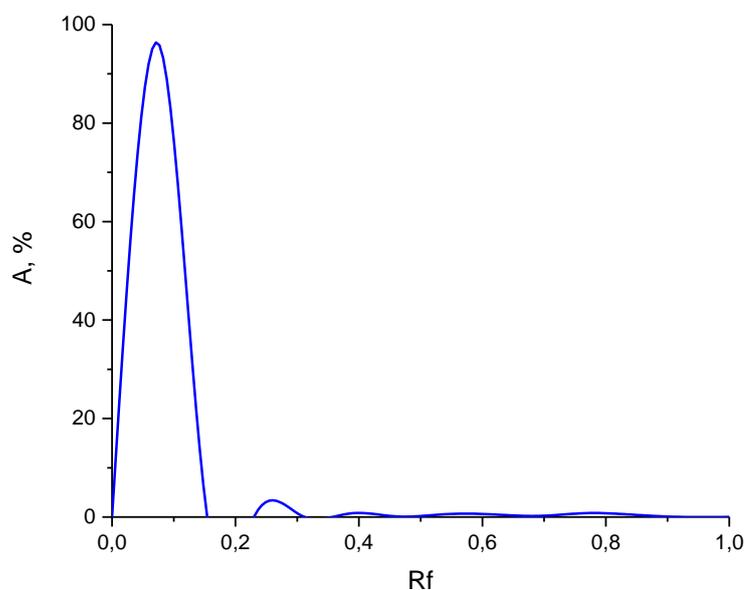


Рис. 8. – Профиль радиоактивности ТСХ амикацина после очистки в системе метанол-аммиак-хлороформ 1-1-1 (нижняя фаза).

Однако в экспериментах по методу сцинтилирующей фазы было выявлено, что несмотря на высокую радиохимическую чистоту (>98%) очищенного препарата коэффициент распределения [³H]амикацина уменьшался при замене органической фазы. Такой результат означал, что в препарате присутствует радиоактивная примесь, которая переходила в органическую фазу много лучше, чем амикацин. Поэтому проводили дополнительную очистку экстракцией в ксилол из водного раствора до тех пор, пока коэффициент распределения не достигал постоянного значения. На Рис. 9 показана зависимость коэффициента распределения от количества экстракций.

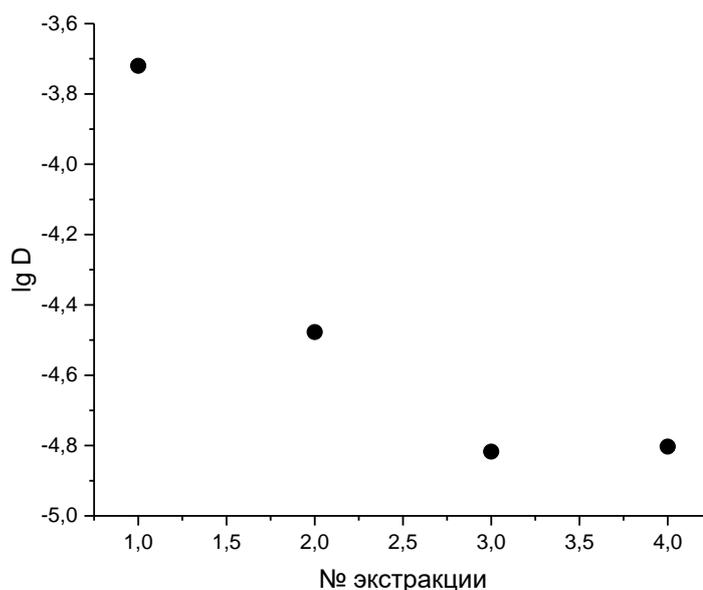


Рис. 9. – Изменение коэффициента распределения меченого амикацина между ксилолом и водой при экстракционной очистке амикацина.

Для достижения постоянного значения коэффициента распределения достаточно двух процедур экстракции. Доля радиоактивной примеси, извлеченной экстракцией, составила 0,3%. Удельная радиоактивность очищенного [³H] амикацина составила 2,1 Ки/г (76 ГБк/г).

Левифлоксацин

Методики получения, меченого тритием левифлоксацина не было описано в литературе. Были проведены несколько предварительных экспериментов по оптимизации условий реакции (температуру вольфрамовой проволоки меняли от 1720 до 1950 К). На Рис. 10 показаны зависимости радиоактивности левифлоксацина после удаления лабильной метки от температуры атомизатора, а также ТСХ и ВЭЖХ профили препаратов, полученных при разных условиях.

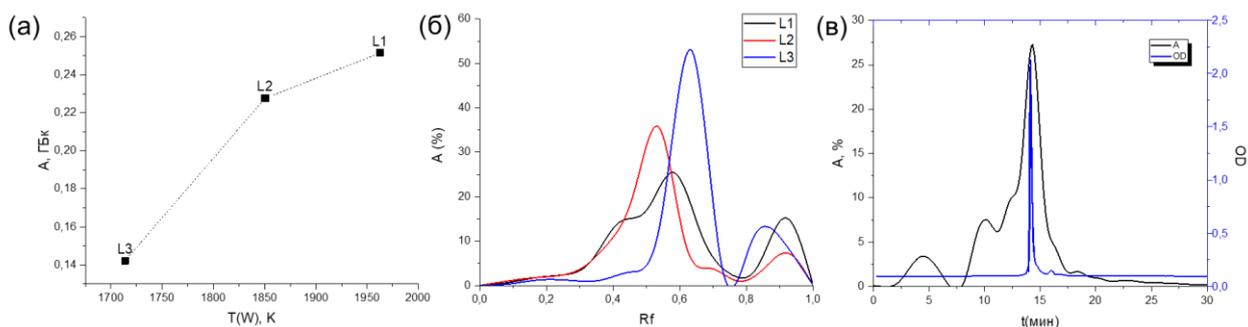


Рис. 10. – Влияние температуры на выход меченного тритием левофлоксацина. (а) Зависимость радиоактивности левофлоксацина после удаления лабильной метки от температуры вольфрамовой проволоки; (б) ТСХ профили препаратов левофлоксацина, меченных тритием при разных температурах атомизатора (система: диоксан – аммиак – вода 1:1:3); (в) типичный ВЭЖХ профиль, на примере препарата L3, меченного тритием левофлоксацина после удаления лабильной метки.

Для очистки меченого препарата разработали методики ТСХ и ВЭЖХ анализа. На Рис. 10б, показано распределение радиоактивности на пластинке при ТСХ анализе меченого левофлоксацина. Основной пик по радиоактивности совпадает с положением левофлоксацина (R_f 0,53). Показано, что с ростом температуры атомизатора увеличивается общая радиоактивность меченого продукта, а также доля побочных продуктов: на ТСХ увеличивается вклад пика на фронте. Для препаратов L2 и L1 появляется радиоактивный продукт с меньшим R_f чем у основного продукта. Оказалось, что доля радиоактивности в пике, соответствующего левофлоксацину, увеличивалась от 42% до 53% с уменьшением температуры атомизатора. В результате максимальная радиоактивность оказалась у препарата L2 при этом у препарата L3 оказалась минимальная доля побочных продуктов. ВЭЖХ профиль препарата L3 приведен на Рис. 10в. Регистрировали УФ-поглощение при 284 нм, фракции после анализа собирали и измеряли их радиоактивность. Основной пик по радиоактивности соответствовал времени выхода левофлоксацина. Фракции с левофлоксацином объединили и упарили досуха. Однако, даже после очистки ВЭЖХ в экспериментах, поставленных по методике сцинтиллирующей фазы, препарат меченного тритием левофлоксацина показал изменение коэффициента распределения между водной и органической фазами с увеличением числа экстракций. Такого явления не наблюдалось ранее в экспериментах с поверхностно-активными веществами, в том числе с мирамистином. Поэтому провели дополнительную очистку экстракцией в толуол для удаления радиоактивных

гидрофобных примесей. Изменение коэффициента распределения препарата, меченного тритием левофлоксацина от числа экстракций показано на Рис. 11.

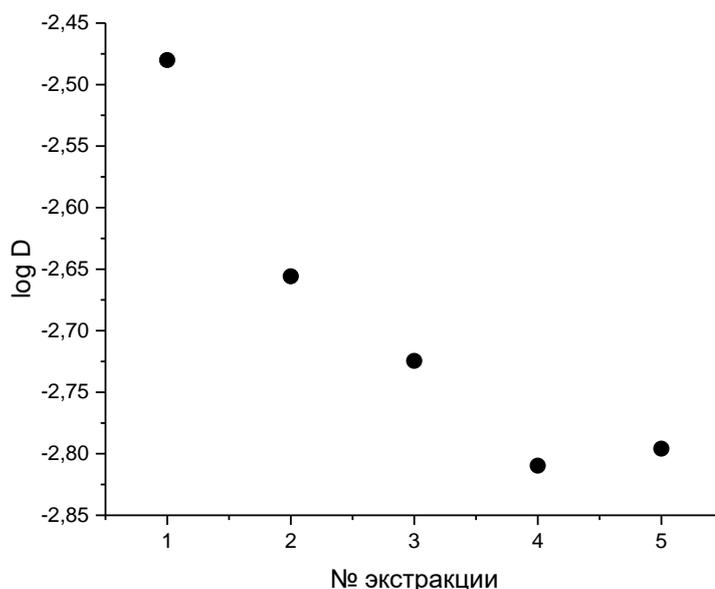


Рис. 11. – Зависимость коэффициента распределение левофлоксацина между водой и толуолом от числа экстракций.

Коэффициент распределения между толуолом и водой в результате четырех экстракций снижался до 0,015 и далее не менялся.

Для проведения экспериментов по методу СФ использовали препарат, очищенный с помощью ВЭЖХ с последующей дополнительной экстракционной очисткой. Его удельная радиоактивность составила 6,0 Ки/г (222 ГБк/г).

Даларгин

Олигопептид даларгин получали по описанной ранее методике [279] получения даларгина на поверхности стекла и проводили выделение с помощью обращено-фазной хроматографии. Применили два варианта введения трития: с температурой мишени 77 и 295 К. ВЭЖХ профили радиоактивности фракций даларгина приведен на Рис. 12. Фракции пептида объединили и упарили досуха. Концентрацию раствора меченого препарата определили с помощью УФ спектрометрии.

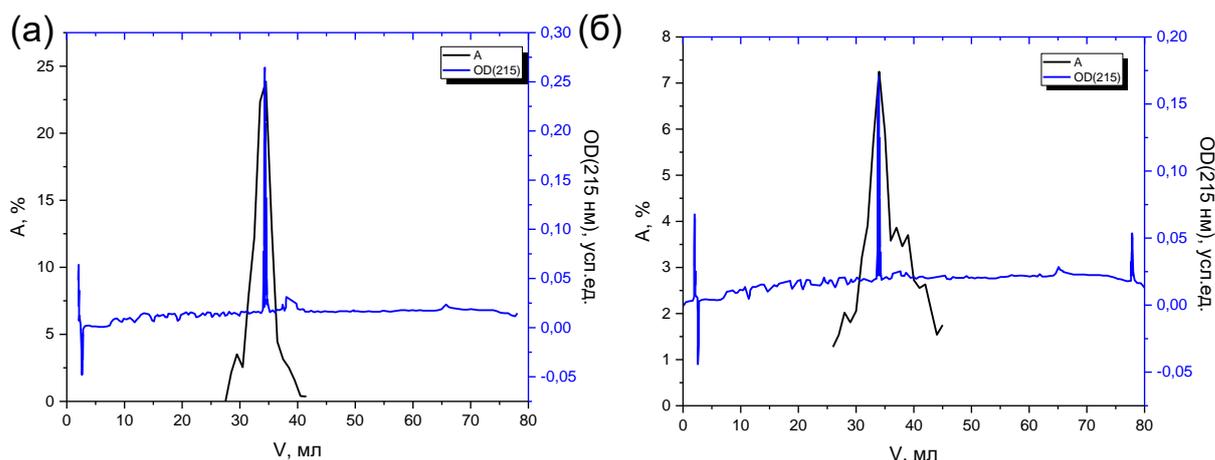


Рис. 12. – Профиль радиоактивности (черная линия) и УФ-поглощения при 215 нм (синяя линия), при ВЭЖХ очистке, меченного тритием даларгина при температуре мишени 77 К (а) и 295 К (б)

Показано, что при введении трития при температуре мишени 77 К количество радиоактивных побочных продуктов меньше. Провели анализ распределения трития по аминокислотным остаткам даларгина после его тотального гидролиза. Молярная радиоактивность даларгина, определенная с помощью аминокислотного анализа, составляет $A(295) = 4,34$ Ки/ммоль и $A(77) = 4,62$ Ки/ммоль. Распределение трития по аминокислотным остаткам даларгина, меченного при 77 и 295 К, по данным аминокислотного анализа гидролизата приведено в таблице 3.

Таблица 3 – Распределение трития по аминокислотным остаткам и удельная радиоактивность препаратов

Аминокислотный остаток	Удельная радиоактивность, Ки/ммоль		Распределение трития по остаткам, %	
	295 К	77 К	295 К	77 К
Gly	0,25	0,23	6	5
Ala	0,53	0,71	12	15
Leu	2,80	2,79	65	60
Tyr	0,05	0,19	1	4
Phe	0,03	0,13	1	3
Arg	0,66	0,58	15	12
Σ	4,34	4,62	100	100

Из таблицы 3 следует, что распределение трития по аминокислотным остаткам при 295 К и 77 К вполне сопоставимо, исходя из чего можно предположить, что температура не оказывает существенного влияния на распределение трития.

Для дальнейших экспериментов с применением метода сцинтиллирующей фазы использовали препарат, меченный тритием при 77 К, поскольку по данным ВЭЖХ в нем содержалось меньшее количество побочных продуктов.

Заключение из главы 3.1.

Удельная радиоактивность очищенных препаратов лежала в диапазоне от 0,24 до 6,0 Ки/г. Такой уровень удельной радиоактивности позволил провести эксперименты по исследованию адсорбции и распределения между фазами индивидуальных веществ и их смесей с лизоцимом. Причем в большинстве случаев добавлялся нерадиоактивный носитель для создания нужной концентрации. Молярная радиоактивность препаратов в пересчете на 100% тритий приведена в таблице 2 в разделе 2.2. Величины молярной радиоактивности лизоцима, мирамистина, амикацина и даларгина соответствовали литературным данным. Меченный тритием левофлоксацин был получен впервые.

3.2. ВЗАИМНОЕ ВЛИЯНИЕ ЛИЗОЦИМА И ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ПРИ КОНКУРЕНТНОЙ АДСОРБЦИИ НА МЕЖФАЗНЫХ ГРАНИЦАХ ВОДНЫЙ РАСТВОР/*n*-КСИЛОЛ И ВОДНЫЙ РАСТВОР/ВОЗДУХ

Взаимное влияние лизоцима и ЛС на поведение в двухфазной системе водный раствор/*n*-ксилол было исследовано с помощью МСФ. Преимуществом МСФ является возможность определения количества меченого вещества на границе жидкость-жидкость на фоне других компонентов смеси. В Таблице 4 приведены коэффициенты распределения между органической (*n*-ксилол) и водной фазой (PBS) ЛС и их смесей с лизоцимом. Коэффициенты распределения были определены, как тангенсы угла наклона зависимостей концентрации ЛС в ксилоле от их концентрации в водной фазе. Для даларгина в Таблице 4 приведен коэффициент распределения, который рассчитывали по линейной зависимости при низких концентрациях. При высоких концентрациях веществ, способных к образованию мицеллоподобных структур, на зависимости вещества в органической фазе от концентрации в воде происходит уменьшение тангенса угла наклона. В данной работе таковым является мирамистин и даларгин. Если для поверхностно-активного четвертичного аммониевого основания – мирамистина, такое

поведение очевидно [280]², то для пептида такой вид зависимости наблюдается впервые. На Рис. 13 приведена концентрационная зависимость для даларгина в широком диапазоне концентраций.

Таблица 4 – Значения коэффициентов распределения ЛС в системе PBS/*n*-ксилол

ЛС	Индивидуально ЛС	Смесь с лизоцимом
Мирамистин	$(2,5 \pm 0,2) \times 10^{-1}$	$(1,43 \pm 0,03) \times 10^{-1}$
Амикацин	$(9,0 \pm 0,5) \times 10^{-5}$	$(7,6 \pm 0,5) \times 10^{-5}$
Левифлоксацин	$(1,6 \pm 0,1) \times 10^{-2}$	$(1,6 \pm 0,1) \times 10^{-2}$
Даларгин	$(4,5 \pm 0,3) \times 10^{-3}$	$(4,5 \pm 0,3) \times 10^{-3}$

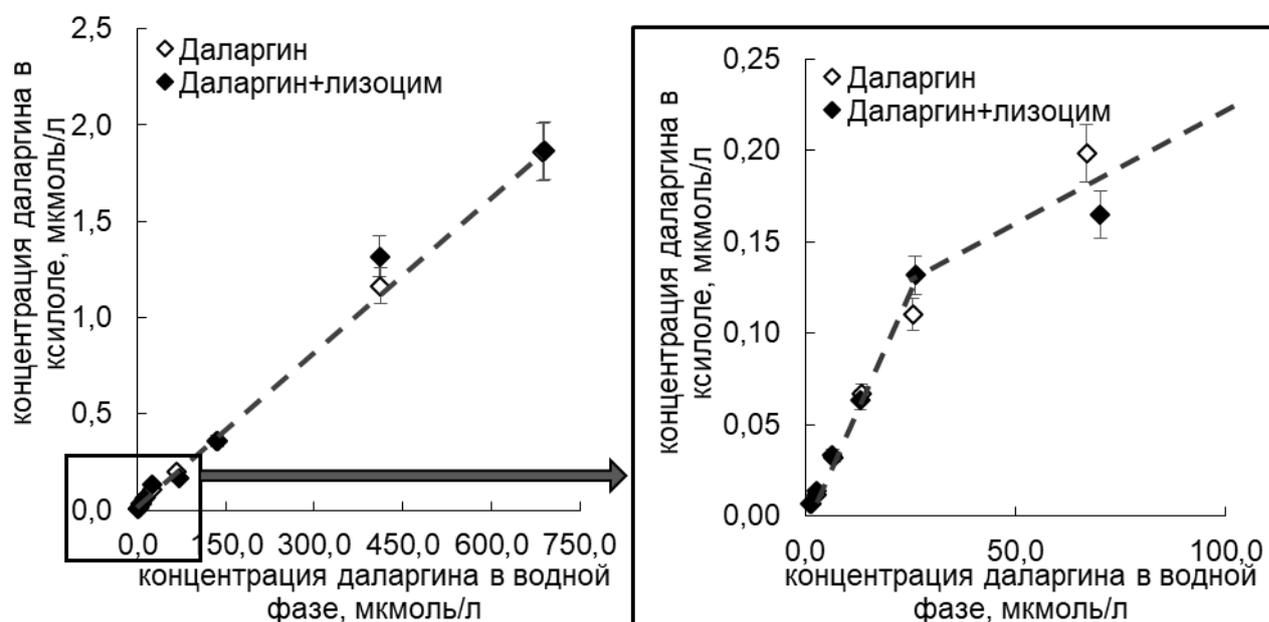


Рис. 13. – Зависимость концентрации даларгина в объеме органической фазы от его концентрации в PBS (справа зависимость в области низких концентраций).

В присутствии лизоцима происходит снижение коэффициента распределения мирамистина и амикацина, что указывает на возможность образования комплекса с лизоцимом. Присутствие лизоцима не влияет на величину коэффициента распределения левифлоксацина и даларгина.

² При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Н.С. Skrabkova, М.Г. Chernysheva, А.М. Arutyunyan, G.A. Badun Complex of lysozyme and Myramistin: formation and adsorption at the water-xylene interface // Mendeleev Communications. 2020. V. 30, № 5. P. 645–646. (Импакт-фактор 1,837), 25%

При исследовании влияния ЛС на коэффициент распределения лизоцима (Рис. 14) обнаружили, что присутствие мирамистина и даларгина во всей изученной области концентраций не оказывает влияния на коэффициент распределения лизоцима. Для удобства сравнения результатов для свободного лизоцима и лизоцима в присутствии ЛС проводили нормирование в соответствии со значениями, полученными для свободного лизоцима. Во всех проводимых исследованиях использовали растворы лизоцима с концентрацией 0,01 г/л (0,7 мкмоль/л). Коэффициент распределения лизоцима без добавок равен $(1,9 \pm 0,3) \times 10^{-2}$. Добавка левофлоксацина во всем исследуемом диапазоне концентраций и амикацина в области концентраций $8,5 \times 10^{-4} - 4,3 \times 10^{-2}$ М снижает коэффициент распределения лизоцима на ~20%, что можно объяснить образованием гидрофильных комплексов амикацин – лизоцим и левофлоксацин – лизоцим. Стоит отметить, что коэффициенты распределения между водой и *n*-ксилолом левофлоксацина и лизоцима оказались практически равны как в индивидуальных растворах, так и в смесях этих соединений, а концентрация свободного левофлоксацина в органической фазе выше, чем лизоцима, поэтому образование комплекса мало сказывается на коэффициенте распределения левофлоксацина (Таблица 4).

Прежде, чем рассмотреть взаимное влияние при конкурентной адсорбции лизоцима и ЛС на межфазной границе в двухфазной системе водный раствор/*n*-ксилол, стоит отметить, что в качестве водной фазы использовали PBS (рН $7,3 \pm 0,1$, 0,16 М). Мирамистин относится к катионным ПАВ, для которых мицеллообразование и форма мицелл зависит от ионной силы раствора [281], поэтому было исследовано влияние фосфатно-солевого буфера на его коллоидные характеристики. На Рис. 15 представлены изотермы поверхностного натяжения водного раствора мирамистина на границе вода–воздух и растворов мирамистина. ККМ мирамистина в воде составило 1,1 мМ, в PBS – 0,05 мМ [282]³.

³ При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: M.G. Chernysheva, A.V. Shnitko, H.S. Skrabkova, G.A. Badun Peculiarities of alkylamidopropyl dimethylbenzylammonium (Miramistin) in the relationship to lysozyme in comparison with quaternary ammonium surfactants: coadsorption at the interfaces, enzymatic activity and molecular docking // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2021, V. 629. Art # 127503 (Импакт-фактор 5.518), 25%

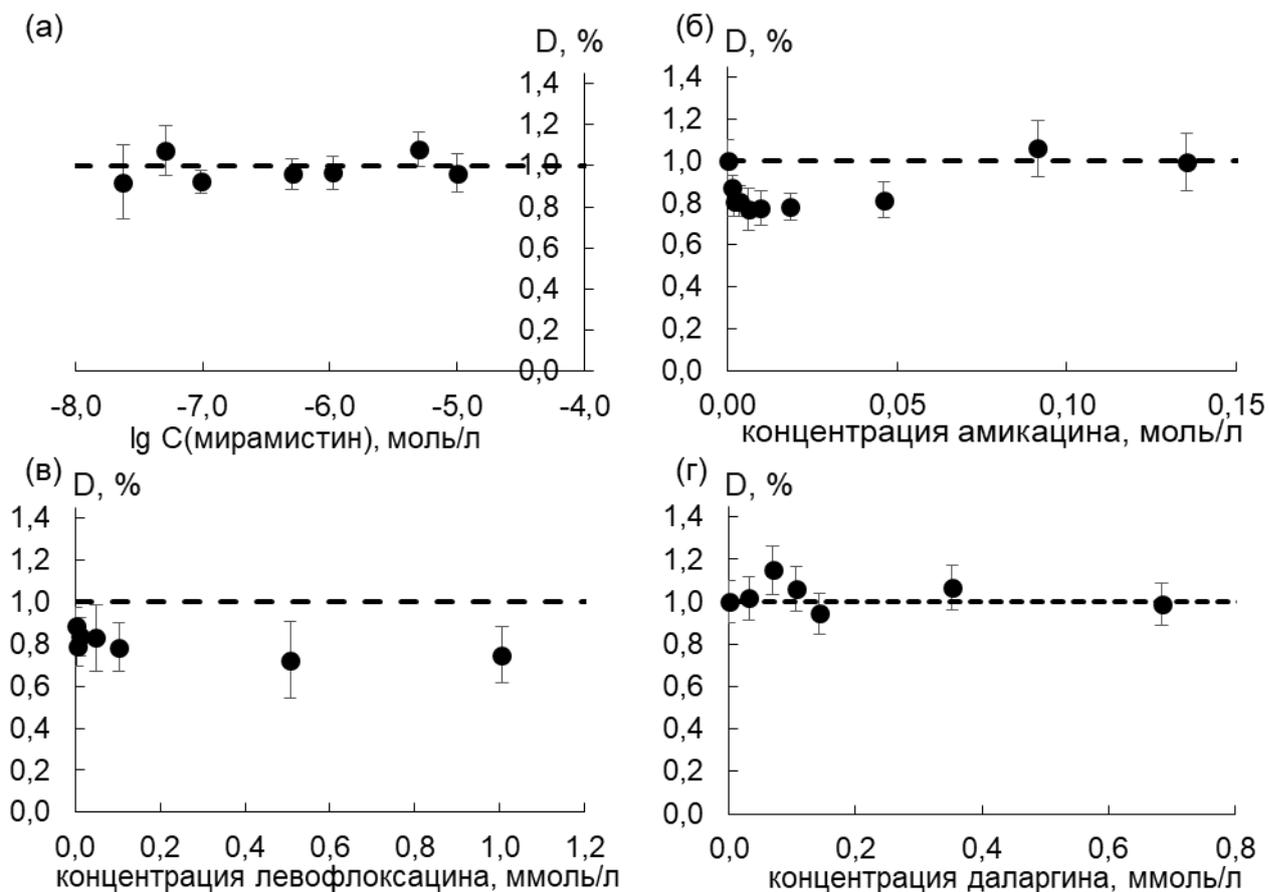


Рис. 14. – Влияние ЛС на коэффициент распределения лизоцима: (а) мирамистина; (б) амикацина; (в) левофлоксацина; (г) даларгина. Пунктирной линией показан коэффициент распределения лизоцима без добавок.

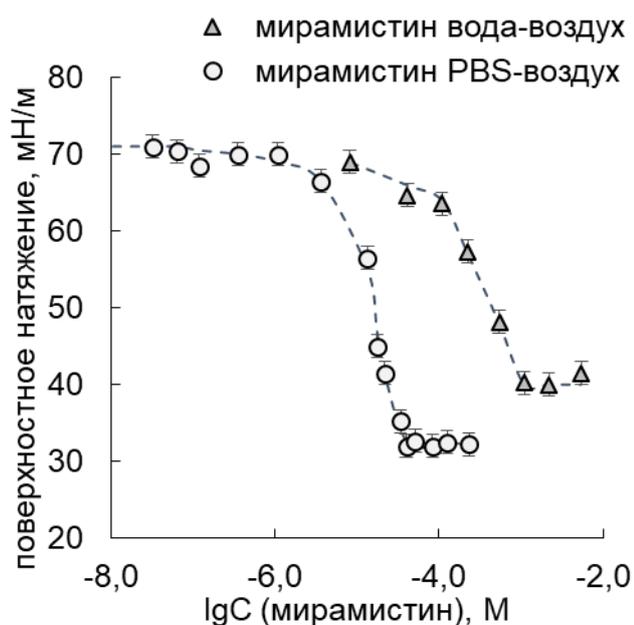


Рис. 15. – Изотермы поверхностного натяжения мирамистина в воде (треугольники) и в PBS (кружки). Пунктирными линиями показан результат расчета по уравнению Гиббса.

С использованием программного обеспечения Origin Pro для каждого значения концентрации определяли производную $\frac{\partial \sigma}{\partial c}$, рассчитывали значение адсорбции (Γ) в соответствии с уравнением Гиббса:

$$\Gamma = -\frac{c}{RT} \frac{\partial \sigma}{\partial c}, \quad (3.7)$$

Полученные изотермы адсорбции описывали уравнениями Ленгмюра (3.2) для определения максимальной адсорбции (Γ_{max}) и (3.3) для определения удельной поверхности (s), приходящейся на молекулу, на границе раздела вода-воздух:

$$\Gamma = \Gamma_{max} \frac{c \times K_L}{1 + c \times K_L}, \quad (3.8)$$

$$s = \frac{1}{\Gamma_{max}}, \quad (3.9)$$

где K_L – константа адсорбции. Γ_{max} и K_L выбирались методом наименьших квадратов с коэффициентами корреляции (0,976 для водного раствора и 0,974 для PBS). Для водных растворов при выполнении расчетов дополнительно использовали коэффициент $\frac{1}{2}$ в уравнении (3.2) [283]. Полученные результаты представлены в Таблице 5.

Таблица 5 – Параметры адсорбции мирамистина

	$\Gamma_{max}, \frac{\text{мкмоль}}{\text{м}^2}$	$K_L, \frac{\text{л}}{\text{ммоль}}$	$s, \frac{\text{нм}^2}{\text{молекула}}$
Вода	3,59	3,8	0,463
PBS	8,33	110	0,199

В PBS образование мицелл происходит при концентрации мирамистина на порядок ниже, чем в водном растворе, что связано с экранизацией заряда электролитом, электростатическим взаимодействием между заряженной группой мирамистина и противоионом, которое снижает электростатическое отталкивание между молекулами мирамистина [284]. По этой же причине увеличение ионной силы раствора приводит к образованию плотного адсорбционного слоя на границе раздела и уменьшению удельной площади молекул на поверхности PBS-воздух по сравнению с поверхностью вода-воздух [285].

С помощью МСФ была определена адсорбция индивидуальных веществ и их влияние при конкурентной адсорбции, на границе раздела фаз водный раствор – *n*-ксилол.

На Рис. 16 приведено влияние ЛС на адсорбцию лизоцима на межфазной границе при концентрации лизоцима в водной фазе 0,01 г/л ($7,0 \times 10^{-7}$ М). Адсорбция лизоцима без добавок составляла $(1,5 \pm 0,2)$ мг/м², что соответствует образованию насыщенного адсорбционного слоя, состоящего из молекул лизоцима ориентированных вдоль межфазной границы [121]. Добавка амикацина и даларгина не оказывает влияния на адсорбцию лизоцима, в случае смеси лизоцим – даларгин, исходя из полученных данных коэффициента распределения и адсорбции, лизоцим остается на поверхности и не вытиснется из межфазного адсорбционного слоя. При концентрации левофлоксацина выше 100 мкмоль/л адсорбция лизоцима на межфазной границе немного снижается. При увеличении концентрации мирамистина вплоть до соотношения белок-лиганд 1:1 наблюдается рост адсорбции лизоцима, а дальнейшее увеличение концентрации приводило к снижению адсорбции белка на межфазной границе, что может быть связано с образованием комплекса состава 1:1. Для проверки данного предположения провели исследование влияния мирамистина на адсорбцию лизоцима при более высоких концентрациях лизоцима в объеме водной фазы – 0,1 и 0,5 г/л ($7,0 \times 10^{-6}$ и $3,5 \times 10^{-5}$ М), Рис. 17.

