

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М. В. Ломоносова

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ



На правах рукописи

Растрига Николай Владимирович

Низкомолекулярные эффекторы лизоцима: влияние на активность фермента и его адсорбцию на бактериальных клетках

1.5.4. Биохимия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
Доктор химических наук,
П.А. Левашов

Москва – 2025

Оглавление

1.	ВВЕДЕНИЕ	5
1.1.	Актуальность темы исследования	5
1.2.	Степень разработанности темы исследования	6
1.3.	Цели и задачи исследования.....	7
1.4.	Научная новизна	7
1.5.	Теоретическая и практическая значимость работы	8
1.6.	Положения, выносимые на защиту	8
1.1.	Личный вклад автора	9
1.2.	Степень достоверности и апробация результатов.....	9
1.3.	Публикации	10
1.4.	Структура и объем работы	10
2.	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
2.1.	Представление о бактериолитических ферментах	10
2.2.	Лизоцим.....	12
2.2.1.	Разнообразие форм и функций лизоцима	12
2.2.2.	Куриный лизоцим.....	15
2.2.3.	Механизм действия лизоцима	18
2.2.4.	Человеческий лизоцим.....	20
2.3.	<i>Escherichia coli</i>	22
2.3.1.	Биохимия и особенности культивируемых штаммов <i>E. coli</i>	23
2.3.2.	Транспортные системы аминокислот в <i>E. coli</i>	25
2.4.	<i>Priestia megaterium</i>	26
2.5.	Строение клеточной стенки бактерий	26
2.5.1.	Пептидогликан	27
2.