В экспериментах с концентрацией лизоцима 0,1 г/л наблюдалось вытеснение лизоцима мирамистином из адсорбционного слоя, однако этот эффект уменьшался с увеличением концентрации мирамистина. Наибольшее содержание лизоцима в адсорбционном слое достигалось при концентрации мирамистина, близкой к концентрации белка, и в дальнейшем несколько снижалось. При концентрации лизоцима 0,5 г/л ($3,5 \times 10^{-5}$ моль/л) количество белка в адсорбционном слое снижалось при добавлении мирамистина. Однако при концентрации мирамистина 5×10^{-5} моль дм⁻³ наблюдалась наибольшая адсорбция лизоцима. Отметим, что это значение концентрации мирамистина соответствует его ККМ в фосфатно-солевом буфере, определенной тензиометрией с использованием методики висячей капли (Рис. 15). Равенство объемной концентраций белка и мирамистина в максимуме адсорбции представляется не случайным совпадением, а связано с образованием комплекса, вероятно, состава 1:1, который обладает более высокой способностью к адсорбции на межфазной границе, чем свободный белок. Чем выше концентрация мирамистина в растворе, тем сильнее он способствует вытеснению белка из адсорбционного слоя, поэтому наблюдаемый эффект становится менее выраженным.

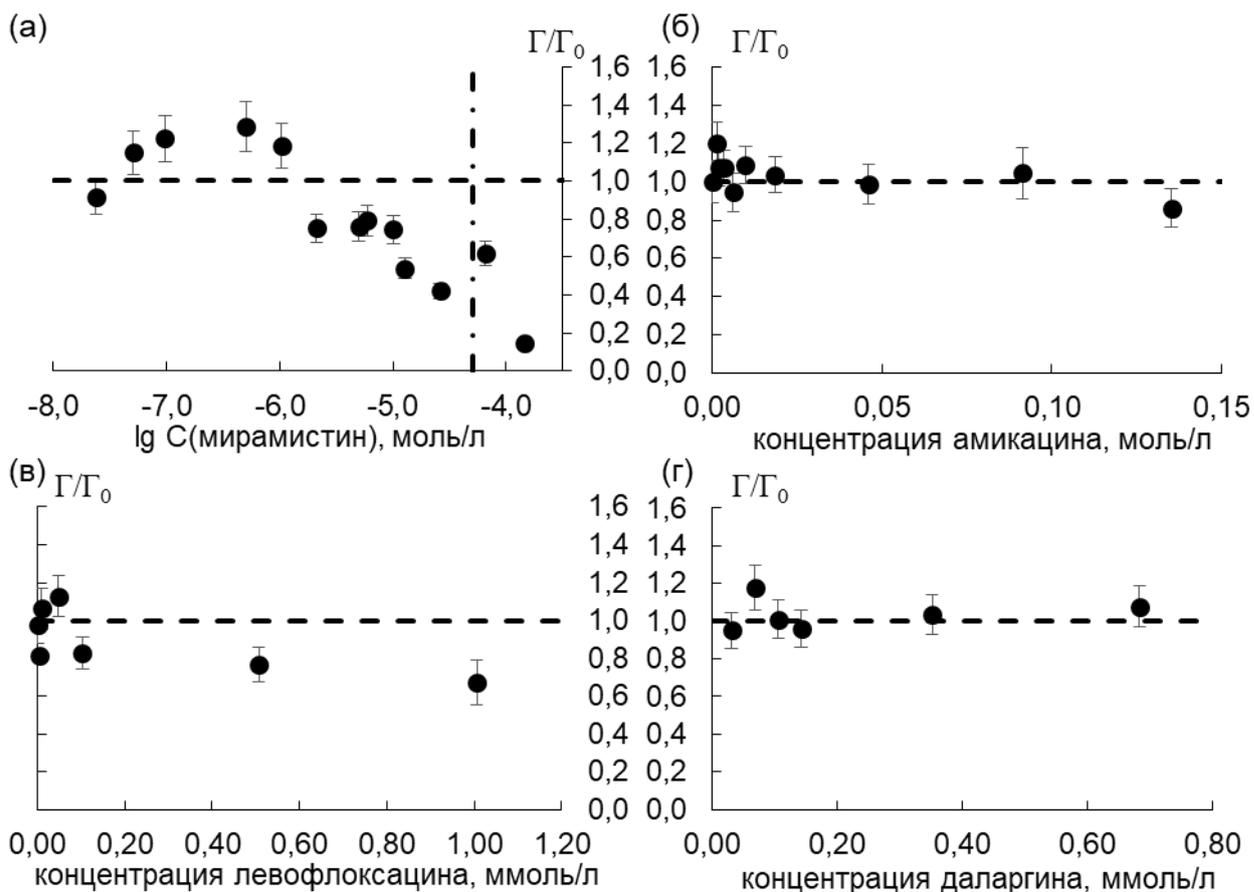


Рис. 16. – Влияние добавок ЛС на адсорбцию лизоцима (относительно адсорбции лизоцима без добавок-Г₀): (а) мирамистин, перпендикулярной штрихпунктирной линией показано значение ККМ; (б) амикацин; (в) левофлоксацин; (г) даларгин. Пунктирной линией показана адсорбция лизоцима без добавок. Концентрация лизоцима 0,01 г/л.

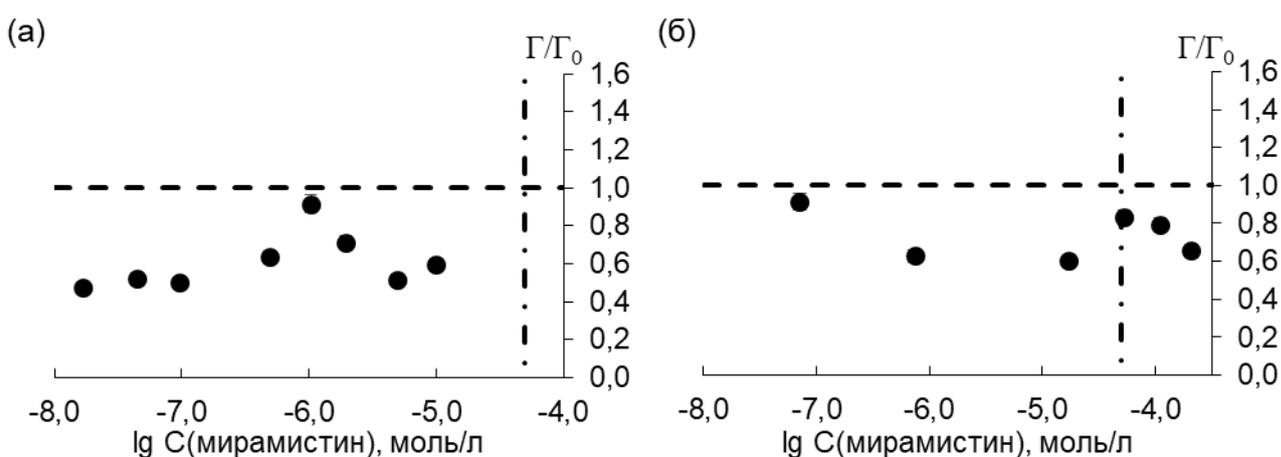


Рис. 17. – Влияние мирамистина на адсорбцию лизоцима (относительно адсорбции лизоцима без добавок-Г₀). Пунктирной линией показана адсорбция лизоцима без добавок. Перпендикулярной штрихпунктирной линией показано значение ККМ мирамистина. Концентрация лизоцима: (а) 0,1 г/л и (б) 0,5 г/л.

Изотермы адсорбции ЛС на межфазной границе водный раствор/*n*-ксилол в отсутствие и в присутствии лизоцима (0,01 г/л), определенные с помощью МСФ, показаны на Рис. 18. Концентрация мирамистина на межфазной границе в присутствии лизоцима уменьшается в 4-5 раз, что характерно для совместной адсорбции лизоцима с четвертичными аммониевыми основаниями [282]⁴. Взаимное уменьшение адсорбции можно объяснить электростатическим отталкиванием. Предполагается [286], что при низких концентрациях катионных ПАВ (ниже ККМ), связывание катионного ПАВ вызывает повышенную гидратацию лизоцима, то есть приводит к некоторому дальнему упорядочению молекул воды вокруг белковой молекулы. Таким образом, когда количество молекул мирамистина в водном растворе превышает количество молекул белка, образуется «гидратированный комплекс лизоцим-мирамистин» (не эквимолярного состава), который покидает адсорбционный слой. Лизоцим вызывает уменьшение содержания мирамистина не только в адсорбционном слое, но и в органической фазе (Таблица 4).

Для амикацина, левофлоксацина и даларгина наблюдается линейный рост адсорбции с ростом их концентрации в водной фазе как индивидуально, так и в смеси с лизоцимом, поэтому изотермы адсорбции были описаны уравнением, аналогичным уравнению Генри, а полученные константы адсорбции приведены в Таблице 6. Лизоцим не оказывает влияния на концентрирование амикацина в поверхностном слое во всем исследуемом диапазоне концентраций. До определенного момента лизоцим увеличивает адсорбцию левофлоксацина на межфазной границе водный раствор – *n*-ксилол. Данный эффект можно объяснить образованием комплекса лизоцим-левофлоксацин. При дальнейшем увеличении концентрации левофлоксацина его адсорбция перестает изменяться и остается на уровне $3,5 \times 10^{-2}$ ммоль/м², что связано с конкурентной адсорбцией лизоцима и левофлоксацина, которая согласуется с результатами, полученными при исследовании адсорбции лизоцима методом СФ (Рис. 16). Адсорбция даларгина в присутствии лизоцима также возрастает.

⁴ При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: M.G. Chernysheva, A.V. Shnitko, H.S. Skrabkova, G.A. Badun Peculiarities of alkylamidopropyl dimethylbenzylammonium (Miramistin) in the relationship to lysozyme in comparison with quaternary ammonium surfactants: coadsorption at the interfaces, enzymatic activity and molecular docking // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2021, V. 629. Art # 127503 (Импакт-фактор 5.518), 25%

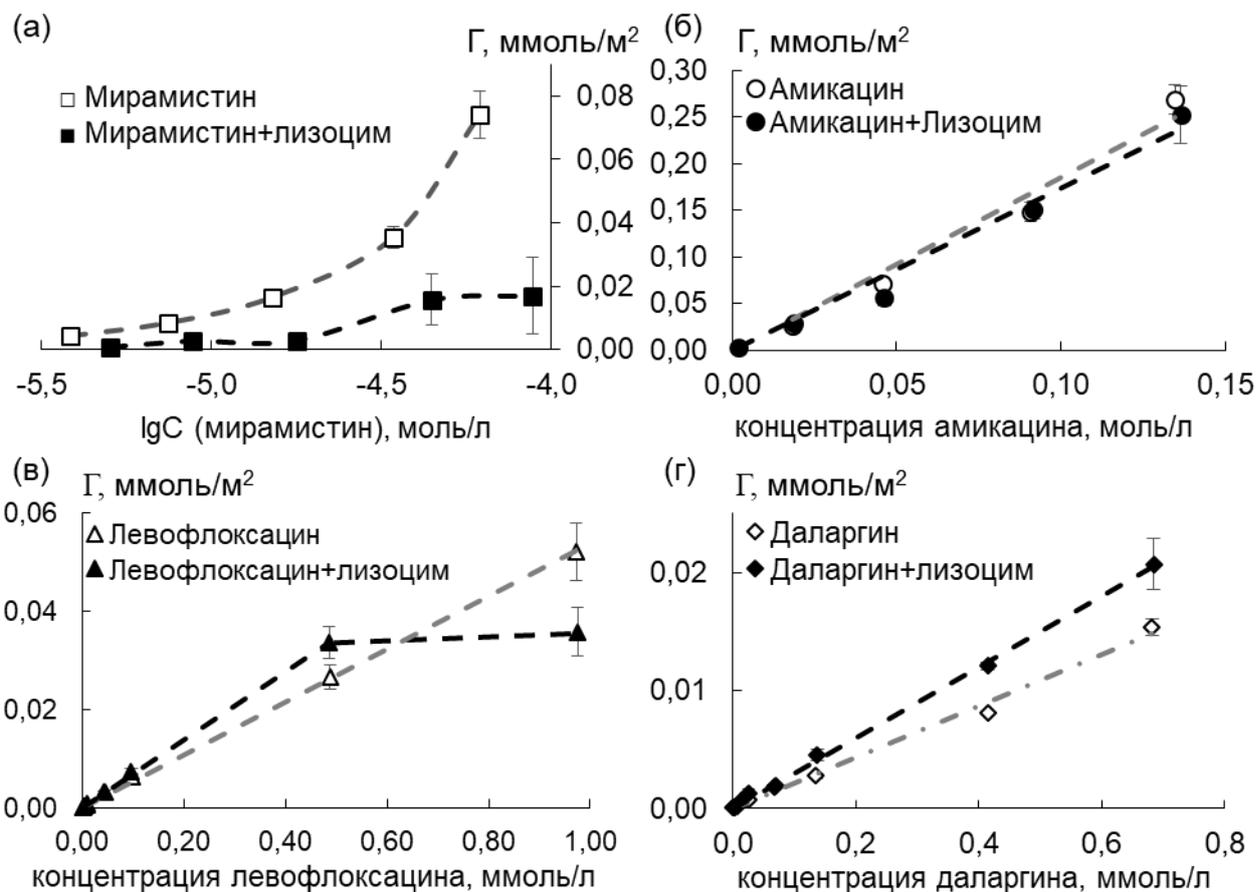


Рис. 18. – Адсорбция ЛС на межфазной границе водный раствор – *n*-ксилол для индивидуального вещества и в присутствии лизоцима в концентрации 0,01 г/л.

Таблица 6 – Значения констант адсорбции ЛС на межфазной границе PBS – *n*-ксилол

ЛС	K(ЛС), ммоль/м ² ×M ⁻¹	
	Индивидуально ЛС	ЛС в смеси с лизоцимом
Амикацин	1,85±0,11 (r = 0,992)	1,73±0,11 (r = 0,987)
Левифлоксацин	54,0±0,6 (r = 0,999)	69,5±0,6 (r = 0,999)
Даларгин	22,3±0,6 (r = 0,996)	28,0±0,5 (r = 0,999)

Изотермы поверхностного натяжения смеси лизоцима и мирамистина на границе PBS - ксилол и PBS – воздух представлены на Рис. 19, при низких концентрациях мирамистина поверхностное натяжение на границе с воздухом контролируется белком. При интерпретации результатов и сопоставлении с МСФ нужно учитывать, что в отличие от МСФ, который позволяет определить количество вещества в адсорбционном и приповерхностных слоях, поверхностное натяжение чувствительно только к заполнению адсорбционного монослоя и образованию мицелл, но уже нечувствительно к

образованию мультислоев. Значения, полученные для мирамистина с помощью МСФ, указывают на образование мультислоев на границе раздела. Состав адсорбционного слоя (при поверхностного) на границе с ксилолом для смеси лизоцима и мирамистина представлен на Рис. 20. Существует модель, описывающая поверхностное натяжение выше ККМ и равновесие между образованием бислоя и мицелл свободным ПАВ [287]. При концентрации ПАВ вблизи ККМ молярное отношение ПАВ/белок на границе раздела близко к 1000, что может приводить к изменениям в структуре белков. Поверхностная денатурация лизоцима на границе с воздухом незначительна [118], однако может происходить на границе вода-органическая жидкость [288], что необходимо учитывать при интерпретации результатов.

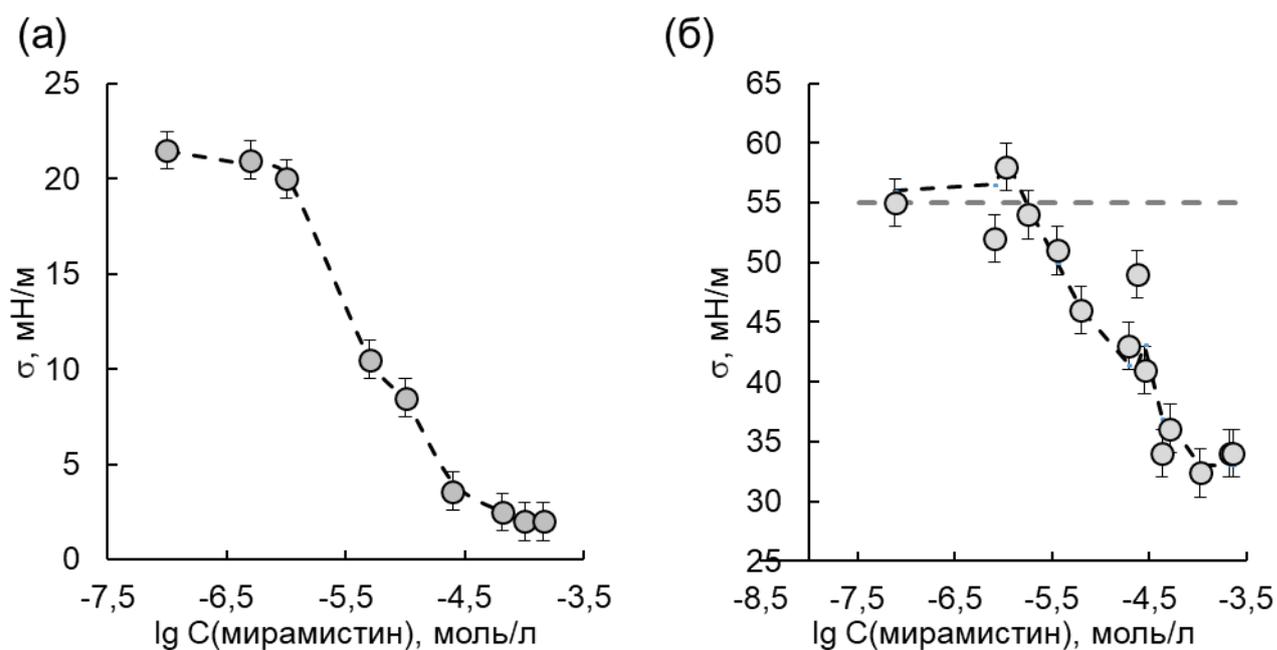


Рис. 19. – Изотермы поверхностного натяжения смеси лизоцим – мирамистин на границе раздела фаз (а) PBS - ксилол и (б) PBS - воздух. Серой пунктирной линией показан чистый лизоцим на границе раздела фаз. Черной пунктирной линией показан результат расчета по уравнению (1.12).

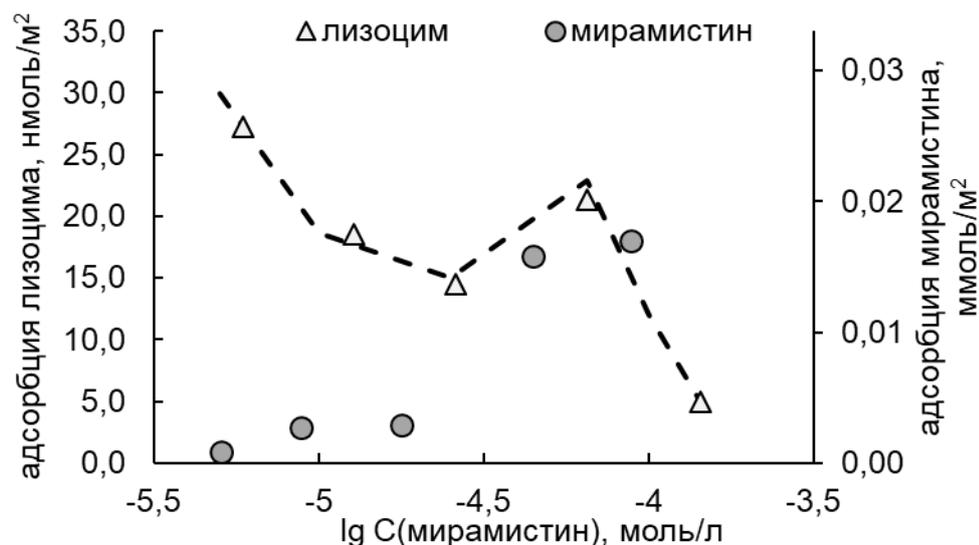


Рис. 20. – Зависимости адсорбции лизоцима и мирамистина в составе адсорбционного слоя на границе раздела PBS – ксилол (из данных МСФ). Пунктирной линией показан результат расчета по уравнению (1.13). Концентрация лизоцима 0,01 г/л.

Изотермы поверхностного натяжения смеси лизоцима и амикацина на границе раздела фаз PBS – ксилол и PBS – воздух приведены на Рис. 21, лизоцима и левофлоксацина – на Рис. 22, лизоцима и даларгина – на Рис. 23. На границе с воздухом чистый амикацин и левофлоксацин не снижают поверхностное натяжение. На границе с ксилолом для растворов амикацина 1,7 и 8,5 ммоль/л межфазное натяжение снижается с 43 мН/м до 16,5 и 14,7 мН/м, соответственно. При концентрации лизоцима 0,01 г/л поверхностное натяжение на границе с воздухом снижается с 73 до 62 мН/м, на границе с *n*-ксилолом – с 43 до 18,5 мН/м.

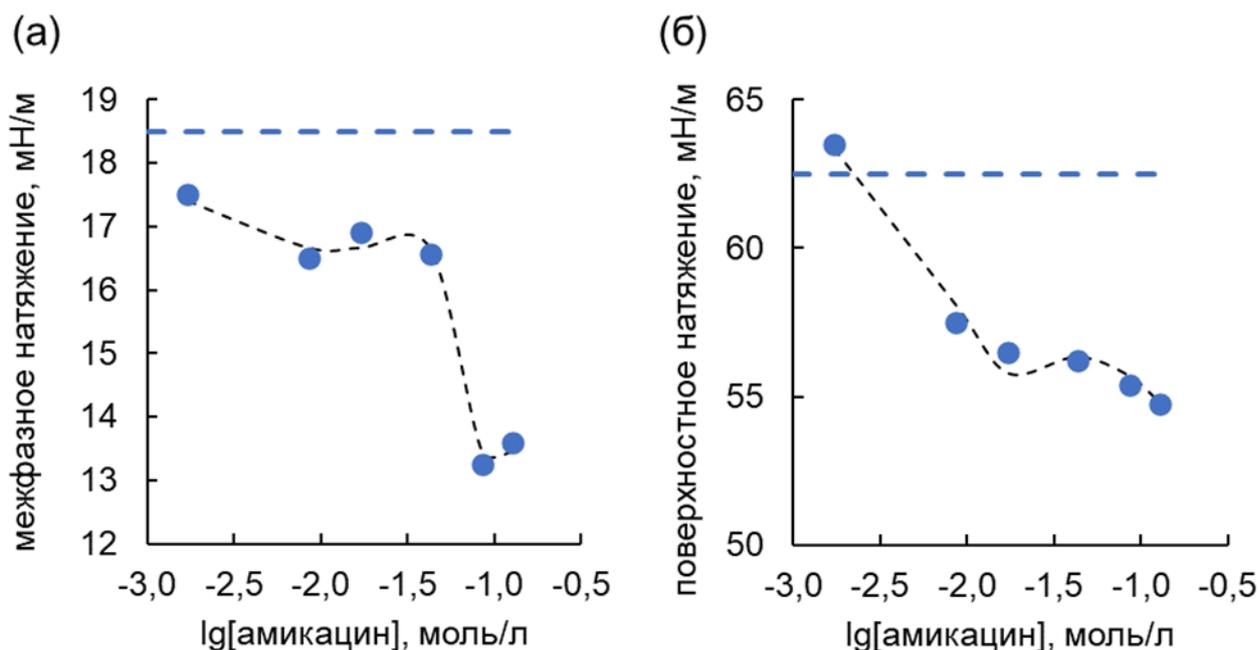


Рис. 21. – Изотермы поверхностного натяжения смеси лизоцим – амикацин на границе раздела фаз (а) PBS - ксилол и (б) PBS - воздух. Синей пунктирной линией показан чистый лизоцим на границе раздела фаз. Пунктирной линией показан результат расчета по уравнению (1.15).

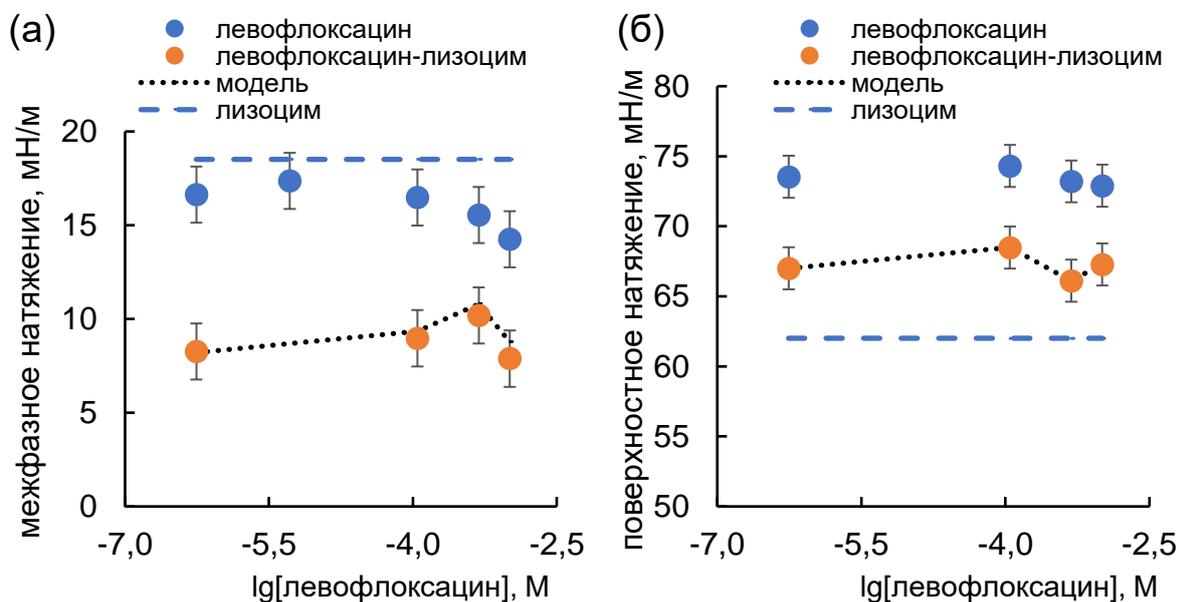


Рис. 22. – Изотермы поверхностного натяжения смеси лизоцим – левофлоксацин на границе раздела фаз (а) PBS - ксилол и (б) PBS - воздух. Синей пунктирной линией показан чистый лизоцим на границе раздела фаз. Пунктирной линией показан результат расчета по уравнению (1.15).

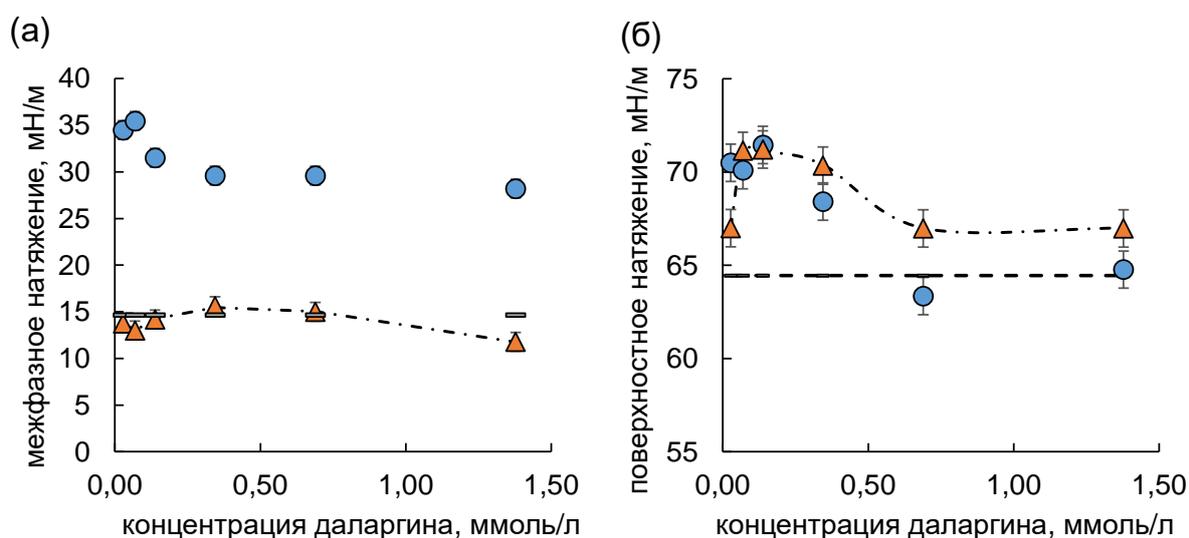


Рис. 23. – Изотермы поверхностного натяжения даларгина (кружки) и его смеси с лизоцимом (треугольники) на границе раздела фаз (а) PBS - ксилол и (б) PBS – воздух. Пунктирной линией показан чистый лизоцим на границе раздела фаз. Штрихпунктирной линией показан результат расчета по уравнению (1.15).

Для определения максимальной адсорбции и поверхностной активности даларгина изотермы поверхностного натяжения описывали с помощью уравнения [289–291]⁵:

$$\gamma = \gamma_0 - b \times \ln(Ac + 1), \quad (3.10)$$

где γ – поверхностное натяжение, b и A – константы, подобранные по методу наименьших квадратов, с помощью которых были рассчитаны значения максимальной адсорбции (Γ_{max}), удельной поверхности (уравнение 3.3) и поверхностной активности (G) даларгина (Таблица 7):

$$\Gamma_{max} = \frac{b}{RT}, \quad (3.11)$$

$$G = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{d\gamma}{dc} \right) \approx A \times b, \quad (3.12)$$

Таблица 7 – Параметры адсорбции даларгина

$\Gamma_{max}, \frac{\text{мкмоль}}{\text{м}^2}$	$S, \frac{\text{нм}^2}{\text{молекула}}$	$G, \frac{\text{мДж}}{\text{м}^2} \frac{\text{л}}{\text{моль}}$
1,0±0,3	1,7	4,7×10 ⁴

⁵ При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: M.G. Chernysheva, A.V. Kasperovich, H.S. Skrabkova, A.V. Shnitko, A.M. Arutyunyan, G.A. Badun Lysozyme-dalargin self-organization at the aqueous-air and liquid-liquid interfaces // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2021, V. 202. Art # 111695 (Импакт-фактор 5.999), 20%

Рассчитанная изотерма адсорбции на границе раздела PBS-ксилол показана пунктирной линией на Рис. 24. Было обнаружено, что при низкой концентрации пептида (ниже 70 мкмоль/л) значения адсорбции хорошо коррелируют с результатами, полученными с помощью межфазного натяжения по уравнению Гиббса. При более высоких концентрациях значения адсорбции даларгина, определенные методом сцинтиллирующей фазы, значительно превышают значения, рассчитанные по межфазному натяжению. Причина в том, что поверхностное натяжение чувствительно к монослою, а сцинтилляционная фаза показывает фактическое количество соединения в приповерхностном слое.

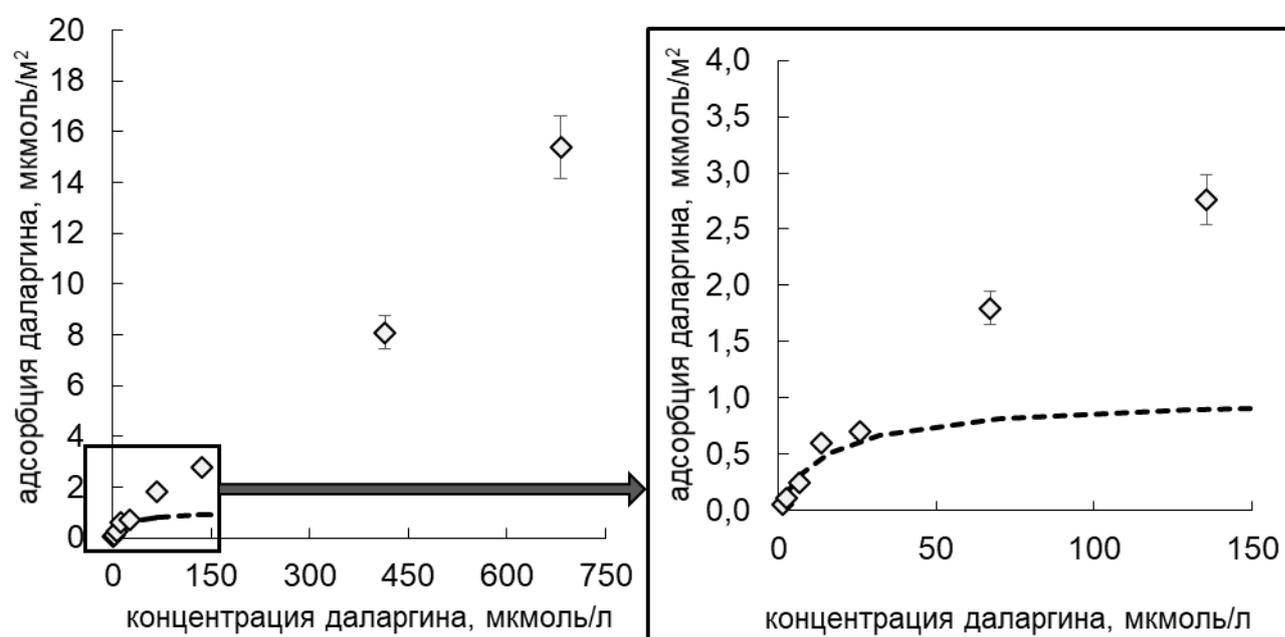


Рис. 24. – Зависимость адсорбции даларгина на границе раздела вода/ксилол от его концентрации по методу сцинтиллирующей фазы (справа зависимость в области низких концентраций). Пунктирной линией показан расчет по уравнению Гиббса по межфазному натяжению.

Поскольку движущей силой адсорбции коротких пептидов на границе с воздухом является уменьшение площади гидрофобной поверхности раздела с водой, которая, в основном, достигается за счет дегидратации гидрофобных аминокислотных остатков [292], увеличение адсорбции даларгина в присутствии белка может быть следствием образования белково-пептидного комплекса, поэтому лизоцим вносит значительный вклад в адсорбцию даларгина. Примечательно, что сам даларгин обладает поверхностной активностью на границах раздела вода-воздух и вода-ксилол. Более того, некоторые пептиды, концентрируясь в приповерхностных слоях, могут образовывать агрегаты [293],

присутствие органической фазы способствует агрегации пептидов. При концентрации лизоцима 0,01 мг/мл (0,7 мкмоль/л) на обеих границах раздела возможно образование насыщенного монослоя концевых молекул и диффузного ненасыщенного второго слоя [112]. Для смеси лизоцим-даларгин поверхностное натяжение на границе вода-воздух контролируется пептидом, на границе вода-ксилол – белком. Кривые кинетики поверхностного натяжения для свободного лизоцима и свободного даларгина, а также смеси на границах раздела вода-воздух и вода-ксилол показаны на Рис. 25 и Рис. 26.

На границе жидкость-жидкость формирование насыщенного адсорбционного слоя лизоцима происходит при более низких объемных концентрациях, чем на границе вода-воздух, предполагается, что это связано с влиянием ионной силы и pH при низких концентрациях лизоцима [121]. Вероятно, адсорбция белка на границе жидкость-жидкость сопровождается быстрым разворачиванием белка, в котором важную роль играет жидкая фаза (ксилол), что позволяет сформировать хорошо распределенный слой лизоцима на границе раздела [262,294]. Данное предположение подтверждается кинетикой поверхностного натяжения Рис. 25-23 (а). На границе вода-воздух время индукции поверхностного натяжения составило 10 мин, а на границе вода-*n*-ксилол время индукции сократилось до 25 с. Линейная зависимость поверхностного натяжения от времени квадратного корня свидетельствует о том, что процесс адсорбции контролируется диффузией белка (Рис. 26 а и б). Данные объясняются фазовым переходом первого порядка от поверхностной газовой фазы к поверхностной жидкой расширенной фазе [295]. Поскольку на границе раздела вода-воздух не происходит быстрого разворачивания молекул, лизоцим сначала образует адсорбционный слой толщиной, соответствующей его кристаллографическим размерам ($30 \times 30 \times 45 \text{ \AA}$ [54,121]), и организуется с образованием поверхностных газообразных, жидко-расширенных, и, возможно, жидко-конденсированных состояний [296]. На границе жидкость-жидкость лизоцим сразу переходит либо в жидко-расширенное, либо в жидко-конденсированное состояние, поэтому индукционный период отсутствует.

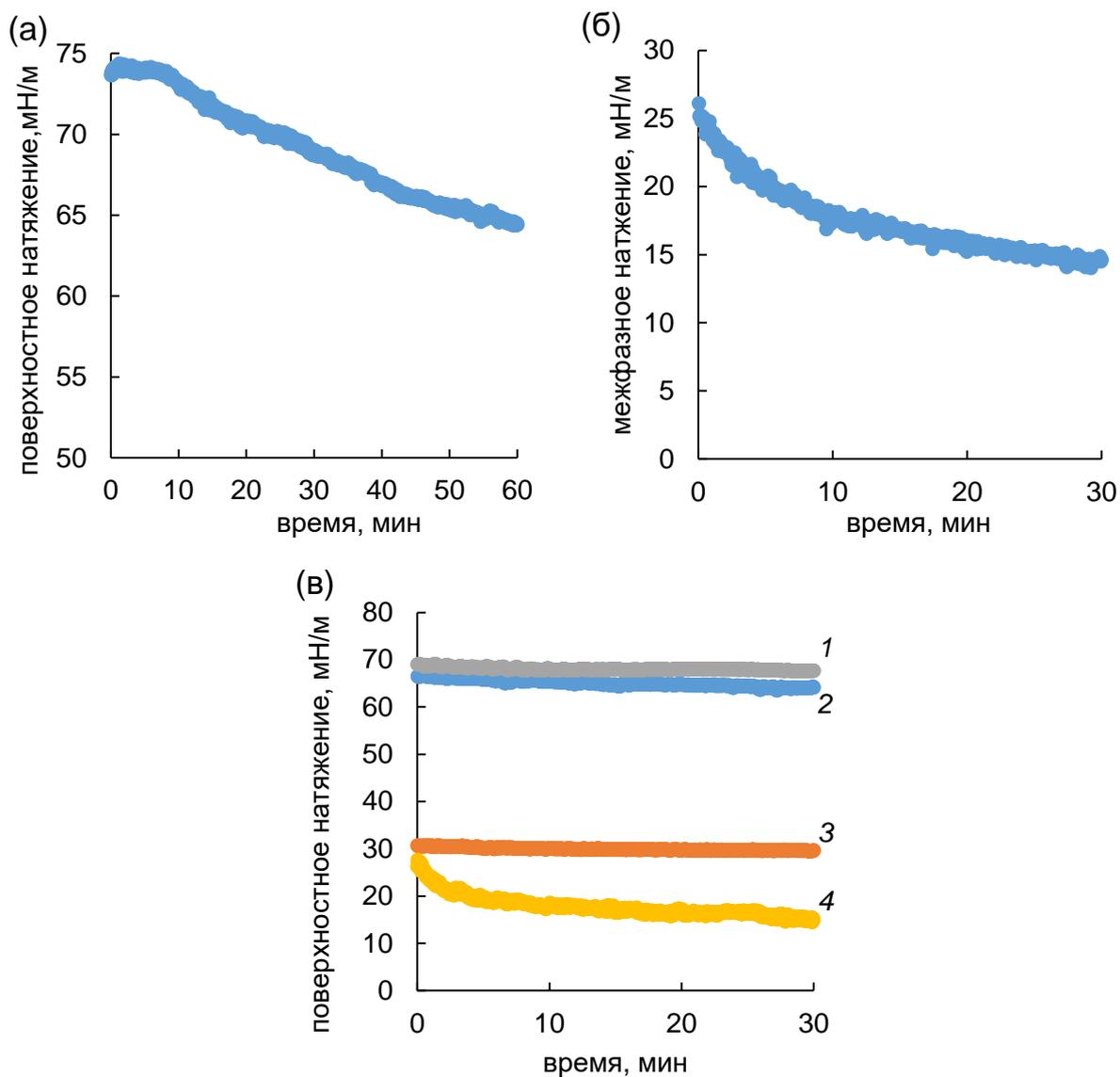


Рис. 25. – Кинетика изменения межфазного натяжения в линейных координатах: свободного лизоцима (0,7 мкмоль/л) на границах вода-воздух (а) и вода-ксилол (б); свободного даларгина (0,7 ммоль/л) на границах вода-воздух (в-1) и вода-ксилол (в-3), смеси даларгина и лизоцима на границе вода-воздух (в-2) и вода-ксилол (в-4).

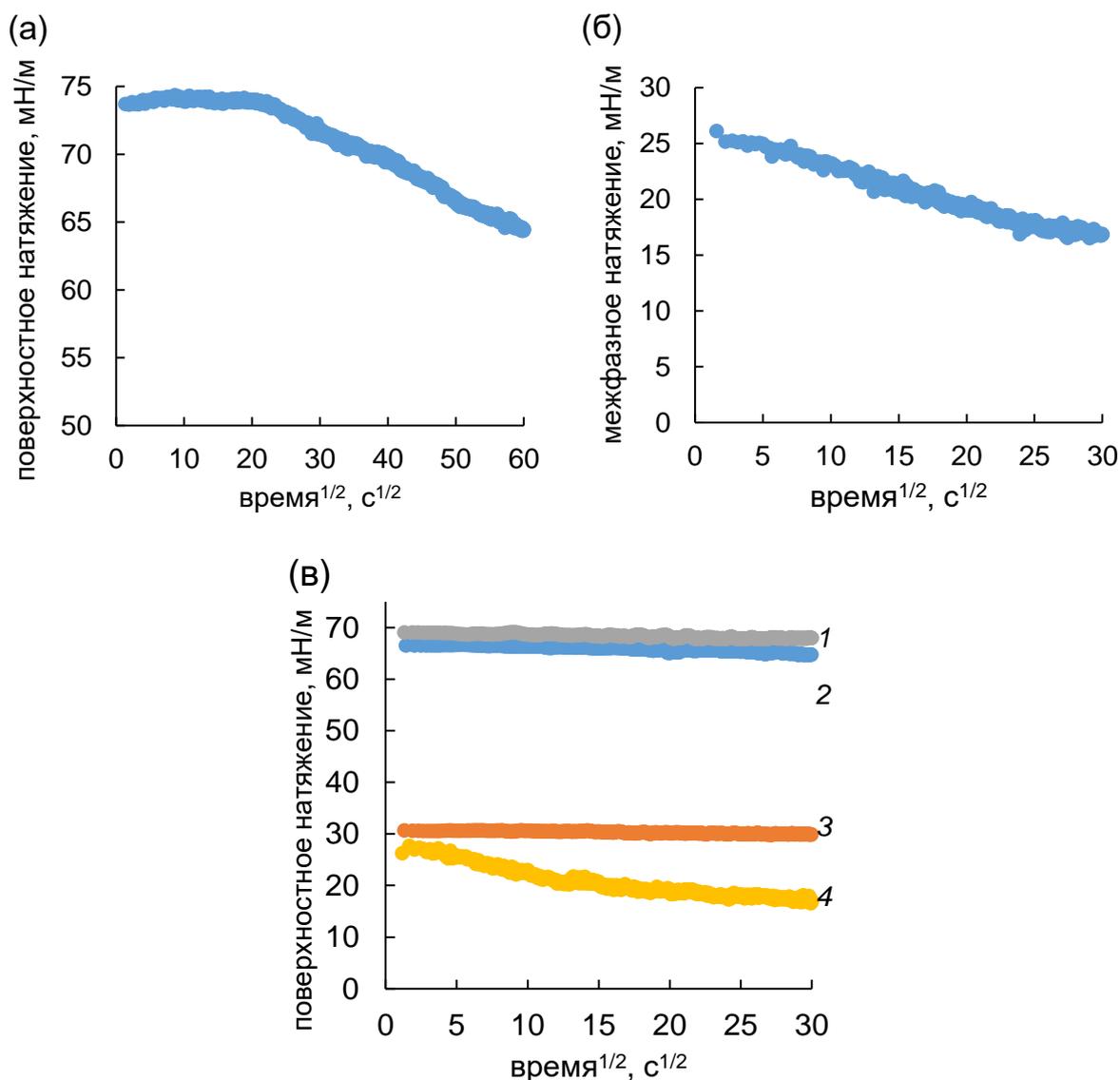


Рис. 26. – Кинетика изменения межфазного натяжения в зависимости от квадратного корня из времени: свободного лизоцима (0,7 мкмоль/л) на границе вода-воздух (а) и вода-ксилол (б); свободного даларгина (0,7 ммоль/л) на границе вода-воздух (в-1) и вода-ксилол (в-3), смеси даларгина и лизоцима на границах вода-воздух (в-2) и вода-ксилол (в-4).

На границе вода-воздух кинетика межфазного натяжения близка к кинетике свободного пептида (Рис. 25-26). На границе раздела вода-*n*-ксилол кинетика изменения межфазного натяжения близка к кинетике свободного белка (Рис. 25-26). Однако наклон выше, чем для чистого лизоцима, и увеличивается с увеличением концентрации пептида до двух раз, когда концентрация даларгина достигает 0,7 ммоль/л. Возможно, одновременно имеет место как образование комплекса лизоцим-даларгин, так и образование поверхностной жидко-расширенной фазы. Полученные результаты можно объяснить изменением конформации белка на границе с органической жидкостью.

Можно предположить, что на границе вода-ксилол, как и на границе вода-толуол, происходит сольватация адсорбированного белка молекулами органической фазы, которая снижает Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия между неполярными боковыми цепями, тем самым вызывая большее разворачивание белка [297]. Несвернутый белок занимает поверхность раздела и не может быть заменен даларгином.

С помощью модели, предложенной Файнерманом и соавторами [100,298], с использованием уравнения (1.15) можно определить параметры межмолекулярного взаимодействия белка и лигандов в адсорбционном слое. При обсчете изотерм поверхностного натяжения использовали следующие параметры для молекулы лизоцима: $\omega_0 = 4,95 \times 10^5$ м²/моль, $\omega_{\min} = 7,72 \times 10^6$ м²/моль, $\omega_{\max} = 2,54 \times 10^7$ м²/моль [100,274]. Двумерное давление определяется из изотерм поверхностного натяжения, параметры заполнения поверхности белком и лигандом определяются с использованием данных, полученных с помощью МСФ. Остальные параметры подбираются эмпирически. Здесь можно отметить, что МСФ позволяет сократить число подбираемых параметров. Полученные параметры для исследуемых ЛС представлены в Таблице 8 [291]⁶. Параметры a свидетельствуют о притяжении между молекулами в поверхностном слое. Результаты описания изотерм по модели Файнермана представлены пунктирными линиями на Рис. 21 (амикацин), штрихпунктирными линиями на Рис. 23 (даларгин).

Таблица 8 – Параметры межмолекулярного взаимодействия между молекулами ЛС и лизоцима

ЛС	Мирамистин	Амикацин	Левифлоксацин	Даларгин
a_p	0,69	0,69	0,69	0,69
a_L	1,50	1,2	1,5	0,8
a_{pL}	0,78	0	0	-0,01

Результат расчета адсорбции мирамистина и лизоцима в составе сложного адсорбционного слоя на границе с воздухом приведен на Рис. 27, амикацина и лизоцима

⁶ При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: M.G. Chernysheva, A.V. Kasperovich, H.S. Skrabkova, A.V. Shnitko, A.M. Arutyunyan, G.A. Badun Lysozyme-dalargin self-organization at the aqueous-air and liquid-liquid interfaces // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2021, V. 202. Art # 111695 (Импакт-фактор 5.999), 20%

– на Рис. 28, левофлоксацина и лизоцима – на Рис. 29, даларгина и лизоцима – на Рис. 30. Покрытие поверхности даларгином, при его концентрации 0,7 ммоль/л, превышает поверхностное покрытие лизоцима, что согласуется с данными кинетики изменения межфазного натяжения (Рис. 25-26). Поэтому в данном случае даларгин действует как поверхностно-активное вещество.

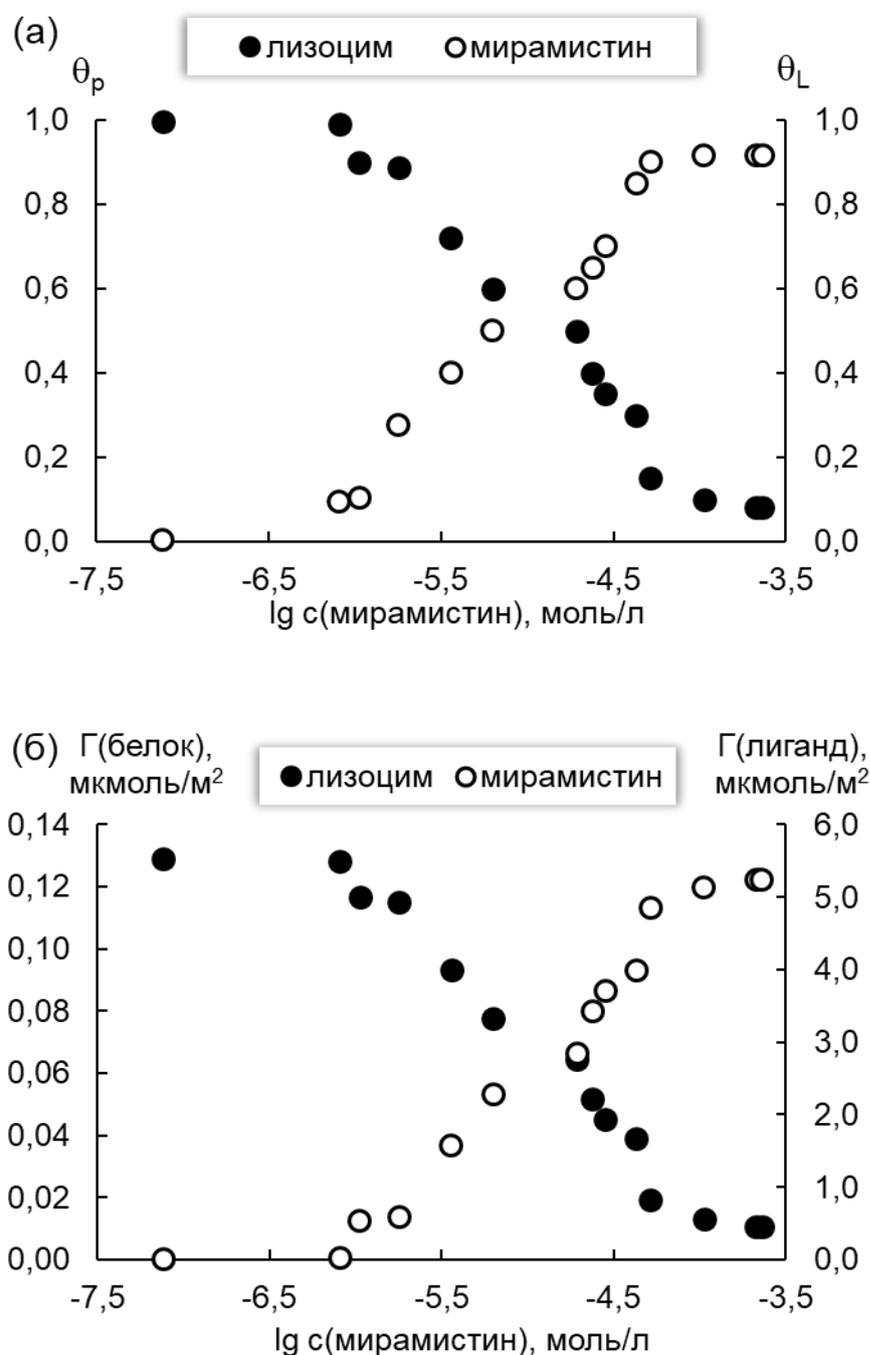


Рис. 27. – Зависимости заполнения ($\theta = \Gamma\omega$) (а) смешенного адсорбционного слоя и рассчитанной адсорбции (б) на границе раздела PBS - воздух лизоцимом и мирамистином

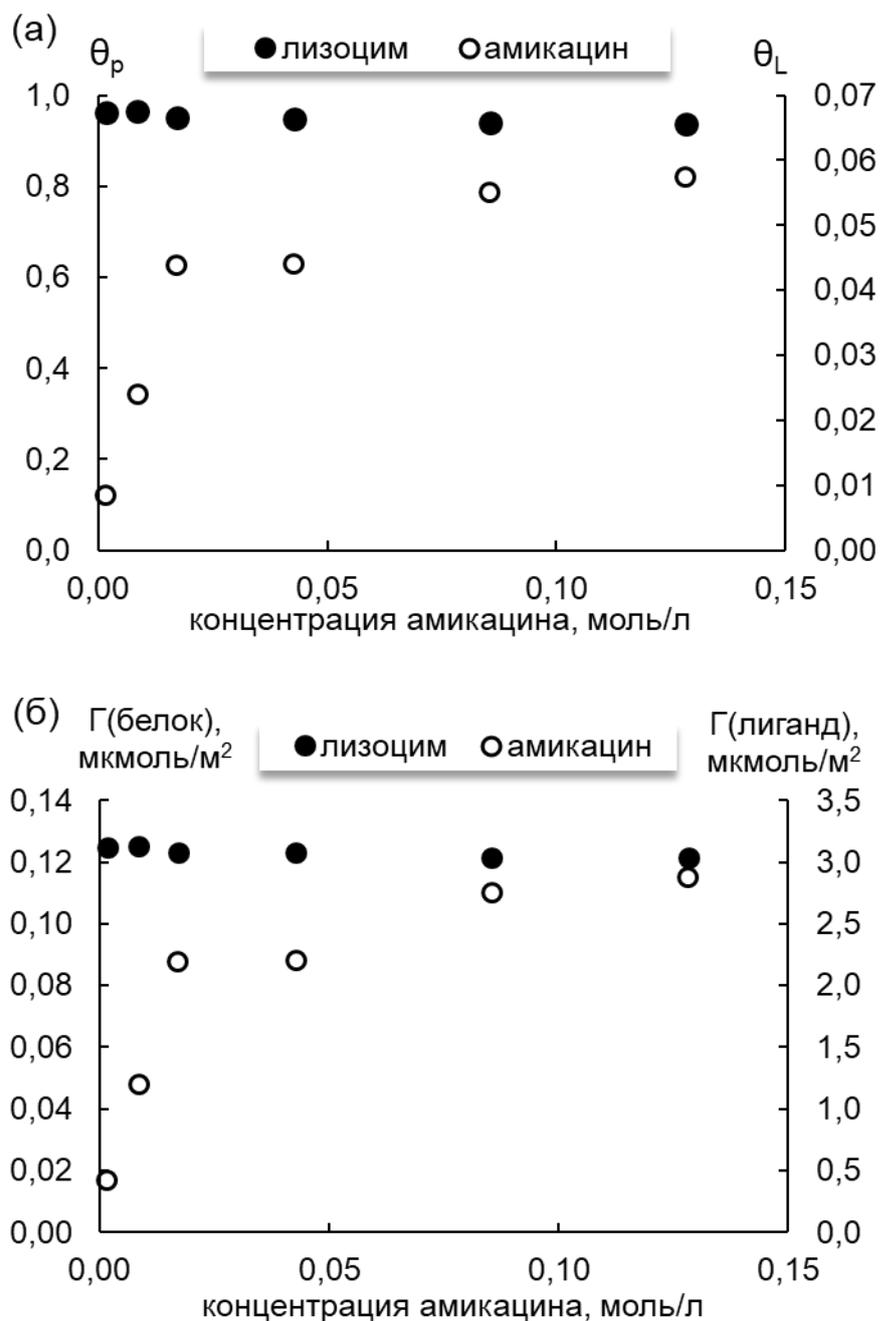


Рис. 28. – Зависимости заполнения ($\theta = \Gamma\omega$) (а) смешенного адсорбционного слоя и рассчитанной адсорбции (б) на границе раздела PBS - воздух лизоцимом и амикацином

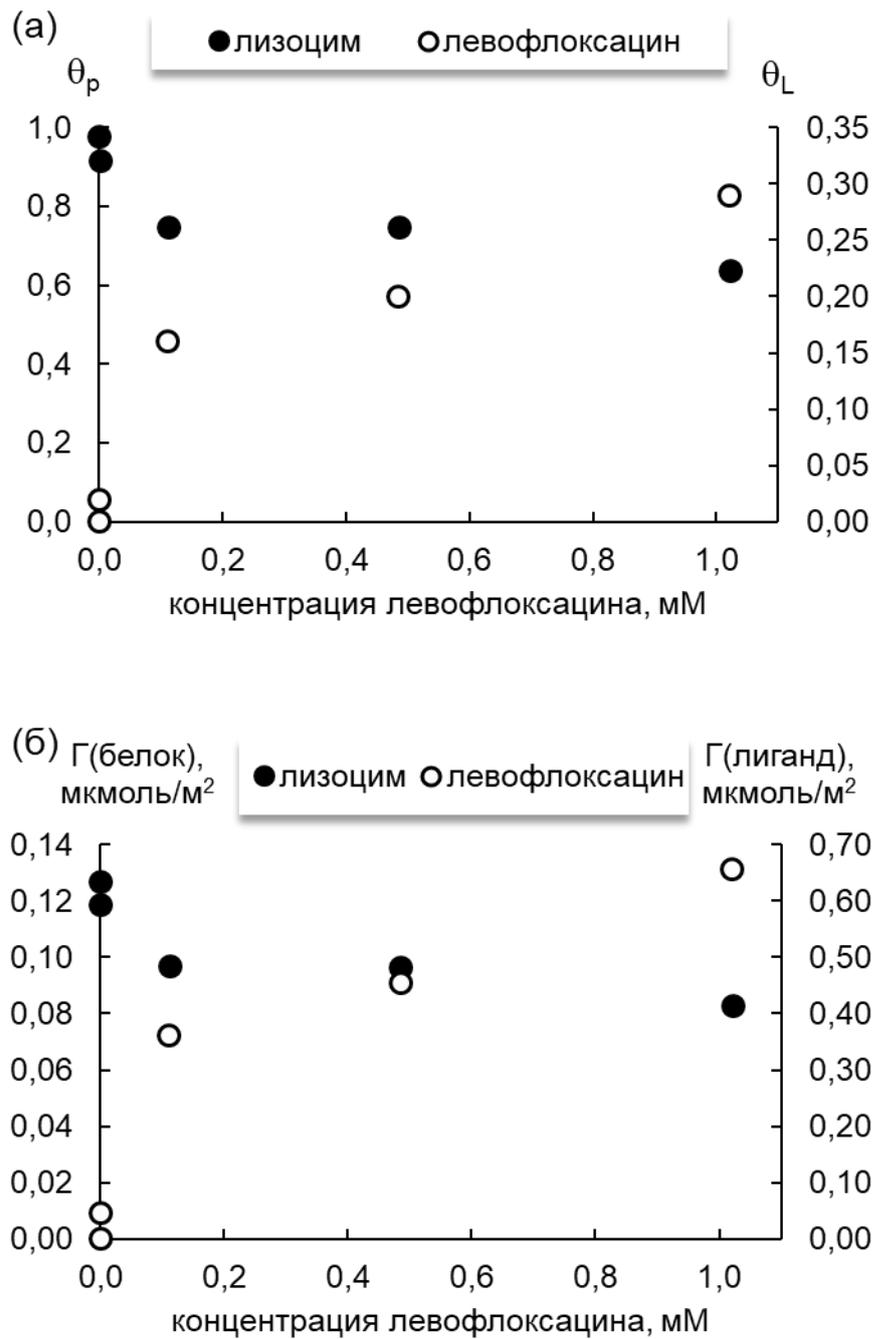


Рис. 29. – Зависимости заполнения ($\theta = \Gamma\omega$) (а) смешенного адсорбционного слоя и рассчитанной адсорбции (б) на границе раздела PBS - воздух лизоцимом и левофлоксацином

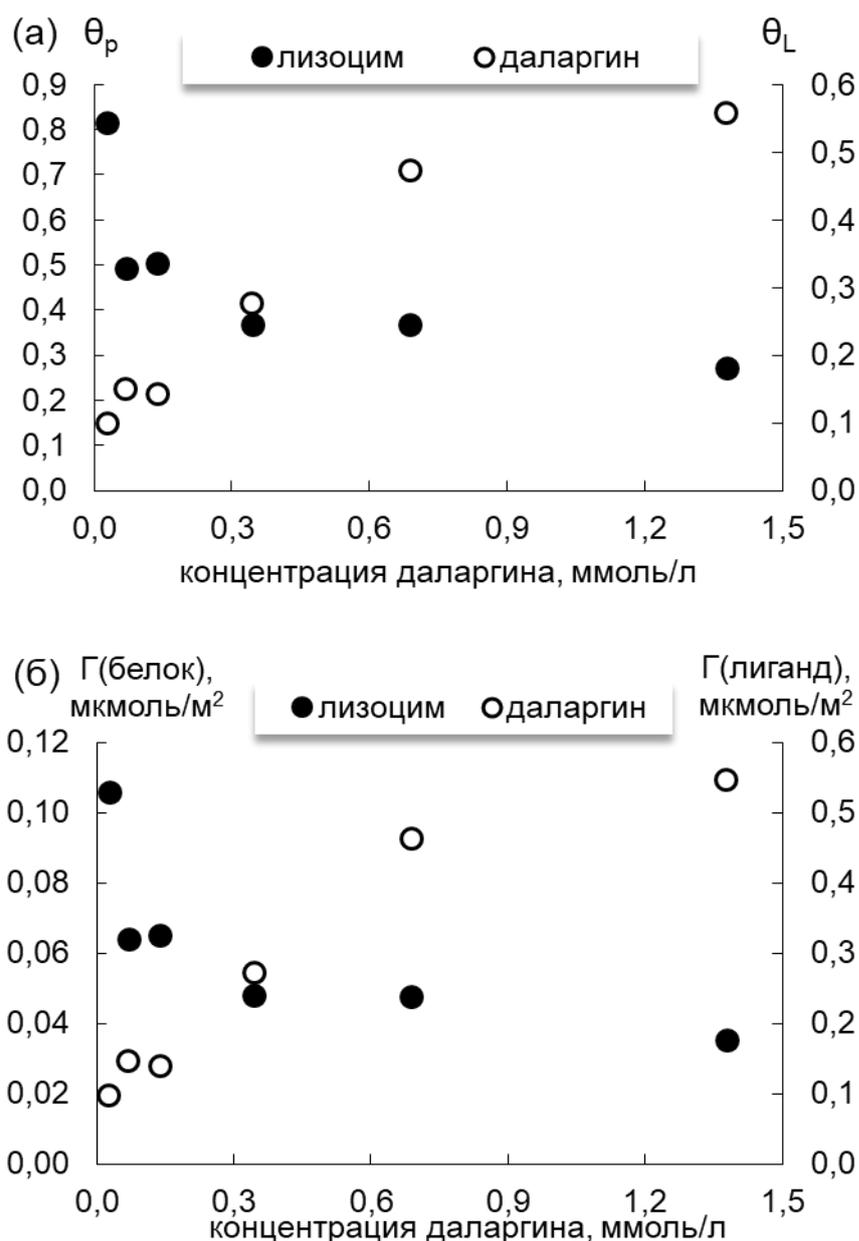


Рис. 30. – Зависимости заполнения ($\theta = \Gamma\omega$) (а) смешенного адсорбционного слоя и рассчитанной адсорбции (б) на границе раздела PBS - воздух лизоцимом и далааргином

Таким образом, использование меченных тритием соединений в варианте МСФ в сочетании с данными, полученными с помощью тензиометрии, позволяет описывать смешанные адсорбционные слои, как для границы PBS – ксилол, так и для границы PBS – воздух. Описание смешанной адсорбции с помощью модели Файнермана до этого использовалось только в отношении смесей белков и ПАВ [111,127], однако в данной работе модель успешно применена для смесей лизоцима и ЛС различной химической природы, в том числе не обладающих поверхностно-активными свойствами на границе раздела с воздухом. Включение ЛС в состав смешанных адсорбционных слоев с лизоцимом может быть связано с образованием комплексов ЛС-белок.

3.3. ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ ЛИЗОЦИМ-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО С ПОМОЩЬЮ АТОМАРНОГО ТРИТИЯ

Тритиевая планиграфия позволяет получить информацию о доступной поверхности белка, которая позволяет попытаться реконструировать трехмерную структуру белка по экспериментальным данным о доступности остатков для мечения [248,250]. Метод тритиевой планиграфии позволил определить структурные особенности лизоцима в смешанном адсорбционном слое с ионогенными [248] и неионогенными ПАВ [249,250].

В реакцию с атомами трития вступает тонкий поверхностный слой мишени, поэтому для исследования структуры адсорбционных слоев водный раствор вещества наносится на стенки реакционного сосуда, выдерживается для формирования адсорбционного слоя и быстро замораживается. Для определения контактов между лизоцимом и ЛС в составе комплекса требуется другой методический подход, который был впервые опробован в данной работе. Исследуемые растворы смесей лизоцима с ЛС выдерживали в течение 24 часов, затем наносили на стенки реакционного сосуда, сразу замораживали и подвергали лиофильной сушке, после чего вакуумировали и обрабатывали атомарным тритием.

Так как для последующего анализа требуется работать с долями миллиграмма лизоцима, в работе использовали раствор лизоцима с концентрацией 35 мкмоль/л, а также его эквимольные смеси с ЛС. При такой концентрации лизоцима проводили ранее исследования его адсорбционных слоев с ионогенными [248] и неионогенными ПАВ [249,250]. При такой концентрации молекулы лизоцима ориентированы перпендикулярно межфазной границе вода/воздух и образуют плотный адсорбционный слой [120]. Данный подход неприменим для смеси лизоцим-даларгин, потому что трудно провести разделение лизоцима и даларгина после введения трития, и при определении удельной радиоактивности аминокислот нельзя выделить вклад аминокислотных остатков даларгина.

После обработки атомами трития лизоцима и смеси лизоцима с ЛС перед анализом проводили очистку меченых соединений, которая включала следующие стадии работы: (1) сбор продукта, (2) лиофилизация и последующее растворение, (3) очистка с помощью равновесного диализа против PBS или мембранной фильтрации, (4) тотальный гидролиз

с последующим определением радиоактивности полученных аминокислот в результате аминокислотного анализа. Кроме того, часть препарата подвергли ферментативному гидролизу с получением пептидов, которые разделили с помощью ВЭЖХ и определили их радиоактивность.

Изменение радиоактивности препаратов для двух серий экспериментов (обработка атомами трития замороженных растворов и лиофилизированных препаратов) в процессе работы представлены в Таблице 9.

Таблица 9 – Радиоактивность препаратов лизоцима на различных стадиях работы

Способ приготовления мишени	Замороженные растворы				Лиофилизированные препараты			
	Активность вещества на стадиях работы							
Мишень	A ₁ , мКи	A ₂ , мКи	A ₃ , мкКи	A ₄ , мкКи	A ₁ , мКи	A ₂ , мКи	A ₃ , мкКи	A ₄ , мкКи
лизоцим	22,8	0,42	14,1	-	8,8	2,27	292	155
+ амикацин	13,8	0,012	2,3	-	12,0	2,68	245	161
+ левофлоксацин	18,0	0,029	8,4	2,0	8,9	3,01	252	177
+ мирамистин	21,5	0,44	42,8	5,1	9,9	2,92	213	203

Примечание. Индекс *x* у символа A_{*x*} означает этап работы, согласно описанию в тексте.

Для замороженных растворов начальная радиоактивность оказалась выше, но значительная часть трития оказалась в лабильной форме и была удалена после лиофилизации. Слишком низкая удельная радиоактивность лизоцима не позволила достоверно определить влияние ЛС на распределение трития по типам аминокислотных остатков. В результате удаления воды лиофилизацией удалось увеличить удельную радиоактивность лизоцима до 2-3 Ки/ммоль, что позволило надежно определить распределение трития по аминокислотным остаткам и сопоставить результаты для комплексов с тремя веществами.

При кислотном гидролизе аминокислоты Thr и Cys разрушаются, Asn превращается в Asp, Gln превращается в Glu. При проведении аминокислотного анализа не удалось надежно разделить пики радиоактивности для аминокислот Asp, Thr, Ser, Glu. Поэтому были получены данные для 12 типов аминокислот и суммарная информация для Asp, Asn, Thr, Ser, Glu, Gln.

Распределение трития в аминокислотных остатках лизоцима представлено на Рис. 31 в виде долей от общей радиоактивности белка [250], которые были рассчитаны по уравнению:

$$\psi, \% = \frac{a_i \cdot n_i}{\sum_{i=1}^n a_i \cdot n_i} \cdot 100, \quad (3.13)$$

Где a_i – молярная радиоактивность i -того аминокислотного остатка, а n_i – количество i -того аминокислотного остатка в глобуле белка. На Рис. 32 представлено распределение трития в аминокислотных остатках лизоцима в присутствии ЛС относительно распределения в чистом лизоциме.

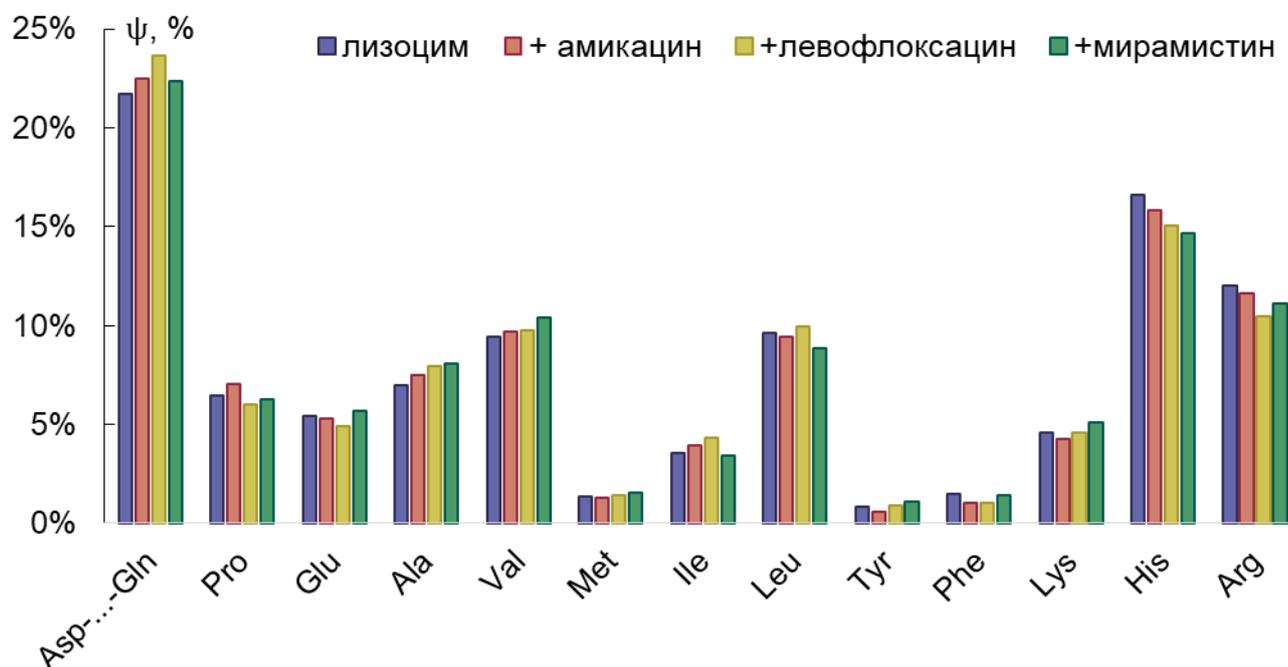


Рис. 31. – Распределение трития в аминокислотных остатках лизоцима без добавок и в присутствии ЛС.

Оказалось, что лизоцим в составе комплекса с ЛС имеет более высокую радиоактивность как по отдельным типам остатков, так и для всего белка в целом, что кажется на первый взгляд необычным. Распределение трития по типам аминокислотных остатков оказалось близким, что означает, что, во-первых, не происходит существенной денатурации белка в составе комплекса, а во-вторых, площадь контакта белок-лиганд не столь велика, чтобы обнаружить различие по анализу тотального гидролизата.

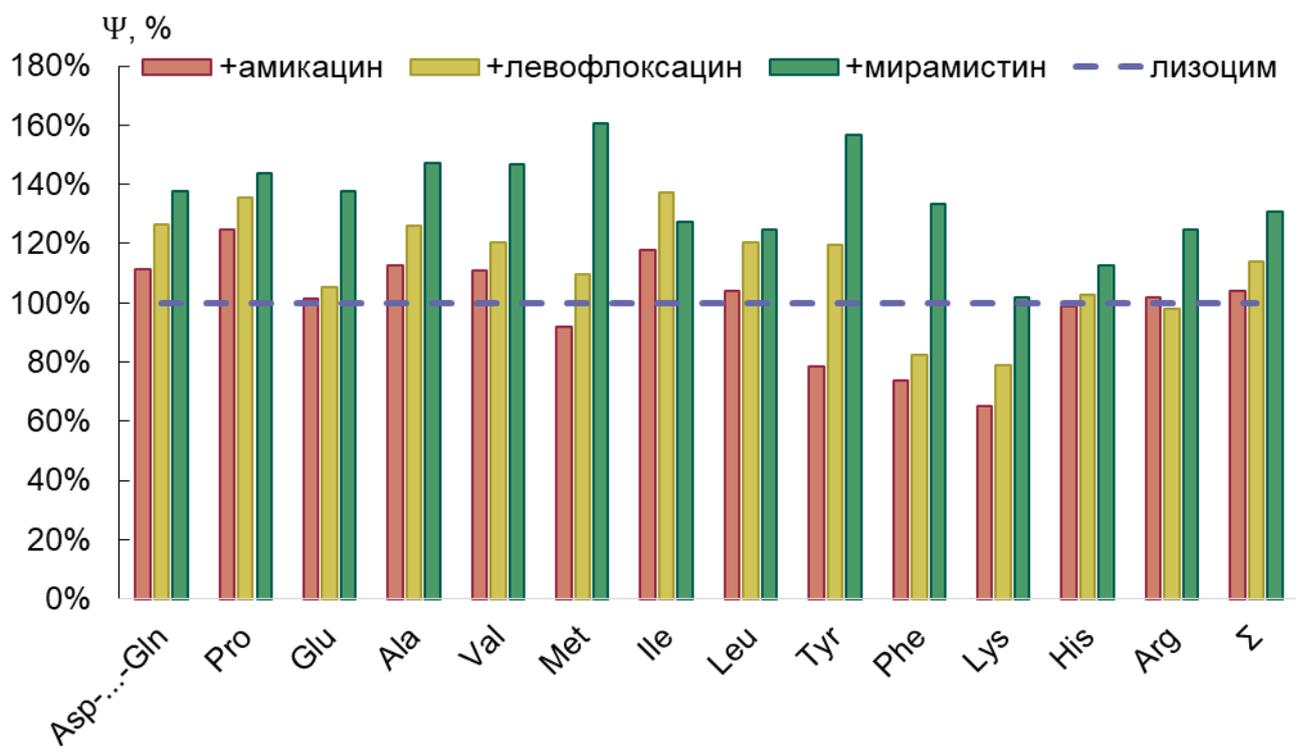


Рис. 32. – Относительное изменение радиоактивности аминокислот лизоцима в присутствии ЛС (за 100 % принята радиоактивность аминокислот в лизоциме без добавок).

В соответствии с пространственным распределением аминокислотных остатков в глобуле лизоцима (Рис. 33) можно сопоставить изменение радиоактивности двух аминокислот - пролина и фенилаланина [250], которые локализованы на определенных участках молекулы (Таблица 10). В присутствии амикацина и левофлоксацина отношение активности фенилаланина к пролину снижается практически в 2 раза. Можно предположить, что при образовании комплекса лизоцима с амикацином и левофлоксацином происходит частичная экранировка фенилаланина. Комплекс с мирамистином не затрагивает этот участок белка. Исходя из полученных результатов можно предположить, что в комплексе с мирамистином конформация лизоцима практически не изменяется.

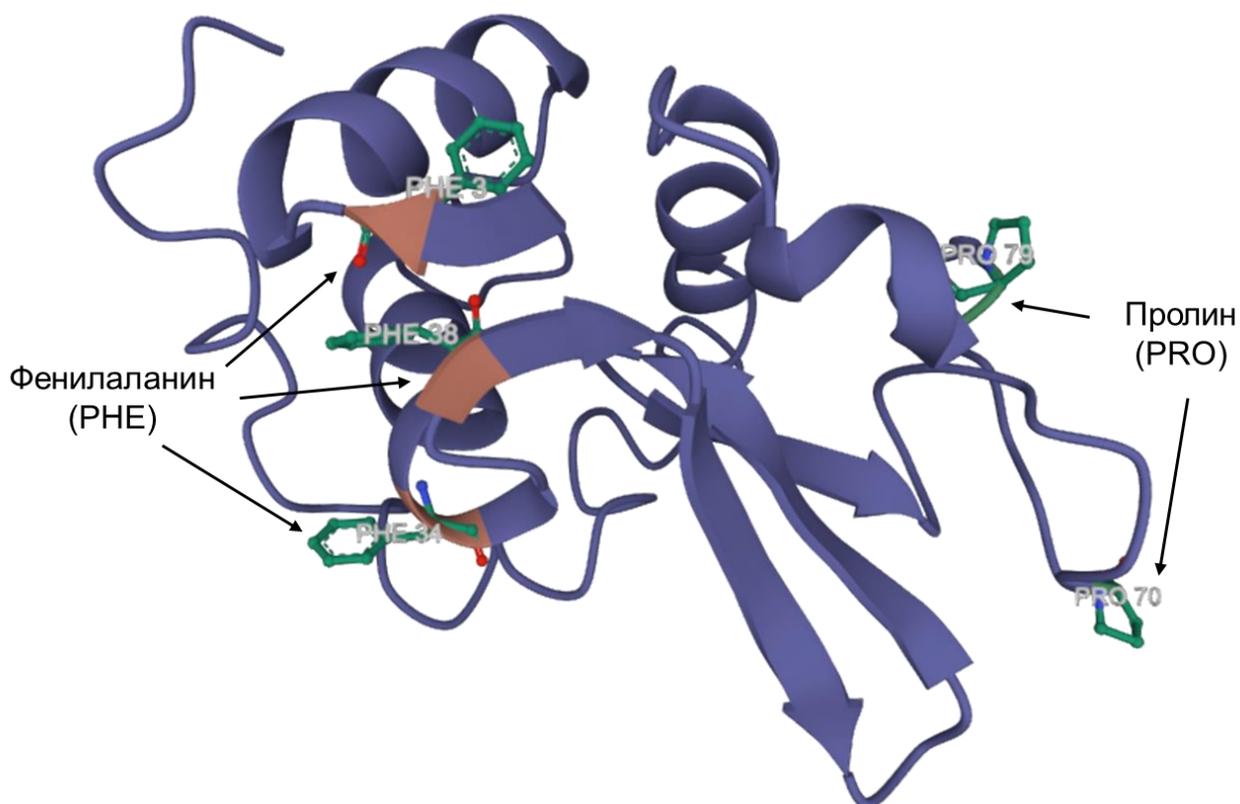


Рис. 33. – Положение аминокислотных остатков фенилаланина и пролина в лизоциме (PDB: 6LYZ).

Таблица 10 – Отношение удельной радиоактивности $A_{\text{Phe}}/A_{\text{Pro}}$

Мишень	$A_{\text{Phe}}/A_{\text{Pro}}$	$A_{\text{Phe}}/A_{\text{Pro}}^*$
Лизоцим	0,30	0,40
+ амикацин	0,18	0,24
+ левофлоксацин	0,18	0,24
+ мирамистин	0,28	0,37

*С учетом нормировочных коэффициентов [247], характеризующих способность аминокислотных остатков взаимодействовать с атомарным тритием

Увеличение радиоактивности лизоцима в составе комплекса можно объяснить следующим образом. Молекулы лизоцима способны взаимодействовать между собой в растворе с образованием димеров. При лиофилизации раствора лизоцима межмолекулярные взаимодействия приводят к образованию плотно упакованных слоев молекул, и атомарный тритий вступает в реакцию только с поверхностными участками белка. При образовании комплекса лиганд безусловно частично экранирует поверхность белка, но плотность упаковки молекул лизоцима при этом может снижаться. В результате

атомы трития способны проникать в пространство между молекулами без потери реакционной способности, что, по сути, повышает доступность поверхности лизоцима атомам трития и увеличивает его радиоактивность. Схематично расположение молекул лизоцима в отсутствие ЛС и лизоцима в присутствии мирамистина в мишени и зона реакции с атомарным тритием изображено на Рис. 34. Места контактов белок-белок и белок-лиганд можно определить, если провести определение радиоактивности всех индивидуальных аминокислотных остатков лизоцима или хотя бы отдельных фрагментов белка (пептидов) после его ферментативного гидролиза.

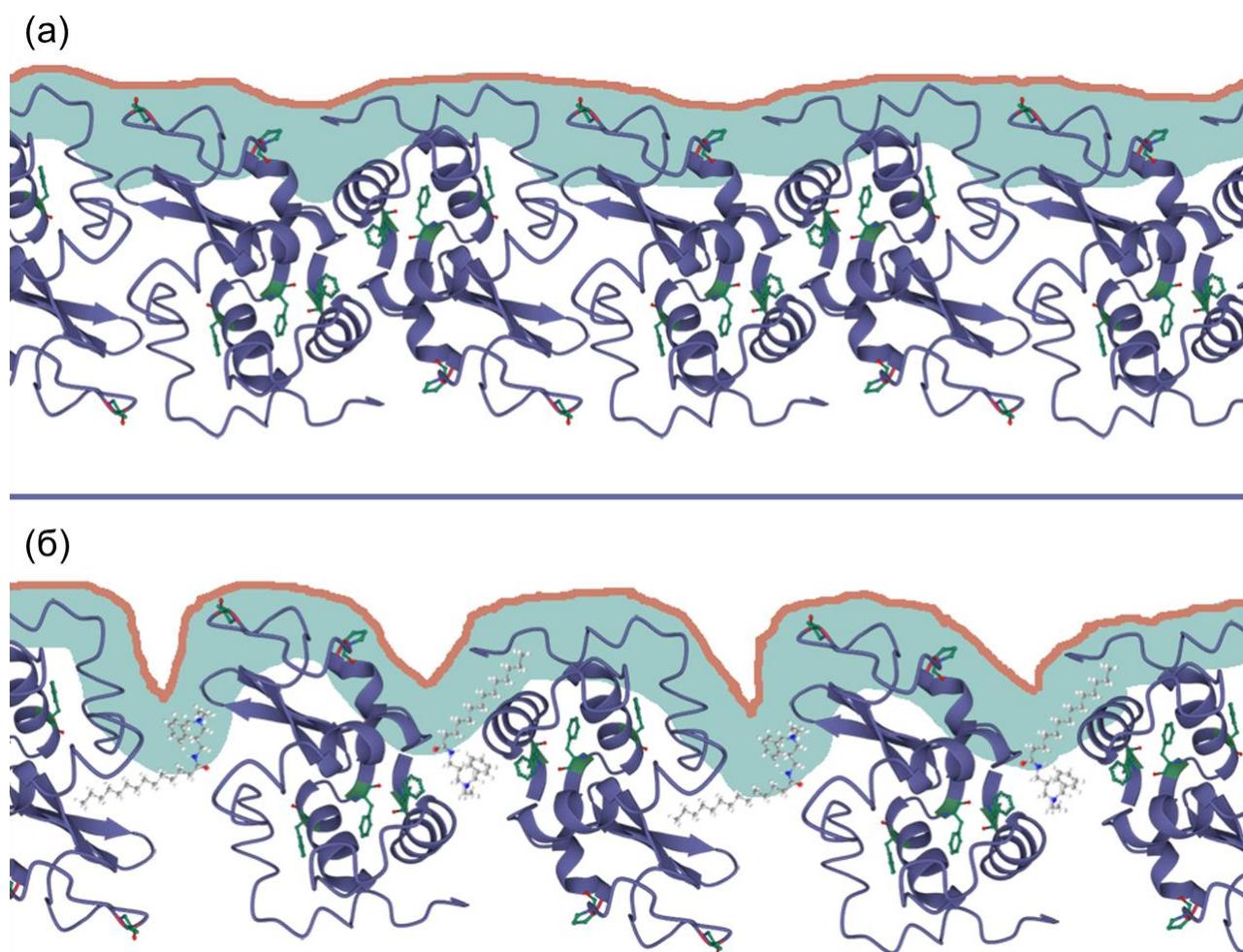


Рис. 34. – Зона реакции белка с атомарным тритием: (а) лизоцим в отсутствие ЛС, (б) лизоцим с мирамистином.

Для определения положения связывания лизоцима с ЛС в объеме раствора часть препаратов, оставшуюся после обработки атомами трития лиофильно-высушенных смесей лизоцима с мирамистином, амикацином и левофлоксацином и их очистки, подвергали трипсинолизу согласно методике, приведенной в работе [246]. В результате трипсинолиза лизоцима образуется 17 пептидов [299], которые разделяли с помощью

ВЭЖХ с анализом их радиоактивности. По величине отношения массы к заряду (m/z) с помощью ВЭЖХ-МС удалось точно идентифицировать 7 пептидов (Val2-Arg5, Cys6-Lys13, His15-Arg21, Phe34-Arg45, Asn46-Arg61, Thr69-Arg73, Gly117-Arg125), которые выделены цветом на Рис. 35. Изменение радиоактивности пептидов в единицах, нормированных на радиоактивность в анализе показано на Рис. 36.

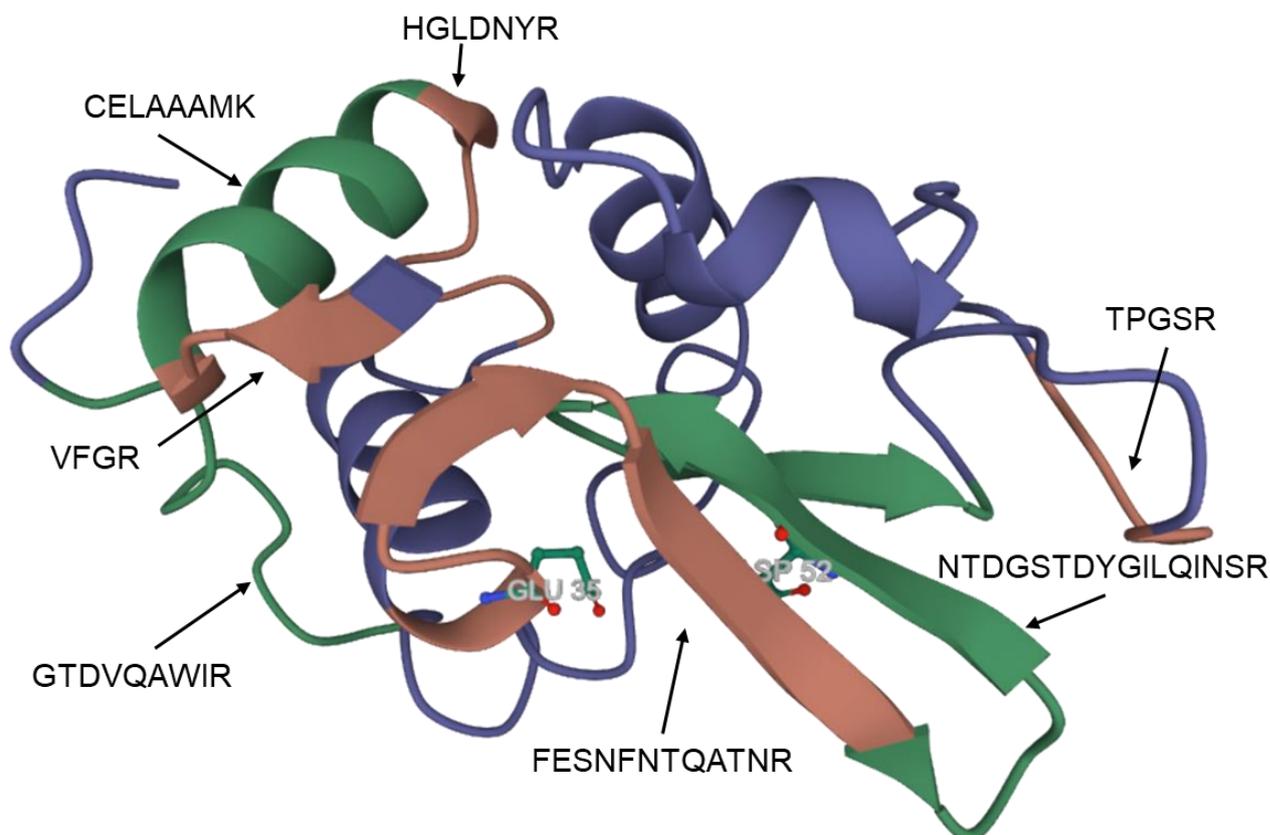


Рис. 35. – Расположение пептидов в лизоциме (PDB: 6LYZ).

Несмотря на то, что общая удельная активность лизоцима в присутствии мирамистина увеличилась на 30 % (Таблица 9), радиоактивность всех обнаруженных пептидов снизилась, кроме TPGSR, радиоактивность которого увеличилась практически в два раза. Так как в обнаруженные пептиды входит всего 61 аминокислота из 129, то, вероятно, увеличение удельной радиоактивности лизоцима в присутствии мирамистина связано с увеличением радиоактивности аминокислот, положение которых мы не можем определить при пептидном анализе.

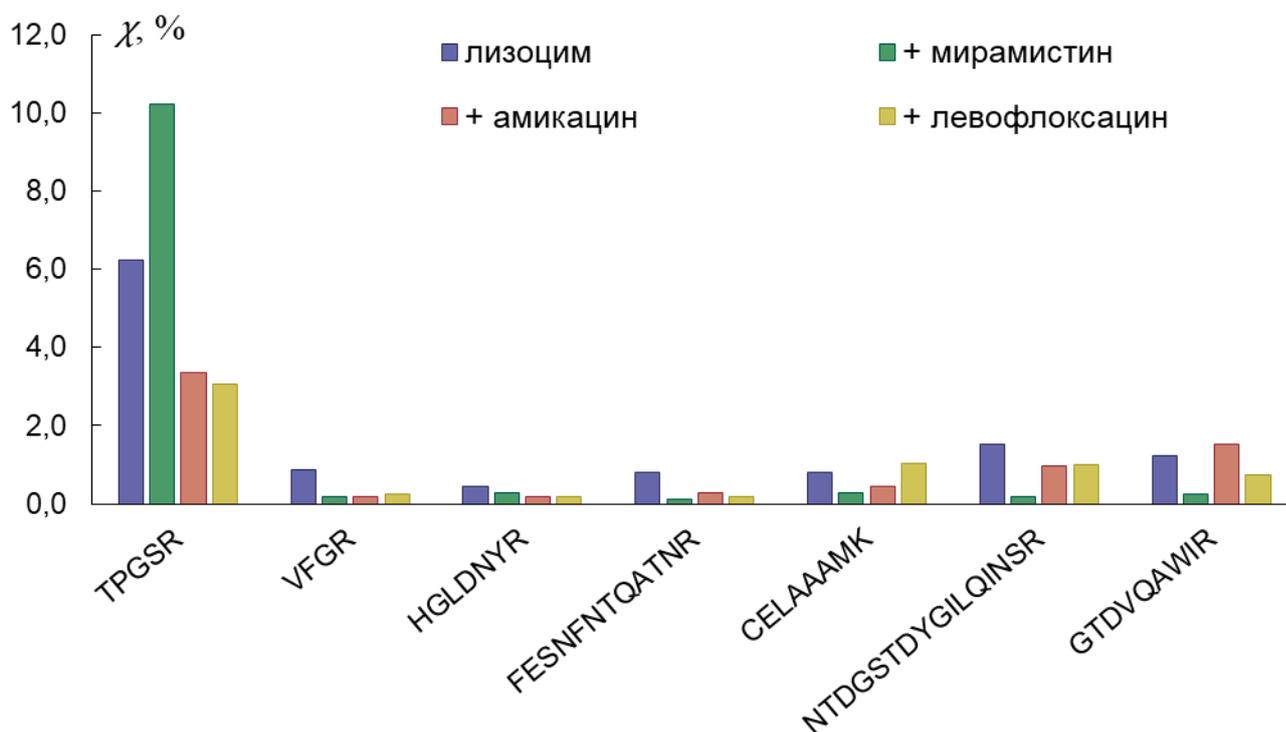


Рис. 36. – Радиоактивность пептидов, которые были обнаружены с помощью ВЭЖХ-МС после трипсинолиза, нормированная на радиоактивность в анализе.

В присутствии амикацина и левофлоксацина значительно снизилась радиоактивность четырех пептидов: TPGSR, VFGR, HGLDNYR и FESNFNTQATNR на Рис. 35 показаны розовым цветом, при этом пептид FESNFNTQATNR содержит аминокислотный остаток Glu35 – один из остатков активного центра фермента [49]. Данные, полученные при пептидном анализе, позволили определить положения контактов, что в дальнейшем было подтверждено с помощью молекулярного докинга.

3.4. ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ С ЛЕКАРСТВЕННЫМИ СРЕДСТВАМИ НА СТРУКТУРУ И ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛИЗОЦИМА

Для выявления влияния ЛС на структуру лизоцима при образовании комплекса лизоцим-ЛС были проведены спектральные измерения и определена ферментативная активность лизоцима в присутствии ЛС. Спектроскопия кругового дихроизма позволяет выявить возможные структурные изменения лизоцима при образовании комплекса с ЛС.

КД-спектры представлены на Рис. 37 [280,291]⁷. Ионы хлора сильно поглощают при длинах волн ниже 195 нм, поэтому для предотвращения сильного УФ-поглощения при малых длинах волн ионами хлора [96] растворы готовили без добавления хлорида натрия. Поскольку NaCl может влиять на прямые электростатические взаимодействия между лизоцимом и лигандом, то результаты напрямую не применимы к буферной солевой системе [300]. Однако результаты могут показать некоторые изменения вторичной структуры белка в присутствии лигандов.

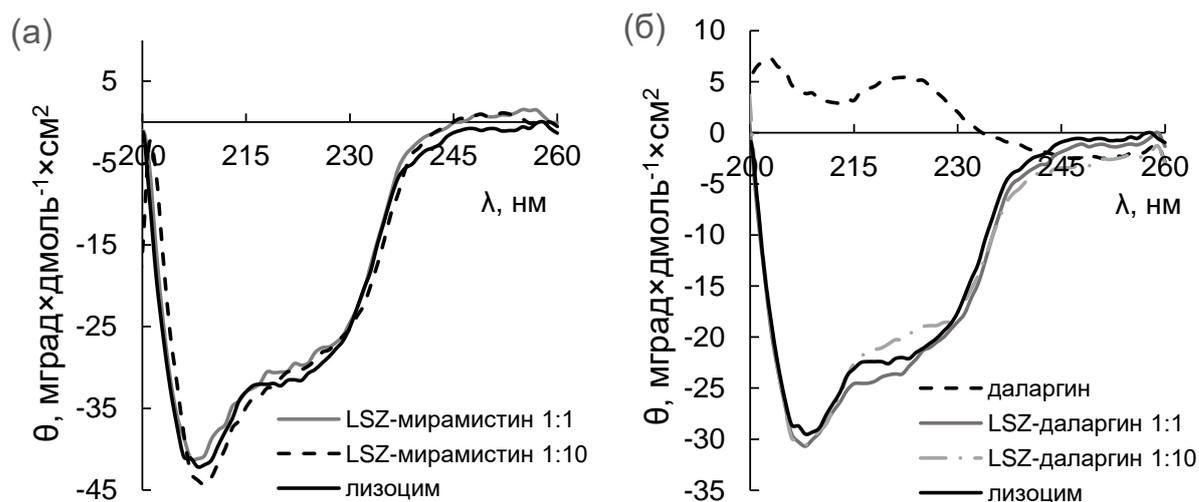


Рис. 37. – Спектры КД лизоцима в присутствии ЛС: (а) мирамистина, (б) даларгина.

Присутствие даже десятикратного избытка мирамистина не влияет на вторичную структуру лизоцима. Во всех случаях в спектрах КД в дальней УФ области наблюдалось два минимума: при 280 нм и около 224 нм, что показывает конформационную стабильность лизоцима в составе комплекса с мирамистином [48,301].

В составе даларгина аланин присутствует в форме d-изомера, в то время как остальные аминокислоты находятся в l-форме, поэтому на спектре КД свободного даларгина виден максимум в области 220 нм [302]. На основании данных МСФ и тензиометрии можно предположить, что в системе происходит образование агрегатов даларгина. При исследовании агрегации пептидов [303] на спектрах КД пяти- и девятичленных пептидов были обнаружены положительный максимум при 200 нм и

⁷ При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: Н.С. Skrabkova, М.Г. Chernysheva, А.М. Arutyunyan, G.A. Badun Complex of lysozyme and Myramistin: formation and adsorption at the water-xylene interface // Mendeleev Communications. 2020. V. 30, № 5. P. 645–646. (Импакт-фактор 1,837), 25%; М.Г. Chernysheva, А.В. Kasperovich, Н.С. Skrabkova, А.В. Shnitko, А.М. Arutyunyan, G.A. Badun Lysozyme-dalargin self-organization at the aqueous-air and liquid-liquid interfaces // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2021, V. 202. Art # 111695 (Импакт-фактор 5.999), 20%

отрицательный максимум при 215 нм, что служит отчетливой характеристикой образования β -листов. Отметим, что спектр КД даларгина регистрировали при концентрации 70 мкмоль/л. Поэтому можно ожидать присутствия агрегатов как в растворе, так и на границах раздела в диапазоне концентраций, используемых в адсорбционных экспериментах.

Из спектров КД можно увидеть, что в присутствии даларгина происходят небольшие изменения вторичной структуры лизоцима. Спектр КД лизоцима показывает две отрицательные полосы примерно при 207 и 220 нм, которые соответствуют α -спирали. Изменения в структуре α -спирали белка индуцируются связыванием пептида [304]. Происходят изменения в интенсивности отрицательных полос при 207 и 220 нм при добавлении даларгина, которые зависят от молярного соотношения лизоцим-даларгин.

Собственная флуоресценция лизоцима возникает за счет аминокислотных остатков Trp-62 и Trp-108 с максимумом эмиссии при длине волны 344 нм (Рис. 38а). Мирамистин и амикацин не обладают собственной флуоресценцией. Эмиссия левофлоксацина не оказывает влияния на регистрацию максимума флуоресценции лизоцима, пик эмиссии левофлоксацина начинается с 370 нм, а максимум выходит за границы регистрируемого диапазона спектра эмиссии (Рис. 38а). Даларгин обладает собственной флуоресценцией за счет аминокислотных остатков тирозина с максимумом эмиссии при 306 нм (Рис. 38б). Спектры флуоресценции лизоцима в присутствии ЛС приведены на Рис. 39, представлена относительная интенсивность флуоресценции ($F/F_{\max} \times 100\%$, где F_{\max} – максимальная интенсивность флуоресценции лизоцима в отсутствие ЛС).

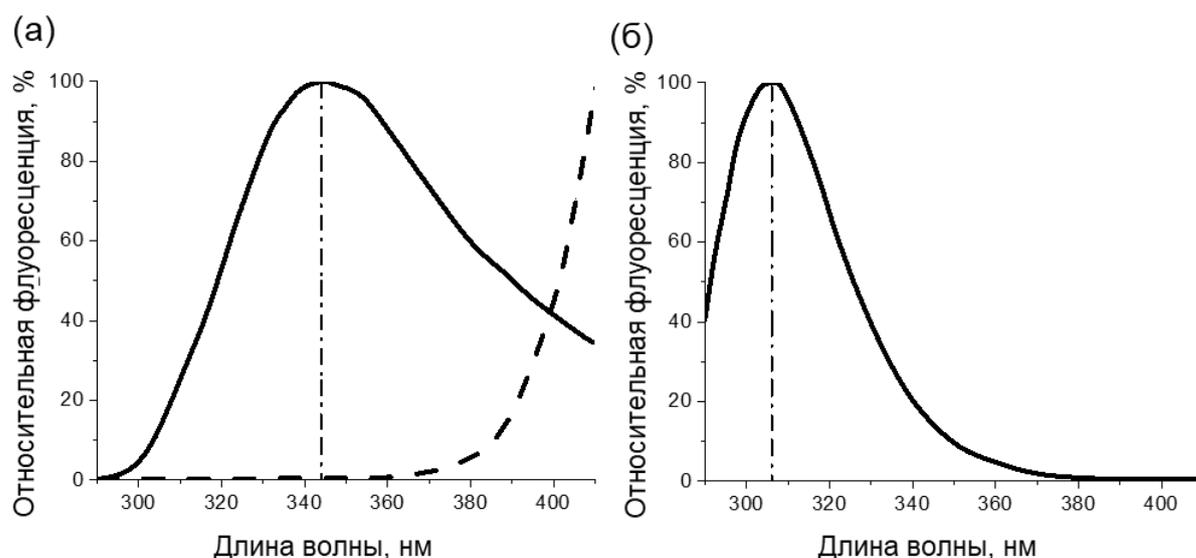


Рис. 38. – Спектр флуоресценции а) лизоцима – сплошная линия, левофлоксацина – пунктирная линия; б) даларгина.

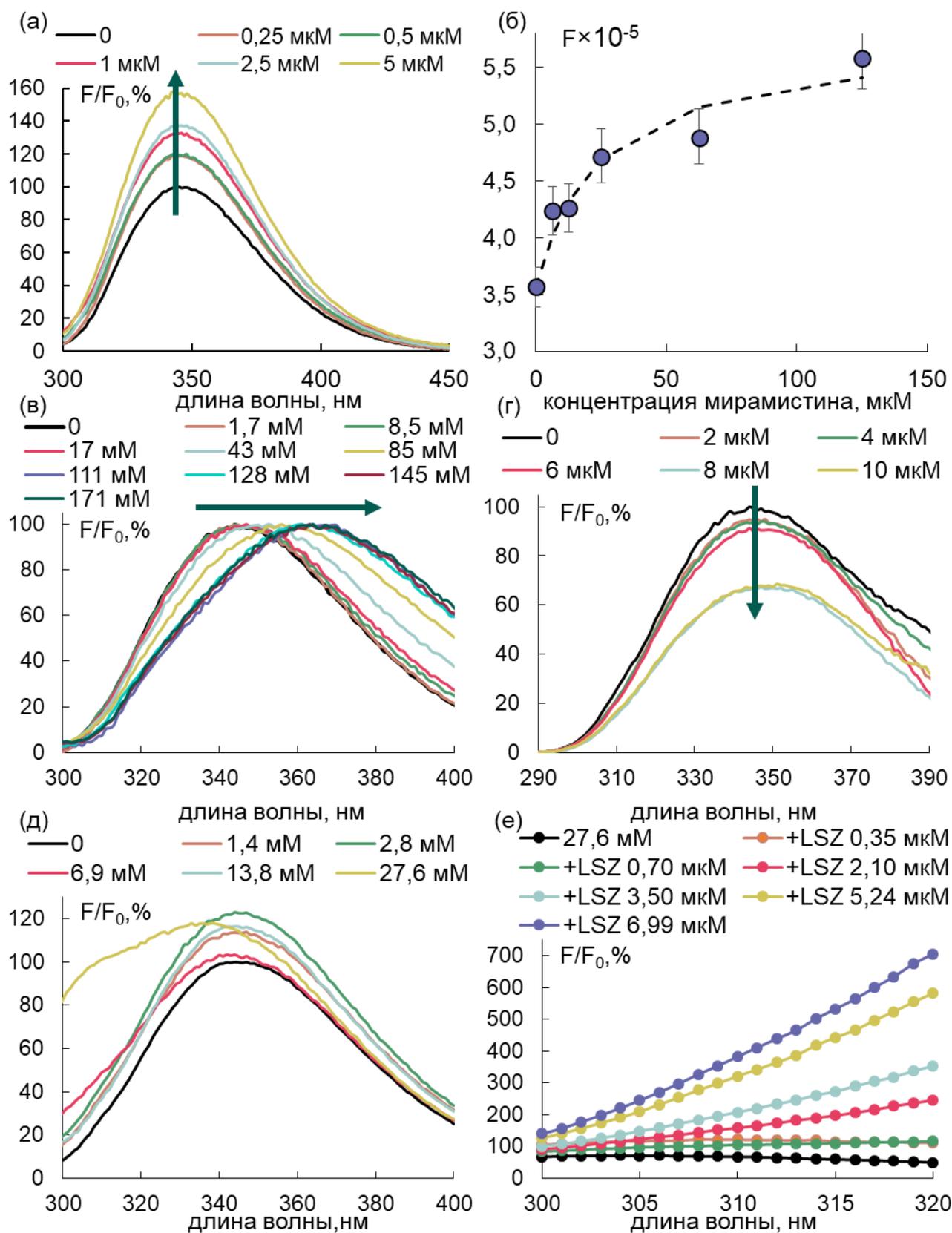


Рис. 39. – Спектры интенсивности флуоресценции лизоцима в присутствии ЛС: (а) мирамистин, (в) амикацин, (г) левофлоксацин, (д) даларгин. (б) Зависимость максимальной интенсивности флуоресценции лизоцима от концентрации мирамистина. Пунктирной линией показан расчет по уравнению (1.5) (д) Спектры интенсивности флуоресценции даларгина в присутствии лизоцима.

С увеличением концентрации мирамистина происходит увеличение флуоресценции лизоцима (Рис. 39), которое достигает 160 % что свидетельствует об изменении окружения аминокислотных остатков триптофана в белковой глобуле при образовании комплекса лизоцим-мирамистин.

Для определения константы связывания лизоцима с мирамистином предположили, что происходит обратимое связывание мирамистина с лизоцимом в отношении 1:1, тогда константу ассоциации можно рассчитать с использованием нелинейного регрессионного анализа методом наименьших квадратов по уравнению (1.5). Рассчитанная константа ассоциации составила $4,25 \times 10^4$ л/моль, с помощью уравнения (1.8) была вычислена энергия Гиббса ($T=289$ К) $\Delta G^\circ = -6,31$ ккал/моль.

Увеличение концентрации амикацина приводит к сдвигу максимума флуоресценции лизоцима в более длинноволновую область (Рис. 39в). Красный сдвиг можно объяснить разворачиванием белковой глобулы, при котором триптофановые остатки в активном центре становятся более открытыми для воды, т.е. переходят в более гидрофильную среду [96].

С ростом концентрации левофлоксацина наблюдается тушение флуоресценции лизоцима (Рис. 39г), которое количественно можно оценить с помощью уравнения Штерна-Фольмера (1.1), рассчитанная константа тушения, представляющая константу равновесия связывания молекул лиганда с белком, составила $(1,8 \pm 0,5) \times 10^4$ л/моль, что согласуется с литературными данными [17].

Константу связывания и количество сайтов взаимодействия левофлоксацина с лизоцимом были рассчитаны по уравнению (1.3): $K_b = (1,1 \pm 0,2) \times 10^7$ л/моль, $n=1,49$, значение свободной энергии Гиббса составило $-(9,6 \pm 0,1)$ ккал/моль (уравнение 1.8).

При концентрации даларгина от 0 до 13,8 ммоль/л максимум флуоресценции соответствует максимуму флуоресценции чистого лизоцима и составляет 344 нм (Рис. 39д). Увеличение флуоресценции лизоцима свидетельствует об увеличении полярности микроокружения остатков триптофана из-за образования гидрофобных комплексов. При концентрации даларгина 27,6 ммоль/л происходит смещения максимума в коротковолновую область и наложение спектров даларгина и лизоцима друг на друга. Повышение концентрации пептида приводит к полному перекрытию спектров флуоресценции, и флуоресценция лизоцима полностью исчезает под флуоресценцией даларгина.

Регистрация спектров флуоресценции с фиксированной концентрацией даларгина (28 ммоль/л) и переменной концентрацией белка (от 0,35 до 7,0 мкмоль/л) (Рис. 39е) позволила определить константу ассоциации по уравнению Бенези-Хильдебранда (1.4). Так как в нашем случае изменяется флуоресценция лиганда, уравнение (1.4) принимает следующий вид:

$$\frac{1}{(F-F_0)} = \frac{1}{(F_\infty-F_0)} + \frac{1}{(F_\infty-F_0)K_a[LSZ]}, \quad (3.14)$$

где F_0 – интенсивность флуоресценции свободного даларгина; F – интенсивность флуоресценции смеси даларгина и лизоцима, F_1 – интенсивность флуоресценции даларгина полностью связанного с белком, K_a – константа ассоциации ($K_a = \frac{[\text{Лиз-ЛС}]}{[\text{Лиз}][\text{ЛС}]}$); $[LSZ]$ – концентрация лизоцима.

Из (Рис. 39е) видно, что интенсивность флуоресценции при 306 нм увеличивается. Рассчитанное значение K_a составило $(1,4 \pm 0,6) \times 10^5$ л/моль для комплекса даларгина с лизоцимом 1:1. Полученная константа хорошо коррелирует с результатом, полученным для связывания катионного соединения с бычьим гемоглобином в PBS [305].

Таким образом все исследуемые соединения оказывают влияние на интенсивность флуоресценции лизоцима, в которой ключевую роль играют аминокислотные остатки триптофана, расположенные вблизи активного центра фермента (Trp-62, Trp-63 и Trp-108) и участвующие в связывании фермента и субстрата [274,306], поэтому вполне ожидаемо, что существует корреляция между интенсивностью флуоресценции и ферментативной активностью [307]. Определяли ферментативную активность лизоцима по отношению к *M. Luteus* в присутствии ЛС. На Рис. 40 приведена относительная ферментативная активность лизоцима в зависимости от концентрации ЛС, которая была нормирована на ферментативную активность свободного лизоцима (уравнения 2.5 и 2.6). Стоит отметить, что индивидуальные растворы ЛС во всем исследуемом диапазоне концентраций не приводили к лизису клеток, поэтому изменения ферментативной активности лизоцима связаны с взаимодействием белок-ЛС.

В присутствии мирамистина и даларгина происходит увеличение ферментативной активности лизоцима в 1,5 раза, которое коррелирует с увеличением флуоресценции. В случае даларгина, увеличение активности коррелирует не только с увеличением

флуоресценции, но и с увеличением диффузии лизоцима к поверхности раздела жидкость-жидкость, что способствует его концентрированию на границе раздела [291]⁸.

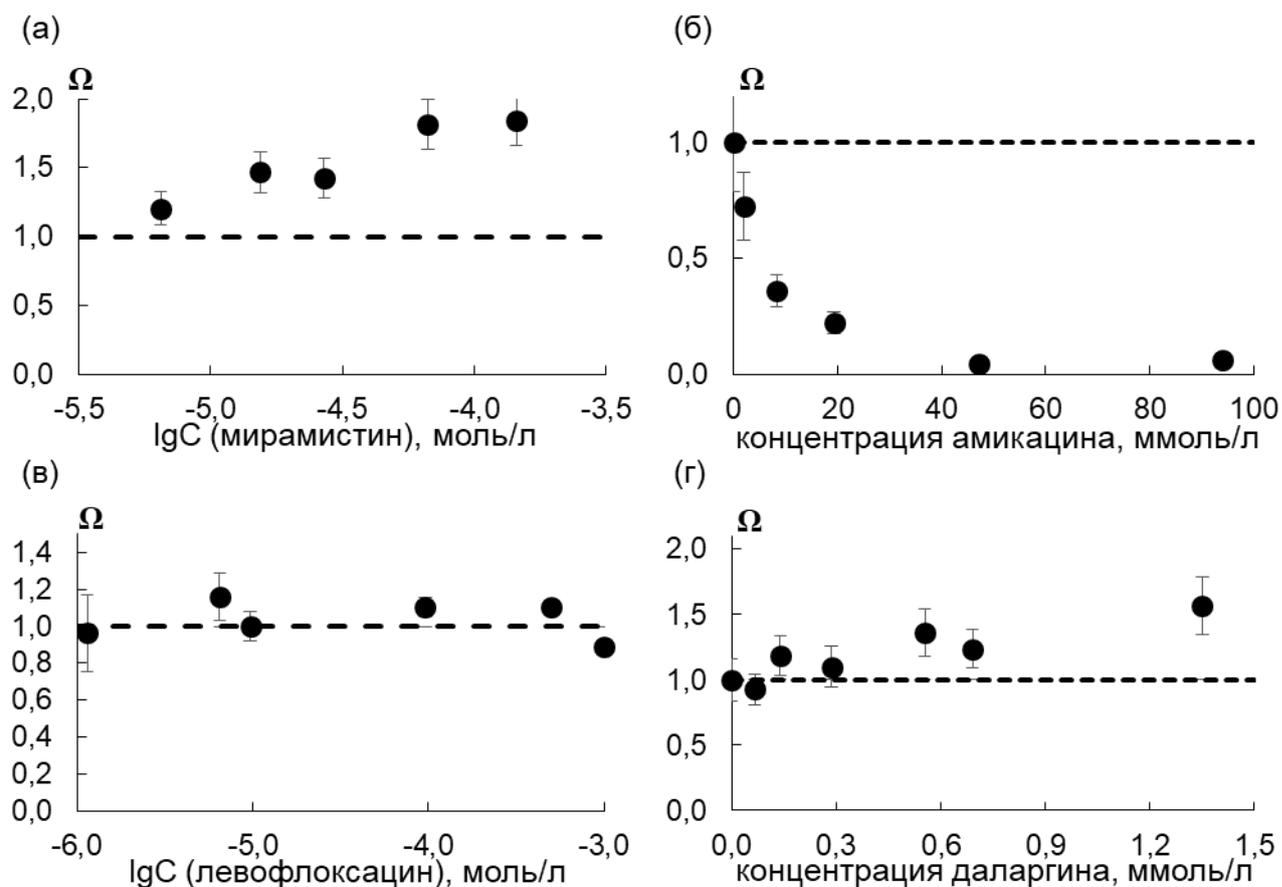


Рис. 40. – Зависимость относительной ферментативной активности лизоцима в присутствии ЛС: (а) мирамистина, (б) амикацина, (в) левофлоксацина, (г) даларгина. Пунктирной линией обозначена ферментативная активность свободного лизоцима.

Левофлоксацин практически не влияет на активность лизоцима, что согласуется с литературными данными [17], а с повышением концентрации амикацина скорость лизиса клеток резко падает, возможно, за счет того, что амикацин связывается с активным сайтом белка при образовании комплекса. Поскольку все исследуемые ЛС оказывают влияние на ферментативную активность лизоцима, которое коррелирует с результатами флуоресцентного анализа, можно заключить, что аминокислотные остатки активного центра лизоцима участвуют в процессе комплексообразования, и микроокружение активного центра в комплексе лизоцим-ЛС отличается от нативного.

⁸ При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования: M.G. Chernysheva, A.V. Kasperovich, H.S. Skrabkova, A.V. Shnitko, A.M. Arutyunyan, G.A. Badun Lysozyme-dalargin self-organization at the aqueous-air and liquid-liquid interfaces // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2021. Art # 111695 (Импакт-фактор 5.999), 10%

3.5. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ

Для установления положения ЛС в составе комплекса был проведен анализ молекулярного докинга с помощью программ HEX 8 и Autodock 4, в которых использовали структуру лизоцима 6LYZ (PDB). При анализе данных с помощью программы Autodock 4 проверяли связывание мирамистина с лизоцимом по всем семи положениям, которые были определены при пептидном анализе (Рис. 35). Для получения более надежных результатов проводили по 20 циклов расчета для каждого пептида. В таблице 11 приведены результаты: значения свободной энергии Гиббса для разных положений связывания.

Для всех пептидов значения свободной энергии Гиббса отрицательные, т.е. связывание термодинамически разрешено по всем исследуемым положениям. Наиболее вероятным оказалось связывание вблизи каталитического центра фермента, при связывании в котором, значение свободной энергии Гиббса составляет $-5,35$ ккал/моль [274]. В данной работе в центр ящика помещали соответствующий пептид: наиболее выгодными положениями оказались области пептидов HGLDNYR или FESNFNTQATNR ($\Delta G_0 = -3,16$ и $-3,12$ ккал/моль), а также в области от 46 до 61 аминокислотного остатка (пептид NTDGSTDYGILQINSR), где значение свободной энергии Гиббса составило $-5,40$ ккал/моль, отметим что снижение радиоактивности в этом пептиде было наибольшим. Было установлено, что связывание с мирамистином происходит только за счет гидрофобных взаимодействий, в котором участвуют аминокислотные остатки Ile58, Trp63, Ile98, Ala107, Trp108, Val109.

По данным флуоресцентного анализа константа комплексообразования лизоцим-мирамистин при соотношении белок-лиганд 1:1 составляет $4,25 \times 10^4$ л/моль, что соответствует значению энергии Гиббса $-6,31$ ккал/моль [274]. Таким образом, оба положения оказываются наиболее выгодными для связывания мирамистина. Образование комплексов между мирамистином и лизоцимом в положениях пептидов NTDGSTDYGILQINSR, HGLDNYR и FESNFNTQATNR и проиллюстрировано на Рис. 41-43, соответственно.

Таблица 11. Характеристики связывания мирамистина с пептидами лизоцима по данным молекулярного докинга и обработки атомарным тритием

Пептид	Координаты ящика	Относительное содержание трития в пептиде, %		ΔG^0 , ккал/моль	vdW + Hbond + desolv Energy, ккал/моль
		Лизоцим	Лизоцим-Мирамистин		
TPGSR	Шаг сетки: 0.375, 50x50x50 Å, координаты центра x=9.855, y=19.940, z=35.459	6,2	10,2	-2,83	-8,18
VFGR	Шаг сетки: 0.375, 50x50x50 Å, координаты центра x=-2.644, y=17.574, z=9.085	0,9	0,2	-2,15	-7,33
HGLDNYR	Шаг сетки: 0.375, 50x50x50 Å, координаты центра x=-10.883, y=19.449, z=23.120	0,4	0,3	-3,16	-8,49
FESNFNTQATNR	Шаг сетки: 0.375, 70x50x70 Å, координаты центра x=11.164, y=19.141, z=18.067	0,8	0,1	-3.12	-8,45
CELAAAMK	Шаг сетки: 0.375, 50x50x50 Å, координаты центра x=-11.414, y=19.926, z=9.221	0,8	0,3	-2,91	-8,25
NTDGSTDYGILQINSR	Шаг сетки: 0.375, 74x54x70 Å, координаты центра x=8.260, y=18.240, z=23.964	1,5	0,2	-5,40	-10,68
GTDVQAWIR	Шаг сетки: 0.375, 74x40x56 Å, координаты центра x=-1.874, y=32.875, z=6.197	1,2	0,2	-2,81	-7,96

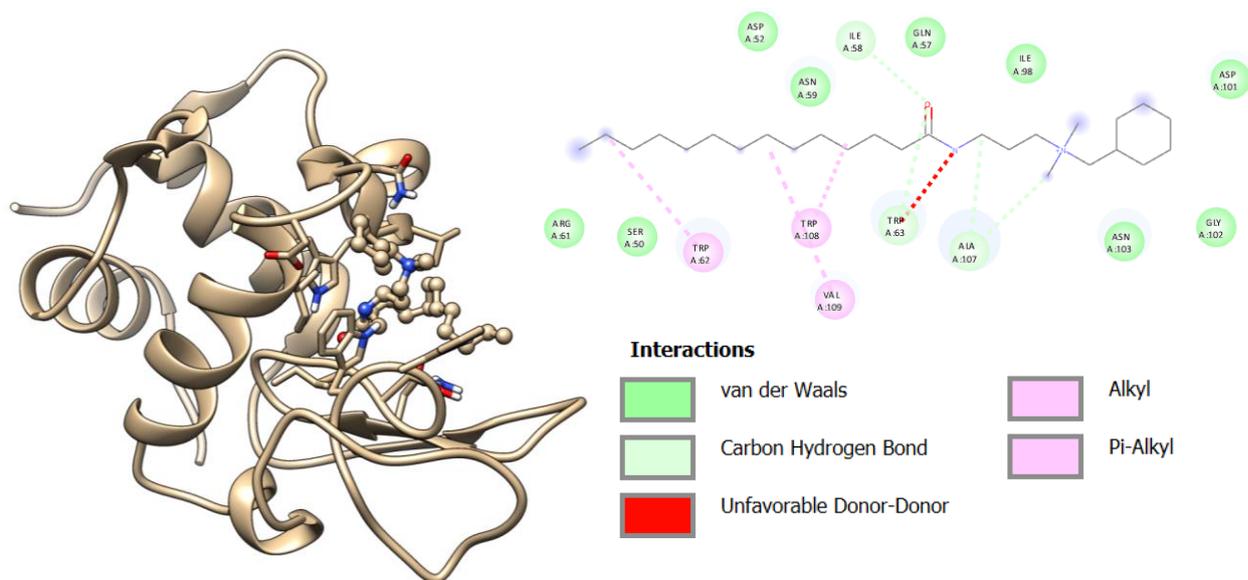


Рис. 41 – Комплекс лизоцим-мирамистин при положении лиганда в области пептида NTDGSTDYGILQINSR.

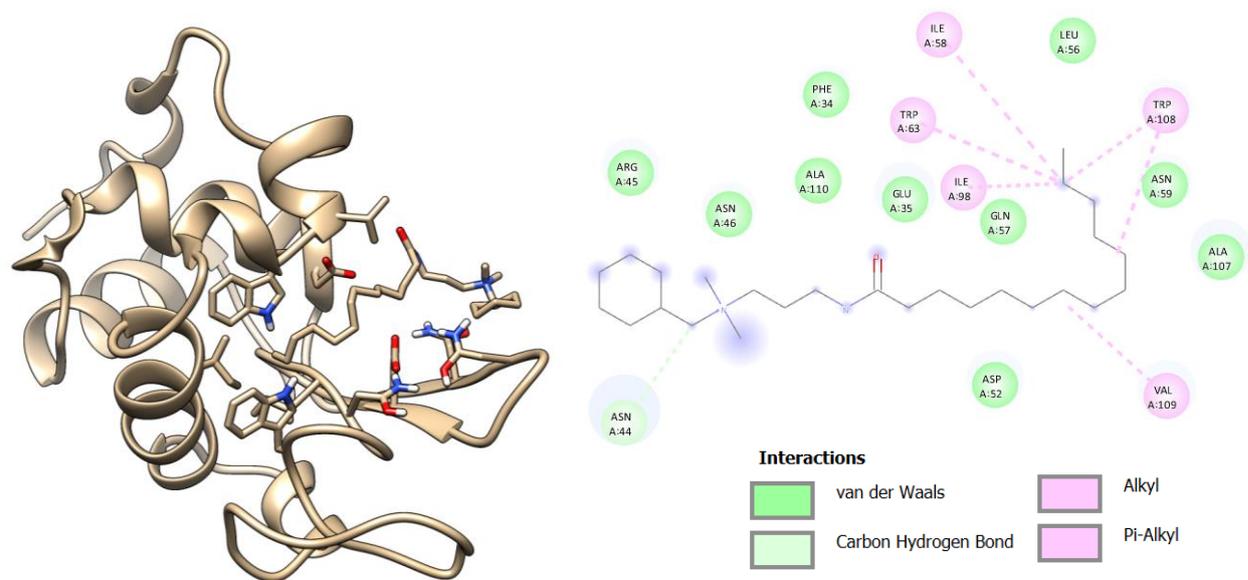


Рис. 42 – Комплекс лизоцим-мирамистин при положении лиганда в области пептида FESNFNTQATNR.

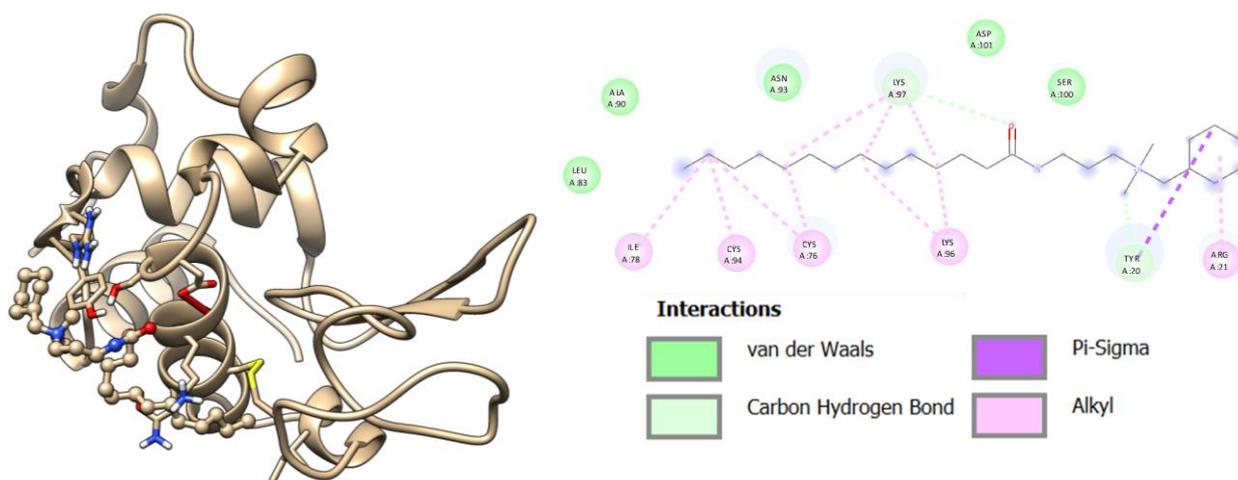


Рис. 43 – Комплекс лизоцим-мирамистин при положении лиганда в области пептида HGLDNYR.

Связывание мирамистина с лизоцимом затрагивает аминокислотные остатки триптофана, что объясняет влияние мирамистина на интенсивность флуоресценции. Можно предположить, что при связывании лизоцима с мирамистином по пептиду HGLDNYR во взаимодействии с лигандом оказывается аминокислотный остаток Ile78, что вероятно, делает более доступной для взаимодействия с атомарным тритием аминокислотные остатки с 69 до 73 – пептид TPGR, связывание которого с мирамистином термодинамически менее выгодно ($\Delta G^0 = -2,83$ ккал/моль), но в экспериментах с атомарным тритием мы наблюдали существенное увеличение относительной радиоактивности данного пептида.

Таким образом, связывание с мирамистином приводит к экранированию одних пептидов и высвобождению других, возможно тех, которые с меньшей вероятностью вступают в реакцию при метке индивидуального белка, тем самым можно объяснить рост общей радиоактивности белка в его смеси с мирамистином.

Для амикацина и левофлоксацина при моделировании рассмотрели четыре возможных положения, которые были определены при пептидном анализе: активный центр, а также TPGR, VFGR, HGLDNYR, с помощью программного обеспечения Autodock 4 было протестировано положение стыковки и выполнены расчеты, которые приведены в Таблице 12.

Таблица 12 – Результаты молекулярного докинга для разных положений связывания лиганда с лизоцимом

Положение связывания	ΔG , ккал/моль	E , ккал/моль
амикацин		
Активный центр фермента (46×46×80Å шаг сетки 0,375, координаты центра ящика 5.788; 25.556; 19.244)	-9,55	-11,23
TPGSR (50×50×50Å, шаг сетки 0,375, координаты центра ящика 9.855; 19.940; 35.459)	-5,69	-7,28
VFGR (50×50×50Å, шаг сетки 0,375, координаты центра ящика -2.644; 17.574; 9.085)	-6,84	-8,29
HGLDNYR (50×50×50Å шаг сетки 0,375, координаты центра ящика -10.883; 19.449; 23.120)	-7,14	-8,67
левофлоксацин		
Активный центр фермента (46×46×80Å шаг сетки 0,375, координаты центра ящика 5.788; 25.556; 19.244)	-7,04	-7,68
TPGSR (50×50×50Å, шаг сетки 0,375, координаты центра ящика 9.855; 19.940; 35.459)	-5,29	-5,83
VFGR (50×50×50Å, шаг сетки 0,375, координаты центра ящика -2.644; 17.574; 9.085)	-5,49	-5,74
HGLDNYR (50×50×50Å шаг сетки 0,375, координаты центра ящика -10.883; 19.449; 23.120)	-5,17	-5,54

По результатам, полученным для амикацина и левофлоксацина, можно сделать вывод, что наиболее вероятное связывание обоих ЛС происходит в области активного

центра фермента. Однако для всех исследуемых положений значение свободной энергии Гиббса оказалось отрицательным, что свидетельствует о возможности связывания. Для амикацина наиболее вероятными для связывания оказались положения активного центра, а также в области пептида HGLDNYR.

На Рис. 44 показана схема строения комплексов лизоцима с амикацином, где связывание лиганда происходит в активном центре фермента, а также 2D диаграммы связывания с аминокислотами. При образовании комплекса с амикацином во взаимодействии участвуют оба остатка, ответственные за ферментативную активность лизоцима Asp52 и Glu35, что объясняет сильное снижение активности фермента. При образовании комплекса с амикацином также велика вероятность расположения лиганда в области пептида HGLDNYR (Рис. 45). В этом случае в образовании связи участвуют аминокислотные остатки Tyr20, Arg14, входящие в состав спиралей, и находящиеся рядом с ними Asn19 и His15, что вероятно может приводить к нарушению спиральности белка, и, как следствие, к красному сдвигу спектра флуоресценции.

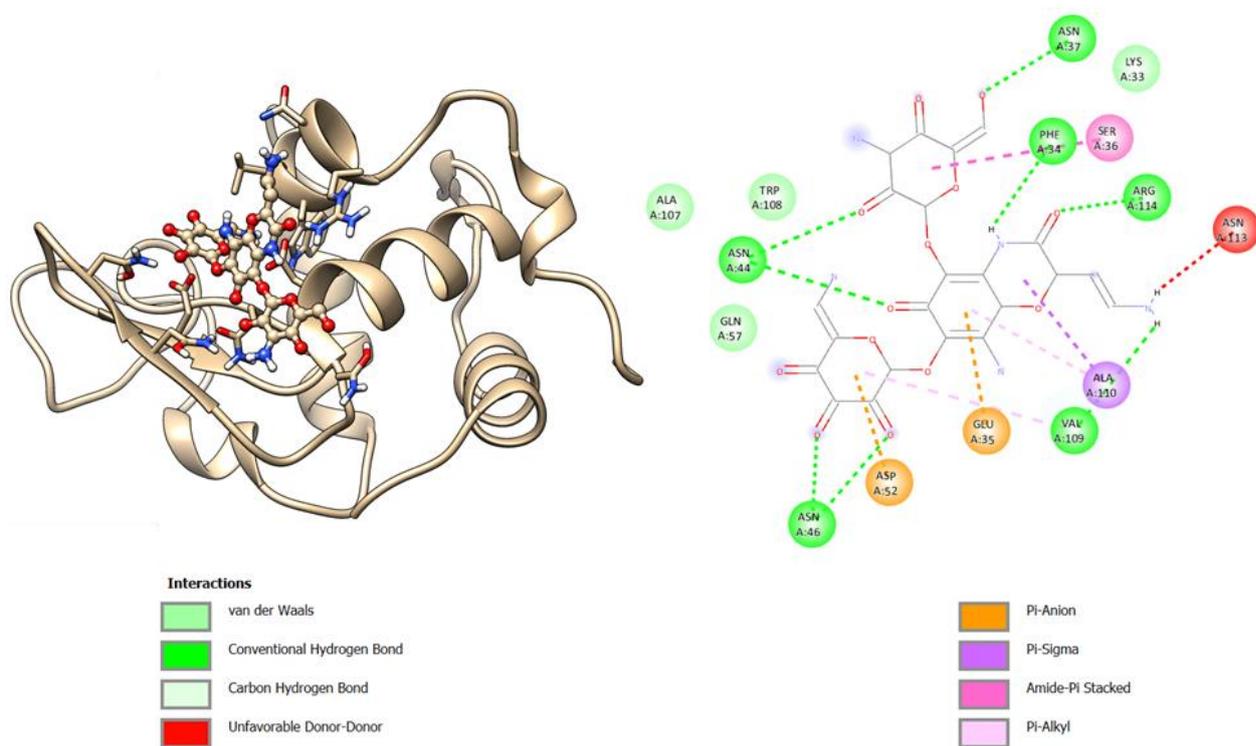


Рис. 44. – Комплекс лизоцим-амикацин, связанный в активном центре лизоцима, по данным молекулярного докинга.

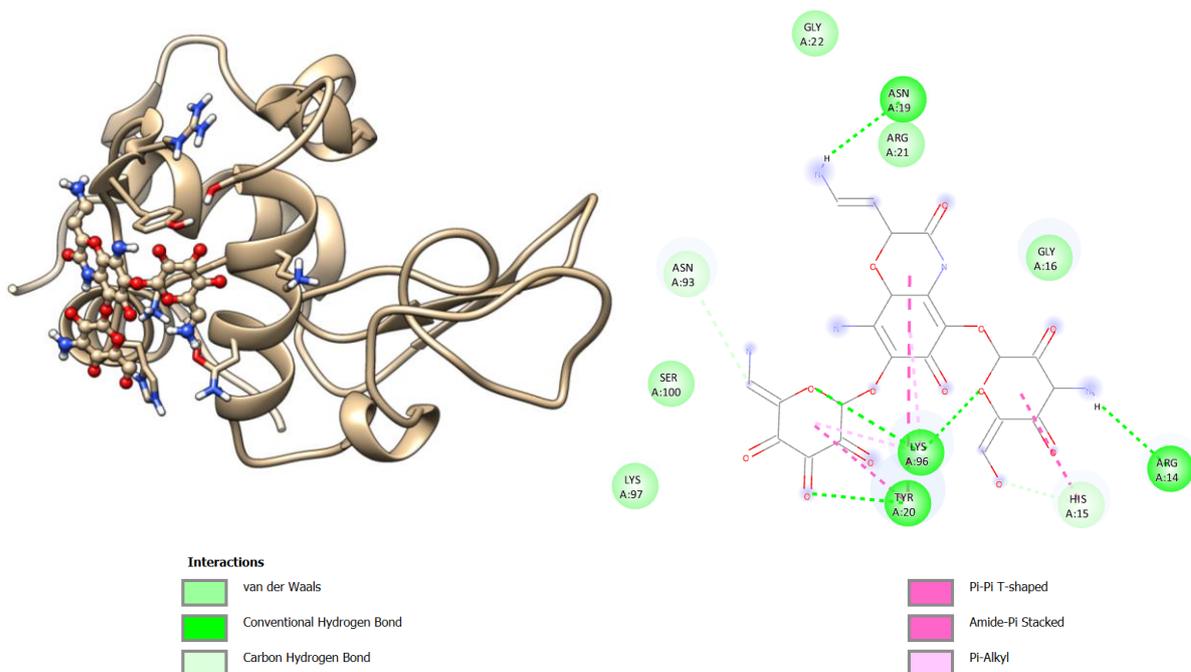


Рис. 45. – Схема комплекса лизоцим-амикацин при расположении амикацина в области пептида HGLDNYR.

При образовании комплекса с левофлоксацином установлено образование связи с Trp62, Trp63 и Trp108, что объясняет тушение флуоресценции в присутствии левофлоксацина, Asp52 и Glu35 не затрагиваются при взаимодействии, что объясняет очень слабое снижение ферментативной активности лизоцима.

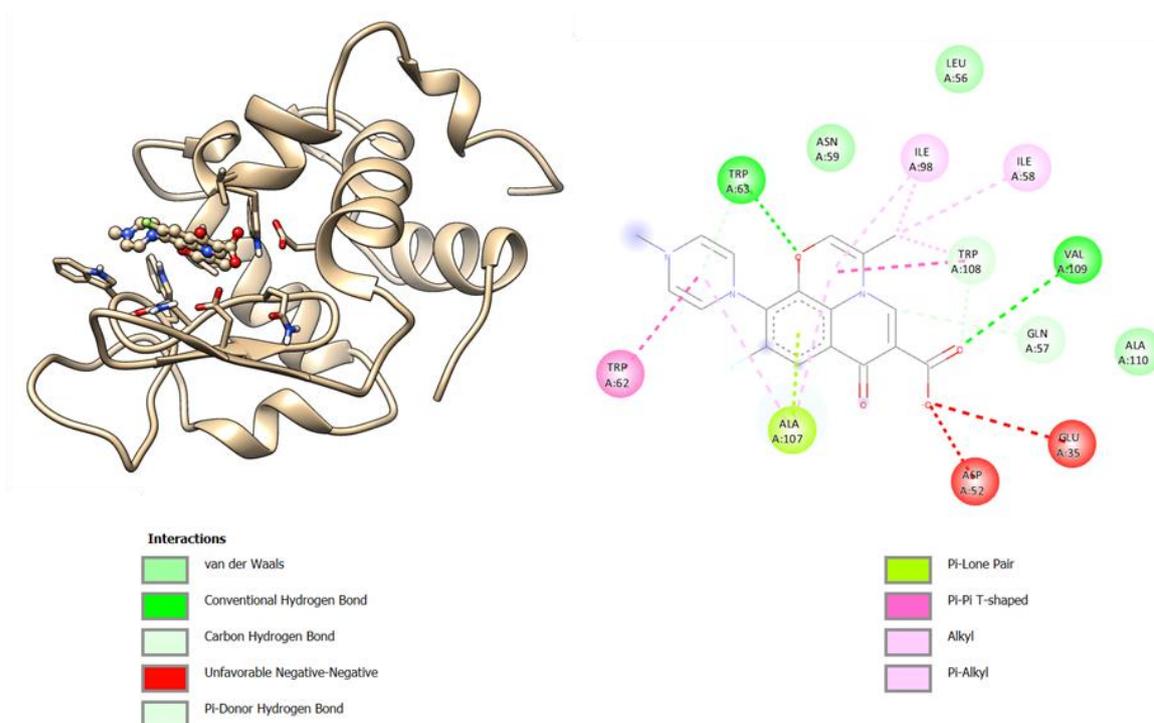


Рис. 46. – Комплекс лизоцим-левофлоксацин, связанный в активном центре лизоцима, по данным молекулярного докинга.

Наилучший результат, полученный с помощью молекулярного докинга, для комплекса лизоцим-даларгин показан на Рис. 47, визуализация выполнена с помощью программы Chimera 1.3.1. Псевдоэнергия, необходимая для образования комплекса лизоцим-даларгин, содержит электростатическую и стерическую компоненты [308] и составляет $-348,8$ кДж/моль. Предполагается, что комплекс стабилизирован гидрофобными взаимодействиями. При взаимодействии с пептидом задействованы следующие аминокислотные остатки лизоцима: Glu35, Asp52, Gln57, Asn59, Trp62, Trp63, Leu75, Asn106, Trp108 и Val109. Стоит отметить, что при взаимодействии задействованы Glu35 и Asp52, образующие активный центр фермента, что объясняет влияние даларгина на ферментативную активность. Таким образом, эта модель хорошо согласуется с полученными экспериментальными данными.

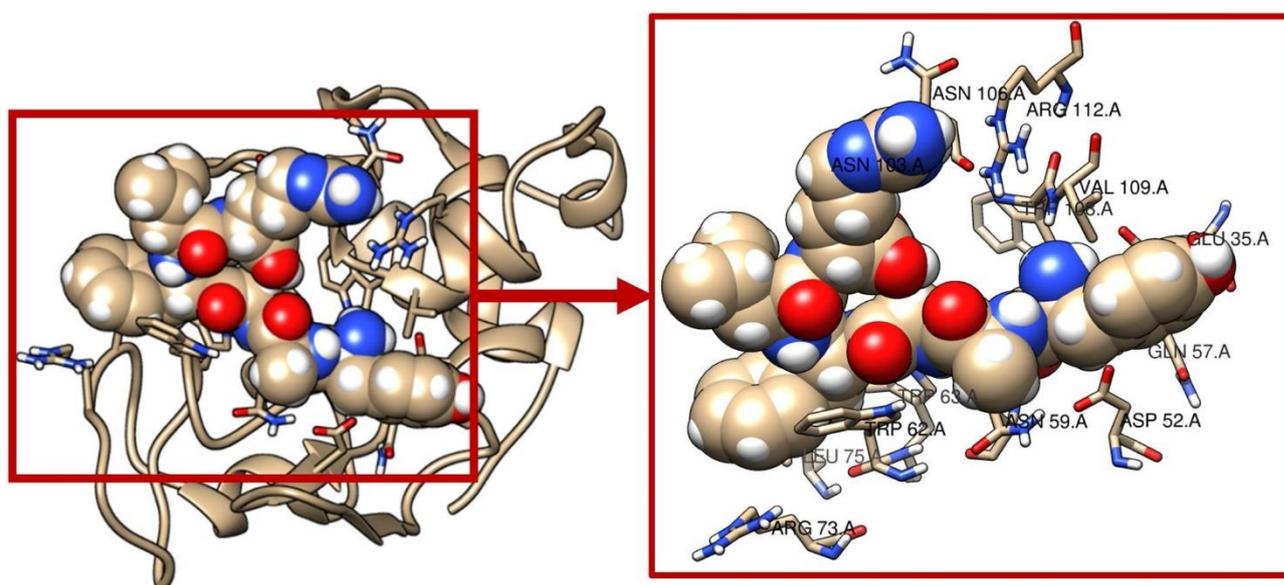


Рис. 47. – Комплекс лизоцим-даларгин, по данным молекулярного докинга.

Дополнительно провели моделирование взаимодействия даларгина с лизоцимом с помощью программного пакета Autodock4. При расположении даларгина в активном центре фермента (координаты, приведены в таблице 12) найдено, что значение свободной энергии Гиббса в этом случае составляет $-3,7$ ккал/моль. Таким образом, связывание даларгина в области активного центра фермента объясняет изменение ферментативной активности лизоцима.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе исследовано взаимодействие лизоцима и четырех ЛС с применением комбинации радиохимических и спектроскопических методов, а также молекулярного докинга. Данный подход включает в себя следующий набор методов: МСФ и метод тритиевого зонда, относящиеся к радиохимическому подходу; флуоресцентная спектроскопия, спектроскопия кругового дихроизма, турбидиметрический метод, тензиометрия и молекулярный докинг, результаты которого помогли в интерпретации экспериментальных данных. Стоит отметить, что выбранные в работе ЛС обладают различной химической природой и фармакологическим действием, а амикацин и левофлоксацин не обладают поверхностной активностью на границе с воздухом. При этом данный подход позволил определить, что все исследуемые ЛС взаимодействуют с лизоцимом, изменяя его коллоидно-адсорбционные свойства, а наиболее выгодным сайтом взаимодействия, во всех случаях, оказался активный центр фермента.

Мирамистин способен связываться с высокой эффективностью не только с активным центром фермента, но и поверхностью лизоцима, что приводит к увеличению его ферментативной активности и интенсивности флуоресценции. Исходя из значений констант связывания, наиболее вероятно, образование комплекса с мирамистином будет происходить в активном центре фермента и вблизи пептида Asn46-Arg61. Связывание мирамистина с лизоцимом приводит к снижению его коэффициента распределения и адсорбции на межфазной границе. При исследовании адсорбции лизоцима наблюдается максимум при равных объемных концентрациях белка и мирамистина, что представляется не случайным совпадением, а связано с образованием комплекса, вероятно, состава 1:1, который обладает более высокой способностью к адсорбции на межфазной границе, чем свободный белок. Однако при более высоких концентрациях мирамистина происходило вытеснение комплекса из адсорбционного слоя. Отметим, что значительное повышение ферментативной активности лизоцима в присутствии мирамистина может послужить основанием для разработки способов их совместного применения.

Образование комплекса с амикацином приводит к практически полной потере ферментативной активности лизоцима и красному смещению максимума на спектре флуоресценции лизоцима. По небольшому снижению коэффициента распределения лизоцима в присутствии амикацина можно предположить, что комплекс обладает

большей гидрофильностью в сравнении с лизоцимом без добавок. С помощью молекулярного докинга проанализировали предполагаемые места связывания, определенные при анализе пептидов, наиболее вероятными для связывания оказались положения активного центра, задействованы аминокислоты Asp52 и Glu35, а также в области пептида His15-Arg21, с участием аминокислот Tyr20, Arg14, что хорошо согласуется с экспериментальными данными.

Анализ распределения трития по пептидам лизоцима в присутствии левофлоксацина позволил установить предполагаемые места связывания. С ростом концентрации левофлоксацина происходит тушение флуоресценции лизоцима, при этом ферментативная активность практически не изменяется. Из чего был сделан вывод, что в водном растворе возможно образование комплекса лизоцим-левофлоксацин без изменения микроокружения активного центра белка. С помощью молекулярного докинга наиболее выгодным было связывание левофлоксацина с активным центром фермента, но при этом Asp52 и Glu35, которые отвечают за ферментативную активность лизоцима, не были затронуты, зато было обнаружено образование связи с остатками триптофана, в результате которого может происходить тушение флуоресценции лизоцима. Взаимное влияние лизоцима и левофлоксацина на адсорбцию друг друга, указывает на конкурентную адсорбцию и на то, что образующийся комплекс оказывается более гидрофильным, чем свободный лизоцим.

Установлено, что пептид даларгин образует с лизоцимом гидрофобный комплекс, в котором участвуют аминокислотные остатки активного центра лизоцима. Даларгин сам по себе обладает высокой поверхностной активностью на поверхности вода-воздух и не может быть заменен белком с поверхности раздела. Следовательно, межфазное натяжение на поверхности вода-воздух контролируется пептидом. Однако, если рассматривать органическую фазу, лизоцим или его комплекс с даларгином быстро адсорбируются на границе жидкость-жидкость, образуя насыщенный слой. Кроме того, лизоцим обеспечивает увеличение адсорбции даларгина в подповерхностных мультислоях, что не влияет на межфазное натяжение.

Таким образом использование комбинированного подхода позволяет исследовать взаимодействие биополимеров с лигандами, установить образование комплекса и предполагаемые места связывания, оценить влияние комплексообразования на коллоидно-адсорбционные свойства лизоцима, которые играют важную роль в биологических системах

ВЫВОДЫ

1. С помощью комплексного подхода с использованием радиохимических методов, методов спектроскопии, а также молекулярного докинга показано, что лизоцим образует комплексы с лекарственными средствами мирамистином, амикацином, левофлоксацином и даларгином, что приводит к изменению поверхностно-активных свойств белка и его ферментативной активности.
2. С помощью метода сцинтиллирующей фазы и тензиометрии определили составы смешанных адсорбционных слоев лизоцима с изученными лекарственными средствами на границах водный раствор/*n*-ксилол и водный раствор/воздух. Для выявления мест контактов белка с лекарственными средствами предложено использовать обработку атомами трития лиофилизированных комплексов лизоцим-лекарственное средство, образующихся в водных растворах, что повысило радиоактивность аминокислотных остатков лизоцима и достоверность получаемых результатов.
3. Наиболее сильные эффекты наблюдались при образовании комплекса лизоцима с мирамистином, что проявлялось в изменении коэффициентов распределения и адсорбции на межфазной границе водный раствор/*n*-ксилол. Показано, что максимум адсорбции лизоцима наблюдался при соотношении белок-мирамистин 1:1. Образующийся комплекс увеличивал интенсивность флуоресценции лизоцима, его ферментативную активность, а также максимально сильно нарушал упаковку молекул в лиофилизированных препаратах, что увеличивало радиоактивность белка при реакции с атомами трития. Экспериментальные данные подтверждены с помощью молекулярного докинга: наиболее вероятно, связывание происходит либо в зоне активного центра фермента, либо в области пептида Asn46-Arg61 и затрагивает аминокислотные остатки триптофана Trp63 и Trp108.
4. Амикацин при образовании комплекса с лизоцимом снижает сродство белка к гидрофобным средам и практически не влияет на его адсорбцию на границе раздела *n*-ксилол/вода. Показано, что происходит связывание амикацина с активным сайтом белка, задействованы аминокислотные остатки Asp52 и Glu35, что приводит к снижению его ферментативной активности, и в области пептида His15-Arg21, где в

образовании связи участвуют аминокислотные остатки Asn19 и His15, что приводит к красному смещению максимума флуоресценции.

5. Найдено, что комплекс лизоцима с левофлоксацином не затрагивает активный сайт белка, однако задействованы аминокислотные остатки триптофана Trp62, Trp63 и Trp108 вне активного центра фермента. При образовании комплекса с левофлоксацином снижается гидрофобность лизоцима, также наблюдалось взаимное влияние этих веществ при их адсорбции.

6. Показано, что в образовании комплекса даларгина с лизоцимом задействованы аминокислотные остатки Glu35, Asp52, Gln57, Asn59, Trp62, Trp63, Leu75, Asn106, Trp108 и Val109, что приводит к гидрофобизации лизоцима и способствует его концентрированию на границе раздела, а также увеличению его ферментативной активности в 1,5 раза.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БСА – бычий сывороточный альбумин
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ДСН – додецилсульфат натрия
ДТАБ – додецилтриметиламмония бромид
ККМ – критическая концентрация мицеллообразования
КД – круговой дихроизм
ЛС – лекарственное средство
МСФ – метод сцинтиллирующей фазы
МТАТ – метод термической активации трития
ПАВ – поверхностно-активное вещество
ПФ – подвижная фаза
ТСХ - тонкослойная хроматография
ТТАБ – тетрадецилтриметиламмония бромид
ТФУ - трифторуксусная кислота
ЧСА – человеческий сывороточный альбумин
PBS – phosphate-buffered saline – фосфатно-солевой буфер.
PDB – банк данных трёхмерных структур белков (protein data bank)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pang B. et al. Investigation on the interactions of silymarin to bovine serum albumin and lysozyme by fluorescence and absorbance // *J. Lumin.* 2012. Vol. 132, № 4. P. 895–900.
2. Mullard A. 2018 FDA drug approvals // *Nature reviews. Drug discovery.* 2019. Vol. 18, № 2. P. 85–89.
3. Mullard A. 2019 FDA drug approvals // *Nature reviews. Drug discovery.* 2020. Vol. 19, № 2. P. 79–84.
4. Mullard A. 2020 FDA drug approvals // *Nature reviews. Drug discovery.* 2021. Vol. 20, № 2. P. 85–90.
5. de la Torre B.G., Albericio F. The Pharmaceutical Industry in 2021. An Analysis of FDA Drug Approvals from the Perspective of Molecules // *Molecules.* 2022. Vol. 27, № 3. P. 1075.
6. Mullard A. 2022 FDA approvals // *Nat. Rev. Drug Discov.* Springer Science and Business Media LLC, 2023. Vol. 22. P. 83–88.
7. Khatibi A., Keihan A.H., Sheikh Hasani V. Bio thermodynamic studies of diclofenac interaction with lysozyme under various conditions using diclofenac-selective membrane electrode and molecular docking // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.* 2017. Vol. 35, № 13. P. 2789–2793.
8. Feroz S.R. et al. Interaction of flavokawain B with lysozyme: A photophysical and molecular simulation study // *J. Lumin.* 2015. Vol. 160. P. 101–109.
9. Shanmugaraj K., Anandakumar S., Ilanchelian M. Probing the binding interaction of thionine with lysozyme: A spectroscopic and molecular docking investigation // *Dye. Pigment.* 2015. Vol. 112. P. 210–219.
10. Ali M.S. et al. Dynamic interaction between lysozyme and ceftazidime: Experimental and molecular simulation approaches // *J. Mol. Liq.* 2021. Vol. 328. P. 115412.
11. Kabir M.Z. et al. Biophysical and computational characterization of vandetanib–lysozyme interaction // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2018. Vol. 189. P. 485–494.
12. Saha S., Chowdhury J. Binding Interaction of Juglone with Lysozyme: Spectroscopic Studies Aided by In Silico Calculations // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2019. Vol.

193. P. 89–99.
13. Bozorgmehr M.R., Chamani J., Moslehi G. Spectroscopic and DFT investigation of interactions between cyclophosphamide and aspirin with lysozyme as binary and ternary systems // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2015. Vol. 33, № 8. P. 1669–1681.
 14. Singh N., Chandra R. Probing the binding interaction of ortho-vanillin derived chalcone with lysozyme: A biophysical studies aided by in silico calculations // *J. Mol. Liq. Elsevier B.V.*, 2021. Vol. 321. P. 114490.
 15. Banerjee S. Effect of glyoxal and 1-methylisatin on stress-induced fibrillation of Hen Egg White Lysozyme: Insight into the anti-amyloidogenic property of the compounds with possible therapeutic implications // *Int. J. Biol. Macromol. Elsevier B.V.*, 2020. Vol. 165. P. 1552–1561.
 16. Chen S. et al. Study of the noncovalent interactions between phenolic acid and lysozyme by cold spray ionization mass spectrometry (CSI-MS), multi-spectroscopic and molecular docking approaches // *Talanta.* 2020. Vol. 211. P. 120762.
 17. Fang Q. et al. The study on interactions between levofloxacin and model proteins by using multi-spectroscopic and molecular docking methods // *J. Biomol. Struct. Dyn.* Taylor and Francis Ltd., 2018. Vol. 36, № 8. P. 2032–2044.
 18. Qin P., Su B., Liu R. Probing the binding of two fluoroquinolones to lysozyme: A combined spectroscopic and docking study // *Mol. Biosyst.* 2012. Vol. 8, № 4. P. 1222–1229.
 19. Borana M.S. et al. Curcumin and kaempferol prevent lysozyme fibril formation by modulating aggregation kinetic parameters // *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics. Elsevier*, 2014. Vol. 1844, № 3. P. 670–680.
 20. Faramarzian M., Bahramikia S., Dehghan Shasaltaneh M. In vitro investigation of the effect of mesalazine on amyloid fibril formation of hen egg-white lysozyme and defibrillation lysozyme fibrils // *Eur. J. Pharmacol. Elsevier B.V.*, 2020. Vol. 874. P. 173011.
 21. Saadati-Eskandari N. et al. Amino Acids as Additives against Amorphous Aggregation: In Vitro and In Silico Study on Human Lysozyme // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2019. Vol. 189, № 1. P. 305–317.
 22. Otagiri M. A molecular functional study on the interactions of drugs with plasma proteins. // *Drug metabolism and pharmacokinetics.* 2005. Vol. 20, № 5. P. 309–323.

23. Tunç S., Duman O., Bozoğlan B.K. Studies on the interactions of chloroquine diphosphate and phenelzine sulfate drugs with human serum albumin and human hemoglobin proteins by spectroscopic techniques // *J. Lumin.* 2013. Vol. 140. P. 87–94.
24. Tunç S., Çetinkaya A., Duman O. Spectroscopic investigations of the interactions of tramadol hydrochloride and 5-azacytidine drugs with human serum albumin and human hemoglobin proteins // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2013. Vol. 120. P. 59–65.
25. Banu A. et al. Multispectroscopic and computational studies of interaction of bovine serum albumin, human serum albumin and bovine hemoglobin with bisacodyl // *J. Mol. Struct.* 2022. Vol. 1249. P. 131550.
26. Yan X. et al. Interaction of Cefpiramide sodium with bovine hemoglobin and effect of the coexistent metal ion on the protein-drug association // *J. Lumin.* 2013. Vol. 142. P. 155–162.
27. Han R. et al. Investigation on the interaction of cefpirome sulfate with lysozyme by fluorescence quenching spectroscopy and synchronous fluorescence spectroscopy // *Luminescence.* 2016. Vol. 31, № 2. P. 580–586.
28. Tian L. et al. Studies on the interaction of heparin with lysozyme by multi-spectroscopic techniques and atomic force microscopy // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* Elsevier, 2016. Vol. 154. P. 27–32.
29. Millan S. et al. Exploring the effect of 5-Fluorouracil on conformation, stability and activity of lysozyme by combined approach of spectroscopic and theoretical studies // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2018. Vol. 179. P. 23–31.
30. Chi Z., Liu R. New insights into the characterization of the binding of tetracycline analogues with lysozyme: A biophysical study // *Chemosphere.* 2012. Vol. 86, № 1. P. 92–97.
31. Smith S.A., Waters N.J. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations for Drugs Binding to Alpha-1-Acid Glycoprotein // *Pharmaceutical Research.* 2019. Vol. 36, № 30. P. 1–19.
32. Ajmal M.R. et al. Interaction of new kinase inhibitors cabozantinib and tofacitinib with human serum alpha-1 acid glycoprotein. A comprehensive spectroscopic and molecular Docking approach // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2016. Vol. 159. P. 199–208.

33. Zia M.K. et al. Understanding the binding interaction between methotrexate and human alpha-2-macroglobulin: Multi-spectroscopic and computational investigation // *Arch. Biochem. Biophys.* 2019. Vol. 675. P. 108118.
34. Shahlaei M., Saeidifar M., Zamanian A. Increasing the effectiveness of oxaliplatin using colloidal immunoglobulin G nanoparticles: Synthesis, cytotoxicity, interaction, and release studies // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2020. Vol. 195. P. 111255.
35. Karimian Amroabadi M. et al. Spectroscopic studies of the interaction between alprazolam and apo-human serum transferrin as a drug carrier protein // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. Vol. 108. P. 263–271.
36. Shamsi A. et al. Spectroscopic, calorimetric and in silico insight into the molecular interactions of Memantine with human transferrin: Implications of Alzheimer's drugs // *Int. J. Biol. Macromol.* 2021. Vol. 190. P. 660–666.
37. González-Durruthy M. et al. Exploring the conformational binding mechanism of fibrinogen induced by interactions with penicillin β -lactam antibiotic drugs // *J. Mol. Liq.* 2021. Vol. 324. P. 114667.
38. Zaman M. et al. Elucidating the interaction of clofazimine with bovine liver catalase; a comprehensive spectroscopic and molecular docking approach // *J. Mol. Recognit.* 2017. Vol. 30, № 8. P. e2619.
39. Suresh P.K. et al. Phenytoin-Bovine Serum Albumin interactions - modeling plasma protein – drug binding: A multi-spectroscopy and in silico-based correlation // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2018. Vol. 193. P. 523–527.
40. Abdelaziz M.A. et al. Multi-Spectroscopic, thermodynamic and molecular dynamic simulation studies for investigation of interaction of dapagliflozin with bovine serum albumin // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2022. Vol. 264. P. 120298.
41. Bi S. et al. Investigation on the interactions of clenbuterol to bovine serum albumin and lysozyme by molecular fluorescence technique // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* Elsevier B.V., 2014. Vol. 120. P. 456–461.
42. Gaurav M. et al. Biochemical aspects of hemoglobin-xenobiotic interactions and their implications in drug discovery // *Biochimie.* 2021. Vol. 191. P. 154–163.
43. Rout J. et al. Spectroscopic and computational insight into the conformational dynamics of hemoglobin in the presence of vitamin B12 // *Int. J. Biol. Macromol.* 2021. Vol. 189.

- P. 306–315.
44. Das I., Halder M. Counterpointing Scenarios on the Fate of Different Prototropic Forms of Norfloxacin Housed in the Pocket of Lysozyme: The Nonelectrostatic Interactions in the Protein Interior Are in the Controlling Role on the Prototropic Equilibria of the Guest // *ACS Omega*. 2017. Vol. 2, № 9. P. 5504–5517.
 45. Wang Z. et al. Study on the binding behavior of lysozyme with cephalosporin analogues by fluorescence spectroscopy // *J. Fluoresc.* 2009. Vol. 19, № 5. P. 801–808.
 46. Li D., Ji B., Jin J. Spectrophotometric studies on the binding of Vitamin C to lysozyme and bovine liver catalase // *J. Lumin.* 2008. Vol. 128, № 9. P. 1399–1406.
 47. Li D., Cao X., Ji B. Spectrophotometric studies on the interaction between myricetin and lysozyme in the absence or presence of Cu^{2+} or Fe^{3+} // *J. Lumin.* 2010. Vol. 130, № 10. P. 1893–1900.
 48. Khan J.M. et al. Effect of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) on the conformation of a hen egg white lysozyme: A spectroscopic and molecular docking study // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2019. Vol. 219. P. 313–318.
 49. Almutairi F.M. et al. Biophysical Insight into the Interaction of Human Lysozyme with Anticancer Drug Anastrozole: A Multitechnique Approach // *Sci. World J.* 2020. Vol. 2020. P. 8363685.
 50. Durek T., Torbeev V.Y., Kent S.B.H. Convergent chemical synthesis and high-resolution x-ray structure of human lysozyme // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007. Vol. 104, № 12. P. 4846–4851.
 51. Wu T. et al. What is new in lysozyme research and its application in food industry? A review // *Food Chem.* 2019. Vol. 274. P. 698–709.
 52. Paramaguru G. et al. Interaction of anthraquinone dyes with lysozyme: Evidences from spectroscopic and docking studies // *J. Hazard. Mater. Elsevier*, 2010. Vol. 175, № 1–3. P. 985–991.
 53. Das S. et al. Exploring the interaction of bioactive kaempferol with serum albumin, lysozyme and hemoglobin: A biophysical investigation using multi-spectroscopic, docking and molecular dynamics simulation studies // *J. Photochem. Photobiol. B Biol. Elsevier B.V.*, 2020. Vol. 205. P. 111825.
 54. Вайнштейн Б.К. Рентгеноструктурный анализ глобулярных белков // *Успехи*

- физических наук. 1966. Vol. 88, № 3. P. 527–565.
55. Day L. et al. Conformational changes of globular proteins adsorbed at oil-in-water emulsion interfaces examined by synchrotron radiation circular dichroism // *Food Hydrocoll.* 2014. Vol. 34. P. 78–87.
 56. Yampolskaya G.P., Tarasevich B.N., Elenskii A.A. Secondary structure of globular proteins in adsorption layers at the solution-air interface by the data of fourier transform IR spectroscopy // *Colloid J.* 2005. Vol. 67. P. 385–391.
 57. Yano Y.F. et al. Driving force behind adsorption-induced protein unfolding: A time-resolved x-ray reflectivity study on lysozyme adsorbed at an air/water interface // *Langmuir.* 2009. Vol. 25, № 1. P. 32–35.
 58. Noskov B.A., Krycki M.M. Formation of protein/surfactant adsorption layer as studied by dilational surface rheology // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2017. Vol. 247. P. 81–99.
 59. Bergfreund J., Bertsch P., Fischer P. Effect of the hydrophobic phase on interfacial phenomena of surfactants, proteins, and particles at fluid interfaces // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2021. Vol. 56. P. 101509.
 60. Huang Y. et al. Comparative studies on interactions of baicalein, baicalin and scutellarin with lysozyme // *Eur. J. Med. Chem. Elsevier Masson*, 2011. Vol. 46, № 12. P. 6039–6045.
 61. Young A.C.M., Tilton R.F., Dewan J.C. Thermal expansion of hen egg-white lysozyme. Comparison of the 1.9 Å resolution structures of the tetragonal form of the enzyme at 100 K and 298 K // *J. Mol. Biol.* 1994. Vol. 235, № 1. P. 302–317.
 62. Das S., Rohman M.A., Singha Roy A. Exploring the non-covalent binding behaviours of 7-hydroxyflavone and 3-hydroxyflavone with hen egg white lysozyme: Multi-spectroscopic and molecular docking perspectives // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2018. Vol. 180. P. 25–38.
 63. Bhat I.A. et al. Solution behaviour of lysozyme in the presence of novel biodegradable gemini surfactants // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. Vol. 117. P. 301–307.
 64. Han R. et al. Investigation on the interaction between lysozyme and cefepime hydrochloride by synchronous fluorescence and fluorescence quenching spectroscopy // *Spectrosc. Lett.* 2016. Vol. 49, № 3. P. 225–230.
 65. Das S. et al. Binding of naringin and naringenin with hen egg white lysozyme: A spectroscopic investigation and molecular docking study // *Spectrochim. Acta - Part A*

- Mol. Biomol. Spectrosc. Elsevier B.V., 2018. Vol. 192. P. 211–221.
66. Hosseinzadeh R. et al. Biological interaction of thiamine with lysozyme using binding capacity concept and molecular docking // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2016. Vol. 34, № 10. P. 2146–2154.
 67. Ding F. et al. Fluorescence spectroscopic investigation of the interaction between chloramphenicol and lysozyme // *Eur. J. Med. Chem. Elsevier Masson*, 2009. Vol. 44, № 10. P. 4083–4089.
 68. Li D. et al. Effect of pH on the interaction of baicalein with lysozyme by spectroscopic approaches // *J. Photochem. Photobiol. B Biol. Elsevier*, 2011. Vol. 104, № 3. P. 414–424.
 69. Singha Roy A., Ghosh P. Characterization of the binding of flavanone hesperetin with chicken egg lysozyme using spectroscopic techniques: Effect of pH on the binding // *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 2016. Vol. 84, № 1–2. P. 21–34.
 70. Zhang H.M. et al. Study on the interaction between cinnamic acid and lysozyme // *J. Mol. Struct.* 2011. Vol. 987, № 1–3. P. 7–12.
 71. Zhang X. et al. Studies on the interaction of naringin palmitate with lysozyme by spectroscopic analysis // *J. Funct. Foods. Elsevier Ltd*, 2014. Vol. 8, № 1. P. 331–339.
 72. Li D., Zhu J., Jin J. Spectrophotometric studies on the interaction between nevadensin and lysozyme // *J. Photochem. Photobiol. A Chem. Elsevier*, 2007. Vol. 189, № 1. P. 114–120.
 73. Rial R. et al. Conformational binding mechanism of lysozyme induced by interactions with penicillin antibiotic drugs // *J. Mol. Liq.* 2022. Vol. 358. P. 119081.
 74. Khalil A., Kashif M. Interaction studies of levofloxacin with human lysozyme in a ternary complex using multispectroscopic and computational analysis: A circular dichroism method for the quantitation of levofloxacin // *J. Mol. Liq. Elsevier*, 2023. Vol. 370. P. 121023.
 75. Khan A.N. et al. Inhibition and disruption of amyloid formation by the antibiotic levofloxacin: A new direction for antibiotics in an era of multi-drug resistance // *Arch. Biochem. Biophys. Academic Press*, 2021. Vol. 714. P. 109077.
 76. González-Durruthy M. et al. Lysozyme allosteric interactions with β -blocker drugs // *J. Mol. Liq. Elsevier*, 2022. Vol. 366. P. 120370.
 77. Cheng L.L. et al. Interaction mechanism between berberine and the enzyme lysozyme

- // Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc. Elsevier, 2012. Vol. 97. P. 209–214.
78. Li X.R. et al. Comparative studies on interactions of l-ascorbic acid, α -tocopherol, procyanidin B3, β -carotene, and astaxanthin with lysozyme using fluorescence spectroscopy and molecular modeling methods // J. Food Biochem. 2017. Vol. 41, № 2. P. e12338.
 79. Jash C. et al. Binding of the iminium and alkanolamine forms of sanguinarine to lysozyme: Spectroscopic analysis, thermodynamics, and molecular modeling studies // J. Phys. Chem. B. 2014. Vol. 118, № 46. P. 13077–13091.
 80. Jash C. et al. Chelerythrine-lysozyme interaction: spectroscopic studies, thermodynamics and molecular modeling exploration // Phys. Chem. Chem. Phys. 2015. Vol. 17, № 25. P. 16630–16645.
 81. Ali M.S., Al-Lohedan H.A. Spectroscopic and Molecular Docking Investigation on the Noncovalent Interaction of Lysozyme with Saffron Constituent “safranal” // ACS Omega. 2020. Vol. 5, № 16. P. 9131–9141.
 82. Tang J. et al. Study of the non-covalent interactions of ginsenosides and lysozyme using electrospray ionization mass spectrometry // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2015. Vol. 29, № 21. P. 2031–2038.
 83. Lyndem S. et al. Binding of bioactive esculin and esculetin with hen egg white lysozyme: Spectroscopic and computational methods to comprehensively elucidate the binding affinities, interacting forces, and conformational alterations at molecular level // J. Mol. Liq. Elsevier, 2022. Vol. 360. P. 119423.
 84. Liu H. et al. Competitive binding of synergistic antioxidant chlorogenic acid and (–)-epigallocatechin gallate with lysozyme: Insights from multispectroscopic characterization, molecular docking and activity evaluation // J. Mol. Liq. Elsevier, 2021. Vol. 341. P. 117387.
 85. Liu H. et al. Multispectroscopic and synergistic antioxidant study on the combined binding of caffeic acid and (–)-epicatechin gallate to lysozyme // Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc. Elsevier, 2022. Vol. 272. P. 120986.
 86. Li H. et al. Microbial cell factories for the production of flavonoids—barriers and opportunities // Bioresour. Technol. 2022. Vol. 360. P. 127538.
 87. Das S. et al. Lysozyme–luteolin binding: molecular insights into the complexation

- process and the inhibitory effects of luteolin towards protein modification // *Phys. Chem. Chem. Phys.* The Royal Society of Chemistry, 2019. Vol. 21, № 23. P. 12649–12666.
88. Das S. et al. An insight into the binding of 6-hydroxyflavone with hen egg white lysozyme: a combined approach of multi-spectroscopic and computational studies // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2019. Vol. 37, № 15. P. 4019–4034.
 89. Zaman M. et al. Interaction of anticancer drug pinostrobin with lysozyme: a biophysical and molecular docking approach // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.* 2019. Vol. 37, № 16. P. 4338–4344.
 90. Ashrafi N. et al. A comparative study of the interaction of naringenin with lysozyme by multi-spectroscopic methods, activity comparisons, and molecular modeling procedures // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* Elsevier, 2022. Vol. 271. P. 120931.
 91. Wang Z., Li D., Jin J. Study on the interaction of puerarin with lysozyme by spectroscopic methods // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* Elsevier, 2008. Vol. 70, № 4. P. 866–870.
 92. He W. et al. Comparison of the characterization on binding of alpinetin and cardamonin to lysozyme by spectroscopic methods // *Int. J. Biol. Macromol.* 2006. Vol. 39, № 4–5. P. 165–173.
 93. Liang M. et al. Interaction between lysozyme and procyanidin: Multilevel structural nature and effect of carbohydrates // *Food Chem.* 2013. Vol. 138, № 2–3. P. 1596–1603.
 94. Javadi A. et al. Experimental techniques to study protein–surfactant interactions: New insights into competitive adsorptions via drop subphase and interface exchange // *Adv. Colloid Interface Sci.* Elsevier B.V., 2022. Vol. 301. P. 102601.
 95. Dewey T.G. Biophysical and biochemical aspects of fluorescence spectroscopy // Springer New York, NY. 1991. 294 p.
 96. Lakowicz J.R. Principles of fluorescence spectroscopy // *Principles of Fluorescence Spectroscopy.* Springer, 2006. 954 p.
 97. Nigam S., Durocher G. Spectral and photophysical studies of inclusion complexes of some neutral 3H-indoles and their cations and anions with β -cyclodextrin // *J. Phys. Chem.* 1996. Vol. 100, № 17. P. 7135–7142.

98. Bortolotti A. et al. On the purported “backbone fluorescence” in protein three-dimensional fluorescence spectra // *RSC Adv.* 2016. Vol. 6, № 114. P. 112870–112876.
99. Miles A.J., Wallace B.A. Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins and applications in structural and functional genomics // *Chem. Soc. Rev.* 2006. Vol. 35, № 1. P. 39–51.
100. Alahverdjieva V.S. et al. Adsorption of hen egg-white lysozyme at the air-water interface in presence of sodium dodecyl sulphate // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 2008. Vol. 317, № 1–3. P. 610–617.
101. Sengupta T., Damodaran S. Role of dispersion interactions in the adsorption of proteins at oil-water and air-water interfaces // *Langmuir.* 1998. Vol. 14, № 22. P. 6457–6469.
102. Kairaliyeva T. et al. Surface Tension and Adsorption Studies by Drop Profile Analysis Tensiometry // *Journal of Surfactants and Detergents.* 2017. Vol. 20, № 6. P. 1225–1241.
103. Dalkas G., Euston S.R. Molecular simulation of protein adsorption and conformation at gas-liquid, liquid–liquid and solid–liquid interfaces // *Current Opinion in Colloid and Interface Science.* 2019. Vol. 41. P. 1–10.
104. Miller R. et al. Thermodynamics and Kinetics of Mixed Protein/Surfactant Adsorption Layers at Liquid Interfaces // *Proteins in Solution and at Interfaces: Methods and Applications in Biotechnology and Materials Science.* 2013. P. 389–427.
105. Cheung D.L. Adsorption and conformations of lysozyme and α -lactalbumin at a water-octane interface // *J. Chem. Phys.* 2017. Vol. 147, № 19. P. 195101.
106. Graham D.E., Phillips M.C. Proteins at liquid interfaces. I. Kinetics of adsorption and surface denaturation // *J. Colloid Interface Sci.* 1979. Vol. 70, № 3. P. 403–414.
107. Tripp B.C., Magda J.J., Andrade J.D. Adsorption of Globular Proteins at the Air/Water Interface as Measured via Dynamic Surface Tension: Concentration Dependence, Mass-Transfer Considerations, and Adsorption Kinetics // *J. Colloid Interface Sci.* 1995. Vol. 173, № 1. P. 16–27.
108. Lad M.D. et al. The adsorbed conformation of globular proteins at the air/water interface // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2006. Vol. 8, № 18. P. 2179–2186.
109. Alahverdjieva V.S. et al. Adsorption behaviour of hen egg-white lysozyme at the air/water interface // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 2008. Vol. 323, № 1–3. P. 167–174.

110. Sengupta T., Damodaran S. A new methodology for studying protein adsorption at oil-water interfaces // *J. Colloid Interface Sci.* 1998. Vol. 206, № 2. P. 407–415.
111. Alahverdijeva V.S. et al. Competitive adsorption from mixed hen egg-white lysozyme/surfactant solutions at the air-water interface studied by tensiometry, ellipsometry, and surface dilational rheology // *J. Phys. Chem. B.* 2008. Vol. 112, № 7. P. 2136–2143.
112. Hunter J.R., Kilpatrick P.K., Carbonell R.G. Lysozyme adsorption at the air/water interface // *J. Colloid Interface Sci.* 1990. Vol. 137, № 2. P. 462–482.
113. Graham D.E., Phillips M.C. Proteins at liquid interfaces. II. Adsorption isotherms // *J. Colloid Interface Sci.* 1979. Vol. 70, № 3. P. 415–426.
114. Damodaran S., Sengupta T. Dynamics of competitive adsorption of α s-casein and β -casein at planar triolein-water interface: Evidence for incompatibility of mixing in the interfacial film // *J. Agric. Food Chem.* 2003. Vol. 51, № 6. P. 1658–1665.
115. Xu S., Damodaran S. The Role of Chemical Potential in the Adsorption of Lysozyme at the Air-Water Interface // *Langmuir.* 1992. Vol. 8, № 8. P. 2021–2027.
116. Anand K., Damodaran S. Kinetics of adsorption of lysozyme and bovine serum albumin at the air-water interface from a binary mixture // *J. Colloid Interface Sci.* 1995. Vol. 176, № 1. P. 63–73.
117. Kim G. et al. Investigations of lysozyme adsorption at the air/water and quartz/water interfaces by vibrational sum frequency spectroscopy // *Langmuir.* 2002. Vol. 18, № 7. P. 2807–2811.
118. Postel C., Abillon O., Desbat B. Structure and denaturation of adsorbed lysozyme at the air-water interface // *J. Colloid Interface Sci.* 2003. Vol. 266, № 1. P. 74–81.
119. Kotsmar C. et al. Thermodynamics, adsorption kinetics and rheology of mixed protein-surfactant interfacial layers // *Advances in Colloid and Interface Science.* 2009. Vol. 150, № 1. P. 41–54.
120. Lu J.R. et al. Structural conformation of lysozyme layers at the air/water interface studied by neutron reflection // *J. Chem. Soc. - Faraday Trans.* 1998. Vol. 94. P. 3279–3287.
121. Lu J.R., Su T.J., Howlin B.J. The effect of solution pH on the structural conformation of lysozyme layers adsorbed on the surface of water // *J. Phys. Chem. B.* 1999. Vol. 103, № 28. P. 5903–5909.

122. Tihonov M.M., Milyaeva O.Y., Noskov B.A. Dynamic surface properties of lysozyme solutions. Impact of urea and guanidine hydrochloride // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2015. Vol. 129. P. 114–120.
123. Perriman A.W. et al. Effect of the air-water interface on the structure of lysozyme in the presence of guanidinium chloride // *J. Phys. Chem. B*. 2008. Vol. 112, № 31. P. 9532–9539.
124. Malcolm A.S., Dexter A.F., Middelberg A.P.J. Mechanical properties of interfacial films formed by lysozyme self-assembly at the air-water interface // *Langmuir*. 2006. Vol. 22, № 21. P. 8897–8905.
125. Cieplak M. et al. Proteins at air-water interfaces: A coarse-grained model // *Langmuir*. American Chemical Society, 2014. Vol. 30, № 43. P. 12888–12896.
126. Badun G.A., Soboleva O.A., Chernysheva M.G. Surfactant adsorption at the water-p-xylene interface as studied by the scintillation phase method // *Mendeleev Commun.* 2007. Vol. 17, № 6. P. 357–358.
127. Fainerman V.B. et al. Thermodynamics, interfacial pressure isotherms and dilational rheology of mixed protein-surfactant adsorption layers // *Advances in Colloid and Interface Science*. 2016. Vol. 233. P. 200–222.
128. Krägel J., Derkatch S.R., Miller R. Interfacial shear rheology of protein-surfactant layers // *Advances in Colloid and Interface Science*. 2008. Vol. 144, № 1–2. P. 38–53.
129. Roberts S.A. et al. Combined surface pressure-interfacial shear rheology study of the effect of pH on the adsorption of proteins at the air-water interface // *Langmuir*. 2005. Vol. 21, № 16. P. 7342–7348.
130. Freer E.M. et al. Interfacial Rheology of Globular and Flexible Proteins at the Hexadecane/Water Interface: Comparison of Shear and Dilatation Deformation // *J. Phys. Chem. B*. 2004. Vol. 108, № 12. P. 3835–3844.
131. Freer E.M. et al. Shear and dilatational relaxation mechanisms of globular and flexible proteins at the hexadecane/water interface // *Langmuir*. 2004. Vol. 20, № 23. P. 10159–10167.
132. Fainerman V.B., Lucassen-Reynders E.H., Miller R. Description of the adsorption behaviour of proteins at water/fluid interfaces in the framework of a two-dimensional solution model // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2003. Vol. 106, № 1–3. P. 237–259.
133. Bergfreund J., Bertsch P., Fischer P. Adsorption of proteins to fluid interfaces: Role of

- the hydrophobic subphase // *J. Colloid Interface Sci.* 2021. Vol. 584. P. 411–417.
134. Noskov B.A., Tikhonov M.M. Effect of sodium dodecyl sulfate on dynamic surface properties of lysozyme solutions // *Colloid J.* 2012. Vol. 74. P. 248–253.
 135. Arooj M. et al. Adsorption and Unfolding of Lysozyme at a Polarized Aqueous-Organic Liquid Interface // *J. Phys. Chem. B.* 2016. Vol. 120, № 12. P. 3100–3112.
 136. Kotsmar C. et al. Dilation and shear rheology of mixed β -casein/surfactant adsorption layers // *J. Phys. Chem. B.* 2009. Vol. 113, № 1. P. 103–113.
 137. Maldonado-Valderrama J., Patino J.M.R. Interfacial rheology of protein-surfactant mixtures // *Current Opinion in Colloid and Interface Science.* 2010. Vol. 15, № 4. P. 271–282.
 138. Dan A. et al. Interfacial rheology of mixed layers of food proteins and surfactants // *Current Opinion in Colloid and Interface Science.* 2013. Vol. 18, № 4. P. 302–310.
 139. Derkach S.R. Interfacial layers of complex-forming ionic surfactants with gelatin // *Advances in Colloid and Interface Science.* 2015. Vol. 222. P. 172–198.
 140. Miller R. et al. Adsorption of proteins at the aqueous solution/alkane interface: Co-adsorption of protein and alkane // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2015. Vol. 222. P. 509–516.
 141. Baldursdottir S.G., Jorgensen L. The influence of size, structure and hydrophilicity of model surfactants on the adsorption of lysozyme to oil-water interface-Interfacial shear measurements // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2011. Vol. 87, № 1. P. 96–102.
 142. Fainerman V.B. et al. Effect of the Intrinsic Compressibility on the Dilational Rheology of Adsorption Layers of Surfactants, Proteins and Their Mixtures // *Colloid Stability: The Role of Surface Forces - Part I.* 2011. Vol. 1. P. 307–333.
 143. Fainerman V.B. et al. Adsorption of surfactants and proteins at the interface between their aqueous solution drop and air saturated by hexane vapour // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 2017. Vol. 521. P. 211–220.
 144. Fainerman V.B. et al. Competitive adsorption from mixed nonionic surfactant/protein solutions // *J. Colloid Interface Sci.* 2004. Vol. 274, № 2. P. 496–501.
 145. Wüstneck R. et al. Surface dilatational behavior of β -casein at the solution/air interface at different pH values // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 2012. Vol. 404. P. 17–24.
 146. Fainerman V.B. et al. Adsorption from mixed ionic surfactant/protein solutions:

- Analysis of ion binding // *J. Phys. Chem. B.* 2004. Vol. 108, № 43. P. 16780–16785.
147. Miller R. et al. Surface tension of mixed non-ionic surfactant/protein solutions: Comparison of a simple theoretical model with experiments // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 2004. Vol. 233, № 1–3. P. 39–42.
148. Badun G.A. et al. Liquid scintillation spectrometry of tritium in the investigation of compound adsorption at a water/nonpolar liquid interface // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2009. Vol. 64, № 5. P. 282–288.
149. Krauser J.A. A perspective on tritium versus carbon-14: Ensuring optimal label selection in pharmaceutical research and development // *J. Label. Compd. Radiopharm.* 2013. Vol. 56, № 9–10. P. 441–446.
150. Hermanson G.T. *Isotopic Labeling Techniques // Bioconjugate Techniques.* 2013. P. 507–534.
151. Pockes S., Tropmann K. Histamine H₂receptor radioligands: Triumphs and challenges // *Future Med. Chem. Future Medicine Ltd.,* 2021. Vol. 13, № 12. P. 1073–1081.
152. Pająk M. et al. The chemo- enzymatic synthesis of labeled l-amino acids and some of their derivatives // *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry.* 2018. Vol. 317, № 2. P. 643–666.
153. Holtzhauer M. *Basic Methods for the Biochemical Lab // Springer Berlin, Heidelberg.* Springer, Berlin, Heidelberg, 2006. 251 p.
154. Kelman Z., Naktinis V., O'Donnell M. Radiolabeling of proteins for biochemical studies // *Methods Enzymol.* 1995. Vol. 262. P. 430–442.
155. Catalgol B., Grune T. Turnover of oxidatively modified proteins: the usage of in vitro and metabolic labeling // *Free Radical Biology and Medicine.* 2009. Vol. 46, № 1. P. 8–13.
156. Уракова И.Н. et al. Распределение меченного йодом-123 пептидно-белкового препарата целлекс у крыс // *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2018. № 4. P. 89–94.
157. Brash J.L., Ten Hove P. Protein Adsorption Studies on “Standard” Polymeric Materials // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1993. Vol. 4, № 6. P. 591–599.
158. Wojciechowski P., Brash J.L. The vroman effect in tube geometry: The influence of flow on protein adsorption measurements // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1991. Vol. 2, № 3. P. 203–216.

159. Anderson J.M. et al. Protein adsorption and macrophage activation on polydimethylsiloxane and silicone rubber // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1995. Vol. 7, № 2. P. 159–169.
160. Gölander C.G. et al. Adsorption of human lysozyme and adsorbate enzyme activity as quantified by means of total internal reflection fluorescence, ¹²⁵I labelling and ESCA // *Colloids and Surfaces.* 1990. Vol. 50. P. 113–130.
161. Park P.W. et al. Lysozyme binds to elastin and protects elastin from elastase-mediated degradation // *J. Invest. Dermatol.* 1996. Vol. 106, № 5. P. 1075–1080.
162. Chernysheva M.G., Badun G.A. In vitro study of proteins surface activity by tritium probe // *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 2010. Vol. 286, № 3. P. 835–840.
163. Бадун Г.А. et al. Новый вариант метода сцинтиллирующей фазы // *Радиохимия.* 2005. Vol. 47, № 6. P. 536–540.
164. Sengupta T., Razumovsky L., Damodaran S. Energetics of protein-interface interactions and its effect on protein adsorption // *Langmuir.* 1999. Vol. 15, № 20. P. 6991–7001.
165. Xu S., Damodaran S. Kinetics of Adsorption of Proteins at the Air–Water Interface from a Binary Mixture // *Langmuir.* 1994. Vol. 10, № 2. P. 472–480.
166. Voges R., Heys J.R., Moenius T. Preparation of Compounds Labeled with Tritium and Carbon-14 // *John Wiley & Sons (CША).* 2009. 664 p.
167. Bush G.A. et al. Ion beam tritium labeling of proteins and peptides. // *J. Biol. Chem.* 1981. Vol. 256, № 23. P. 12213–12221.
168. Peng C.T., Souers P.C. Evaluation of different methods for tritium labelling // *Fusion Technol.* 1992. Vol. 21, № 2 pt 2. P. 307–311.
169. Saljoughian M., Williams P. Recent Developments in Tritium Incorporation for Radiotracer Studies // *Curr. Pharm. Des.* 2005. Vol. 6, № 10. P. 1029–1056.
170. Saljoughian M. Synthetic tritium labeling: Reagents and methodologies // *Synthesis.* 2002. № 13. P. 1781–1801.
171. Peng C.T.T. labeling of peptides and proteins: A. critical review, Hua R.L. Tritium labeling of peptides and proteins: A Review // *Fusion Technol.* 1985. Vol. 8, № 2P2. P. 2265–2272.
172. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф. Меченные тритием липофильные соединения / ed. Федосеев В.М. Москва: Наука, 2003. 246 p.

173. Milacek M. et al. Binding of de novo synthesized radiolabeled juvenile hormone (JH III) by JH receptors from the Cuban subterranean termite *Prorhinotermes simplex* and the German cockroach *Blattella germanica* // *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2021. Vol. 139. P. 103671.
174. Vogensen S.B. et al. New synthesis and tritium labeling of a selective ligand for studying high-affinity γ -hydroxybutyrate (GHB) binding sites // *J. Med. Chem.* 2013. Vol. 56, № 20. P. 8201–8205.
175. Maxwell R.A., Anderson R.J., Schooley D.A. Simultaneous Preparation of Both Enantiomers of Juvenile Hormones Labeled at C-10 with Tritium at High Specific Activity // *Anal. Biochem.* Academic Press, 2002. Vol. 305, № 1. P. 40–48.
176. Tinnacher R.M., Honeyman B.D. A new method to radiolabel natural organic matter by chemical reduction with tritiated sodium borohydride // *Environ. Sci. Technol.* 2007. Vol. 41, № 19. P. 6776–6782.
177. Tack B.F. et al. Tritium labeling of proteins to high specific radioactivity by reduction methylation. // *J. Biol. Chem.* 1980. Vol. 255, № 18. P. 8842–8847.
178. Kopf S. et al. Recent Developments for the Deuterium and Tritium Labeling of Organic Molecules // *Chemical Reviews.* American Chemical Society, 2022. Vol. 122, № 6. P. 6634–6718.
179. Lockley W.J.S., Hesk D. Rhodium- and ruthenium-catalysed hydrogen isotope exchange // *J. Label. Compd. Radiopharm.* 2010. Vol. 53, № 11–12. P. 704–715.
180. Atzrodt J. et al. C–H Functionalisation for Hydrogen Isotope Exchange // *Angewandte Chemie - International Edition.* 2018. Vol. 57, № 12. P. 3022–3047.
181. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф. Введение изотопов водорода в биологически активные соединения // *Радиохимия.* 2022. Vol. 64, № 4. P. 303–349.
182. Шевченко В.П. et al. Получение меченного дейтерием β -аланил-L-гистидина изотопным обменом // *Радиохимия.* 2022. Vol. 64, № 6. P. 568–572.
183. Shevchenko V.P. et al. Synthesis of deuterium-labeled pyrrolylcarnosine // *Doclady Biochem. Biophys.* 2022. Vol. 507. P. 374–379.
184. Zolotarev Y.A. et al. Solid state isotope exchange with spillover hydrogen in organic compounds // *Chem. Rev.* 2010. Vol. 110, № 9. P. 5425–5446.
185. Zolotarev Y.A. et al. New development in the solid-state isotope exchange with spillover hydrogen in organic compounds // *J. Phys. Chem. C.* 2013. Vol. 117, № 33.

- P. 16878.
186. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф. Твердофазный метод введения тритиевой метки в биологически активные соединения // Успехи Химии. 2003. Vol. 72, № 5. P. 471–497.
 187. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф. Гетерогенный каталитический синтез меченных изотопами водорода органических соединений без участия растворителей // Радиохимия. 2018. Vol. 60, № 2. P. 97–127.
 188. Разживина И.А. et al. Полимерные пленки как индикатор спилловера водорода через газовую фазу // Радиохимия. 2017. Vol. 59, № 3. P. 248–254.
 189. Shen H. et al. Magic of hydrogen spillover: Understanding and application // Green Energy and Environment. 2022. P. in press, corrected proof DOI: 10.1016/j.gee.2022.
 190. Zolotarev Y.A. et al. The effect of three-dimensional structure on the solid state isotope exchange of hydrogen in polypeptides with spillover hydrogen // Bioorg. Chem. 2003. Vol. 31, № 6. P. 453–463.
 191. Zolotarev Y.A. et al. Solid phase reaction of hemoglobin with spillover hydrogen // Russ. J. Bioorganic Chem. 2009. Vol. 35, № 1. P. 24–32.
 192. Zolotarev Y.A. et al. Solid phase isotope exchange of deuterium and tritium for hydrogen in human recombinant insulin // Russ. J. Bioorganic Chem. 2014. Vol. 40, № 1. P. 26–35.
 193. Saha G.B. Fundamentals of Nuclear Pharmacy Seventh Edition // Springer Cham. 2018. 428 p.
 194. Ohto-Fujita E. et al. Application of neutron-irradiated ${}^6\text{Li}$ (n, α) ${}^3\text{H}$ reaction to a protein-based fibrous non-woven fabric biopolymer: Radiolabeling of cross-linked natural fibrous chicken eggshell membranes and their whole-body tissue distribution after oral ingestion in mice // J. Fiber Sci. Technol. 2021. Vol. 77, № 6. P. 182–187.
 195. Lively M.O. et al. Tritium labeling of thermolysin, elastase, and ribonuclease by exposure to tritium gas at low pressure // Arch. Biochem. Biophys. 1980. Vol. 204, № 2. P. 589–599.
 196. Tschesche H., Behr W., Wick R. Insulin and Proteins Labeled by Microwave Discharge Activation of Tritium // Insulin, chemistry, structure, and function of insulin and related hormones. De Gruyter, 2019. P. 185–190.
 197. Badun G.A., Chernysheva M.G., Ksenofontov A.L. Increase in the specific

- radioactivity of tritium-labeled compounds obtained by tritium thermal activation method // *Radiochim. Acta*. 2012. Vol. 100, № 6. P. 401–408.
198. Чернышева М.Г. et al. Неравновесные процессы при взаимодействии горячих атомов трития с охлажденными твердыми мишенями. Влияние температуры атомизатора на образование меченых веществ // *Радиохимия*. 2007. Vol. 49, № 2. P. 166–169.
199. Chernysheva M.G., Myasnikov I.Y., Badun G.A. Myramistin adsorption on detonation nanodiamonds in the development of drug delivery platforms // *Diam. Relat. Mater.* 2015. Vol. 55. P. 45–51.
200. Badun G.A. et al. Kinetic features of labeled product formation under the action of atomic tritium on frozen solutions and lyophilically dried mixtures of amino acids // *Radiochemistry*. 2001. Vol. 43. P. 306–310.
201. Соломатин А.С. et al. Получение меченного тритием амикацина и его сорбционная иммобилизация на функционализированных наноалмазах // *Вестник Московского университета. Серия 2 Химия*. 2018. Vol. 59, № 3. P. 179–188.
202. Иванов Р.А. et al. Адсорбция и распределение компонентов смесей кокоамидопропил бетаина и лизоцима в системе вода/октан // *Коллоидный журнал*. 2014. Vol. 76, № 3. P. 347–355.
203. Чернышева М.Г., Тясто З.А., Бадун Г.А. Аномальное поведение п-трет-октилфенилового эфира полиэтиленгликоля (тритона X-100) в системе вода/циклогексан // *Физическая химия поверхностных явлений*. 2009. Vol. 83, № 2. P. 356–360.
204. Chernysheva M.G. et al. Competitive adsorption of lysozyme and non-ionic surfactants (Brij-35 and pluronic P123) from a mixed solution at water-air and water-xylene interfaces // *Colloid Polym. Sci.* 2018. Vol. 296, № 1. P. 223–232.
205. Razzhivina I.A. et al. Influence of Carbon Material Supports on the Efficiency of the Isotope Exchange between Dalargin and Tritium // *Radiochemistry*. 2019. Vol. 61, № 1. P. 66–72.
206. Бадун Г.А. et al. Синтез полимерной субстанции “Кагоцел” меченной тритием: метод термической активации трития // *Фармация*. 2018. Vol. 67, № 7. P. 14–20.
207. Синолиц А.В., Чернышева М.Г., Бадун Г.А. Получение меченной тритием

- гиалуроновой кислоты методом термической активации трития // Радиохимия. 2021. Vol. 63, № 4. P. 395–400.
208. Gallyamov M.O. et al. Collagen tissue treated with chitosan solutions in carbonic acid for improved biological prosthetic heart valves // Mater. Sci. Eng. C. 2014. Vol. 37, № 1. P. 127–140.
209. Mozhaev V. V. et al. Homogeneous solutions of hydrophilic enzymes in nonpolar organic solvents New systems for fundamental studies and biocatalytic transformations // FEBS Lett. 1991. Vol. 292, № 1–2. P. 159–161.
210. Badun G.A. et al. A new technique for tritium labeling of humic substances // Radiochim. Acta. 2010. Vol. 98, № 3. P. 161–166.
211. Badun G.A. et al. Tritium labeling: A unique tool for studying the behavior of humic substances in living systems // Moscow Univ. Chem. Bull. 2009. Vol. 64, № 5. P. 276–281.
212. Шишков А.В., Нейман Л.А., Смоляков В.С. Получение меченых органических соединений действием атомарного трития // Успехи Химии. 1984. Vol. 53, № 7. P. 1125–1151.
213. Бадун Г.А., Чернышева М.Г. Метод термической активации трития. Особенности применения, современные достижения и дальнейшие перспективы развития // Радиохимия. 2023. Vol. 65, № 2. P. 158–171.
214. Сидоров Г.В. et al. Сравнительное изучение реакций термически активированного трития и твердофазной каталитической гидрогенизации тритием с сахарами и диазинами // Радиохимия. 2005. Vol. 47, № 3. P. 284–288.
215. Бадун Г.А. et al. Сравнительное исследование взаимодействия атомарного трития с глюкозамином и аминокислотами // Радиохимия. 2005. Vol. 47, № 3. P. 281–283.
216. Langmuir I. The dissociation of hydrogen into atoms // J. Am. Chem. Soc. 1912. Vol. 34, № 7. P. 860–877.
217. Moser H.C., Nordin P., Senne J.K. Labeling carbohydrates by exposure to energetic tritium atoms // Int. J. Appl. Radiat. Isot. 1964. Vol. 15, № 9. P. 557–559.
218. Вольнская А.В. et al. О механизме разворачивания лизоцима // Доклады академии наук. 2010. Vol. 430, № 5. P. 643–646.
219. Shishkov A. V, Baratova L.A. Tritium planigraphy of biological systems // Russ. Chem. Rev. 1994. Vol. 63, № 9. P. 781–796.

220. Богачева Е.Н. et al. Тритиевая планиграфия как инструмент исследования структурной организации нанобиокомплексов // *Химическая физика*. 2012. Vol. 31, № 8. P. 45–49.
221. Baratova L.A. et al. Tritium planigraphy of biological macromolecules // *Nauka Moscow*. 1999. 174 p.
222. Богачева Е.Н., Гольданский В.И., Шишков А.В. Моделирование пространственной структуры глобулярных белков по данным метода тритиевой планиграфии // *Химическая физика*. 2003. Vol. 22, № 2. P. 8–15.
223. Богачева Е.Н. et al. Построение моделей пространственной структуры белков по данным тритиевой планиграфии // *Молекулярная биофизика*. 2011. Vol. 56, № 6. P. 1024–1037.
224. Volynskaya A. V. et al. Determination of the accessible surface of globular proteins by means of tritium planigraphy // *Eur. Biophys. J.* 1994. Vol. 23, № 2. P. 139–143.
225. Agafonov D.E., Kolb V.A., Spirin A.S. Proteins on ribosome surface: Measurements of protein exposure by hot tritium bombardment technique // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997. Vol. 94, № 24. P. 12892–12897.
226. Tsetlin V.I. et al. Tritium thermal activation study of bacteriorhodopsin topography // *Eur. J. Biochem.* 1988. Vol. 178, № 1. P. 123–129.
227. Shishkov A. V. et al. Studying the spatial organization of membrane proteins by means of tritium stratigraphy: Bacteriorhodopsin in purple membrane // *Bioelectrochemistry*. 2002. Vol. 56, № 1–2. P. 147–149.
228. Goldanskii V.I. et al. The use of thermally activated tritium atoms for structural-biological investigations: The topography of the TMV protein-accessible surface of the virus // *J. Mol. Biol.* 1988. Vol. 201, № 3. P. 567–574.
229. Dobrov E.N. et al. Tritium planigraphy comparative structural study of tobacco mosaic virus and its mutant with altered host specificity // *Eur. J. Biochem.* 2003. Vol. 270, № 16. P. 3300–3308.
230. Ksenofontov A.L. et al. Surface characterization of the thermal remodeling helical plant virus // *PLoS One*. 2019. Vol. 14, № 5. P. e0216905.
231. Baratova L.A. et al. The topography of the surface of potato virus X: Tritium planigraphy and immunology analysis // *J. Gen. Virol.* 1992. Vol. 73, № 2. P. 229–235.
232. Baratova L.A. et al. The organization of potato virus X coat proteins in virus particles

- studied by tritium planigraphy and model building // *Virology*. 1992. Vol. 188, № 1. P. 175–180.
233. Lukashina E. et al. Tritium planigraphy study of structural alterations in the coat protein of Potato virus X induced by binding of its triple gene block 1 protein to virions // *FEBS J*. 2009. Vol. 276, № 23. P. 7006–7015.
234. Baratova L.A. et al. In Situ Spatial Organization of Potato Virus A Coat Protein Subunits as Assessed by Tritium Bombardment // *J. Virol*. 2001. Vol. 75, № 20. P. 9696–9702.
235. Богачева Е.Н. et al. Взаимодействие потока атомов трития с поверхностью наноразмерных частиц вируса гриппа А // *Перспективные материалы*. 2010. № 8. P. 174–177.
236. Shishkov A. et al. The In Situ Structural Characterization of the Influenza A Virus Matrix M1 Protein within a Virion // *Protein Pept. Lett*. 2009. Vol. 16, № 11. P. 1407–1413.
237. Shtykova E. V. et al. Structural analysis of influenza a virus matrix protein M1 and Its self-assemblies at low pH // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, № 12. P. e82431.
238. Shishkov A. V. et al. The in situ spatial arrangement of the influenza A virus matrix protein M1 assessed by tritium bombardment // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 1999. Vol. 96, № 14. P. 7827–7830.
239. Ксенофонтов А.Л. et al. Количественное определение площади гликобелков на поверхности оболочечных вирусов // *Молекулярная биология*. 2008. Vol. 42, № 6. P. 1093–1096.
240. Bogacheva E.N. et al. Bioinformatics and structure modeling of nep protein help fight the influenza virus // *The Ninth European Conference on Biology and Medical Sciences*. 2016. P. 102–108.
241. Богачева Е.Н. et al. Структурная организация вириона вируса гриппа. Тритиевая планиграфия // *Перспективные материалы*. 2013. № S14. P. 462–467.
242. Шишков А.В., Богачева Е.Н. Тритиевая планиграфия и наноразмерные биологические частицы // *Химическая физика биологических процессов*. 2014. Vol. 33, № 7. P. 74–79.
243. Kordyukova L. V. et al. Studying liposomes by tritium bombardment // *Biosci. Rep*. 2001. Vol. 21, № 6. P. 711–718.

244. Бадун Г.А., Федосеев В.М. Проницаемость липидных мембран для атомарного трития или эффект «соскальзывания» атомов и его роль в методе тритиевой планиграфии // Радиохимия. 2001. Vol. 43, № 3. P. 267–271.
245. Dolgov A.A. et al. Tritium planigraphy in physico-chemical biology // The Ninth European Conference on Biology and Medical Sciences. 2016. P. 165–168.
246. Lukashina E. V., Badun G.A., Chulichkov A.L. Atomic tritium as an instrument for study of protein behavior at the air-water interface // Biomol. Eng. 2007. Vol. 24, № 1. P. 125–129.
247. Gedrovich A.V., Badun G.A. Studying a spatial structure of globular proteins using method of tritium planigraphy. Short peptides as a model of completely unfolded polypeptide chain // Mol. Biol. 1992. Vol. 26. P. 558–563.
248. Chernysheva M.G. et al. Self-organization of lysozyme—Ionic surfactant complexes at the aqueous-air interface as studied by tritium bombardment // Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 2017. Vol. 520. P. 1–8.
249. Chernysheva M.G. et al. Lysozyme-surfactant adsorption at the aqueous-air and aqueous-organic liquid interfaces as studied by tritium probe // Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. Elsevier, 2018. Vol. 537. P. 351–360.
250. Chernysheva M.G. et al. Structural peculiarities of lysozyme – PLURONIC complexes at the aqueous-air and liquid-liquid interfaces and in the bulk of aqueous solution // Int. J. Biol. Macromol. 2020. Vol. 158. P. 721–731.
251. Badun G.A. et al. Atomic tritium as a surface nanoprobe in a structural investigation of molecular assemblies // Mater. Sci. Eng. C. 2003. Vol. 23, № 6–8. P. 797–802.
252. Богачева Е.Н., Гедрович А.В., Шишков А.В. Айсберговая модель структуры адсорбционных слоев глобулярных белков на границе фаз вода-воздух. Исследование методом тритиевой планиграфии // Коллоидный журнал. 2004. Vol. 66, № 2. P. 166–169.
253. Алентьев А.Ю., Филатов Э.С. Радиометрический метод исследования межфазных границ двух несмешивающихся жидкостей // Радиохимия. 1991. Vol. 33, № 6. P. 80–87.
254. Chernysheva M.G., Badun G.A. Ionic surfactant adsorption at aqueous/organics interfaces determined by a scintillation phase method // Mendeleev Commun. 2011. Vol. 21, № 2. P. 99–100.

255. Sangster J. Octanol Water Partition Coefficients of Simple Organic Compounds // J. Phys. Chem. Ref. Data. 1989. Vol. 18, № 3. P. 1111–1227.
256. Cumming H., Rücker C. Octanol-Water Partition Coefficient Measurement by a Simple ¹H NMR Method // ACS Omega. 2017. Vol. 2, № 9. P. 6244–6249.
257. Shahzad Y. et al. Effects of drug-polymer dispersions on solubility and in vitro diffusion of artemisinin across a polydimethylsiloxane membrane // Chinese Sci. Bull. 2012. Vol. 57, № 14. P. 1685–1692.
258. Engelmann F.M. et al. Determination of n-octanol/water partition and membrane binding of cationic porphyrins // Int. J. Pharm. 2007. Vol. 329, № 1–2. P. 12–18.
259. Чернышева М.Г. et al. Радиохимический подход в исследовании конкурентной адсорбции сывороточного альбумина человека и ионогенных поверхностно-активных веществ на границе раздела вода/п-ксилол // Радиохимия. 2013. Vol. 55, № 2. P. 180–185.
260. Chernysheva M.G., Tyasto Z.A., Badun G.A. Scintillation phase method: A new approach for studying surfactant behavior at liquid/liquid interface // Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry. 2009. Vol. 280, № 2. P. 303–306.
261. Chernysheva M.G., Badun G.A. Radiochemical study of biopolymers sorption on hydrophobic surfaces // Chem. Phys. Technol. 2010. Vol. 1, № 3. P. 355–359.
262. Chernysheva, Maria G. Badun G.A. Liquid Scintillation Spectrometry of Tritium in Studying Lysozyme Behavior in Aqueous/Organic Liquid Systems. The Influence of the Organic Phase // Langmuir. 2011. Vol. 27, № 6. P. 2188–2194.
263. Chernysheva M.G. et al. Behavior of humic substances in the liquid-liquid system directly measured using tritium label // Chemosphere. 2020. Vol. 238. P. 124646.
264. Соболева О.А. et al. Распределение смесей додецилового эфира поли(23)этиленгликоля с додецилсульфатом натрия и бромидом додецилтриметиламмония в системе вода/октан // Журнал физической химии. 2012. Vol. 86, № 3. P. 460–465.
265. Chernysheva M.G., Soboleva O.A., Badun G.A. Adsorption of a surfactant mixture at a water-p-xylene interface as studied by a scintillation phase technique // Mendeleev Commun. 2008. Vol. 18, № 6. P. 345–346.
266. Chernysheva M.G., Soboleva O.A., Badun G.A. Competitive adsorption and interactions between lysozyme and ionic surfactants in an aqueous/organic liquid

- system // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 2012. Vol. 409. P. 130–137.
267. Chernysheva M.G. et al. Do low surfactants concentrations change lysozyme colloid properties? // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 2013. Vol. 436. P. 1121–1129.
268. Chernysheva M.G., Badun G.A. HS-protein associates in the aqueous/oil system: Composition and colloidal properties // *J. Soils Sediments*. 2014. Vol. 14, № 2. P. 280–291.
269. Miles A.J., Wallace B.A. Circular dichroism spectroscopy of membrane proteins // *Chemical Society Reviews*. 2016. Vol. 45, № 18.
270. Moore S., Spackman D.H., Stein W.H. Chromatography of Amino Acids on Sulfonated Polystyrene Resins: An Improved System // *Anal. Chem.* 1958. Vol. 30, № 7. P. 1185–1190.
271. Матолыгина Д.А. et al. Единый подход для расчета скорости ферментативного лизиса живых бактериальных клеточных субстратов турбидиметрическим методом // *Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия*. 2018. Vol. 59, № 2. P. 125–131.
272. Levashov P.A. et al. Quantitative turbidimetric assay of enzymatic gram-negative bacteria lysis // *Anal. Chem.* 2010. Vol. 82, № 5. P. 2161–2163.
273. Maroufi B. et al. Structural studies of hen egg-white lysozyme dimer: Comparison with monomer // *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*. 2008. Vol. 1784, № 7–8.
274. Чернышева М.Г. Новый подход к определению структурных особенностей комплексов белок-лиганд на межфазных границах и в объеме раствора (на примере лизоцима): дис. докт. хим. наук: 02.00.14, 02.00.11 - Моск. гос. университет, Москва, 2022. 193 p.
275. Chernysheva M.G. et al. Reduction of cytotoxicity of Myramistin by adsorption on nanodiamonds // *Mendeleev Commun.* 2017. Vol. 27, № 4. P. 421–423.
276. Badun G.A. et al. Mechanism of formation of adsorption complexes amikacin–detonation nanodiamond // *Mendeleev Commun.* 2019. Vol. 29, № 3. P. 318–319.
277. Shen T. et al. Levofloxacin and Amikacin Adsorption on Nanodiamonds: Mechanism and Application Prospects // *Colloids and Interfaces*. 2022. Vol. 6, № 2. P. 35.
278. European pharmacopoeia. 7th ed / ed. Council of Europe, European Pharmacopoeia Commission, Healthcare E.D. for the Q. of M.&. Strasbourg: Council Of Europe : European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, 2010. 3310 p.

279. Разживина И.А. et al. Влияние подложек углеродных материалов на эффективность изотопного обмена между даларгином и тритием // Радиохимия. 2019. Vol. 61, № 1.
280. Skrabkova H.S. et al. Complex of lysozyme and Myramistin: formation and adsorption at the water–xylene interface // Mendeleev Commun. 2020. Vol. 30, № 5.
281. Danov K.D. et al. Analytical modeling of micelle growth. 3. Electrostatic free energy of ionic wormlike micelles – Effects of activity coefficients and spatially confined electric double layers // J. Colloid Interface Sci. Elsevier Inc., 2021. Vol. 581. P. 262–275.
282. Chernysheva M.G. et al. Peculiarities of alkylamidopropyldimethylbenzylammonium (Miramistin) in the relationship to lysozyme in comparison with quaternary ammonium surfactants: Coadsorption at the interfaces, enzymatic activity and molecular docking // Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 2021. Vol. 629.
283. Birdi K.S. Handbook of surface and colloid chemistry, second edition // Handbook of Surface and Colloid Chemistry, Second Edition. 2002. 784 p.
284. Santos F.K.G. et al. Molecular behavior of ionic and nonionic surfactants in saline medium // Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 2009. Vol. 333, № 1–3. P. 156–162.
285. Ivanov I.B., Ananthapadmanabhan K.P., Lips A. Adsorption and structure of the adsorbed layer of ionic surfactants // Advances in Colloid and Interface Science. 2006. Vol. 123–126. P. 189–212.
286. Chauhan S. et al. Thermodynamics and micellization of cetyltrimethyl ammonium bromide in the presence of lysozyme // J. Mol. Liq. 2013. Vol. 187. P. 1–6.
287. Burlatsky S.F. et al. Surface tension model for surfactant solutions at the critical micelle concentration // J. Colloid Interface Sci. 2013. Vol. 393. P. 151–160.
288. Kim H.J., Decker E.A., McClements D.J. Impact of protein surface denaturation on droplet flocculation in hexadecane oil-in-water emulsions stabilized by β -lactoglobulin // J. Agric. Food Chem. 2002. Vol. 50, № 24. P. 7131–7137.
289. Ross S., Morrison I.D. On the alleged ideality of szyszkowski-langmuir adsorption // J. Colloid Interface Sci. 1983. Vol. 91, № 1. P. 244–247.
290. Dole M. A Theory of Surface Tension of Aqueous Solutions // J. Am. Chem. Soc. 1938. Vol. 60, № 4. P. 904–911.

291. Chernysheva M.G. et al. Lysozyme-dalargin self-organization at the aqueous-air and liquid-liquid interfaces // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2021. Vol. 202.
292. Engin O. et al. Driving forces for adsorption of amphiphilic peptides to the air-water interface // *J. Phys. Chem. B. American Chemical Society*, 2010. Vol. 114, № 34. P. 11093–11101.
293. Knecht V. et al. Structure Formation in Langmuir Peptide Films As Revealed from Coarse-Grained Molecular Dynamics Simulations // *Langmuir*. 2017. Vol. 33, № 26. P. 6492–6502.
294. Miñones Conde M. et al. How to obtain a well-spread monolayer of lysozyme at the air/water interfaces // *J. Colloid Interface Sci.* 2011. Vol. 361, № 1. P. 351–360.
295. Pollard M.L. et al. Phase behavior of sparingly soluble polyethoxylate monolayers at the air-water surface and its effect on dynamic tension // *Langmuir*. 1998. Vol. 14, № 25. P. 7222–7234.
296. Erickson J.S., Sundaram S., Stebe K.J. Evidence that the induction time in the surface pressure evolution of lysozyme solutions is caused by a surface phase transition // *Langmuir*. 2000. Vol. 16, № 11. P. 5072–5078.
297. Graham D.E., Phillips M.C. Proteins at liquid interfaces. III. Molecular structures of adsorbed films // *J. Colloid Interface Sci.* 1979. Vol. 70, № 3. P. 427–439.
298. Fainerman V.B., Miller R., Aksenenko E. V. Simple model for prediction of surface tension of mixed surfactant solutions // *Advances in Colloid and Interface Science*. 2002. Vol. 96, № 1–3. P. 339–359.
299. Ritter L.S. et al. Use of lysozyme as a standard for evaluating the effectiveness of a proteomics process // *J. Proteome Res.* 2005. Vol. 4, № 1. P. 153–160.
300. Wu F.G., Luo J.J., Yu Z.W. Unfolding and refolding details of lysozyme in the presence of β -casein micelles // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2011. Vol. 13, № 8. P. 3429–3436.
301. Meersman F. et al. Consistent picture of the reversible thermal unfolding of hen egg-white lysozyme from experiment and molecular dynamics // *Biophys. J.* 2010. Vol. 99, № 7. P. 2255–2263.
302. Bhattacharjee N. et al. Relating circular dichroism to atomic structure by means of MD simulations and computed CD spectra with α -peptoids as an example // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2020. Vol. 22, № 23. P. 13192–13200.
303. Ghosh A. et al. Self-Assembly of a Nine-Residue Amyloid-Forming Peptide Fragment

- of SARS Corona Virus E-Protein: Mechanism of Self Aggregation and Amyloid-Inhibition of hIAPP // *Biochemistry*. 2015. Vol. 54, № 13. P. 2249–2261.
304. Duman O., Tunç S., Kancı Bozoğlan B. Characterization of the binding of metoprolol tartrate and guaifenesin drugs to human serum albumin and human hemoglobin proteins by fluorescence and circular dichroism spectroscopy // *J. Fluoresc.* 2013. Vol. 23, № 4. P. 659–669.
305. Shanmugaraj K., Anandakumar S., Ilanchelian M. Unraveling the binding interaction of Toluidine blue O with bovine hemoglobin - A multi spectroscopic and molecular modeling approach // *RSC Adv.* 2015. Vol. 5, № 6. P. 3930–3940.
306. Blake C.C.F. et al. Structure of hen egg-white lysozyme: A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution // *Nature*. 1965. Vol. 206. P. 757–761.
307. Shnitko A. V. et al. Pluronics and Brij-35 Reduce the Bacteriolytic Activity of Lysozyme // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2020. Vol. 75, № 2. P. 92–95.
308. Ritchie D.W., Kemp G.J.L. Protein docking using spherical polar Fourier correlations // *Proteins Struct. Funct. Genet.* 2000. Vol. 39, № 2. P. 178–194.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает огромную благодарность своим научным руководителям к.х.н. Бадуну Геннадию Александровичу и д.х.н. Чернышевой Марии Григорьевне за непосредственное участие, взаимопонимание, помощь и поддержку на протяжении всей работы, а также за ценные советы, замечания и обсуждения в ходе подготовки диссертации.

Автор выражает благодарность: к.х.н. Ксенофонтову А.Л. (НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова) за помощь в проведении аминокислотного анализа; к. ф.-м. н. Арутюняну А.М. (НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова) за помощь в получении и интерпретации спектров кругового дихроизма; к.х.н. Байгильдиеву Т.М. за помощь в проведении ВЭЖХ-МС анализа триптических пептидов; всему коллективу лаборатории Радионуклидов и меченых соединений кафедры радиохимии МГУ.

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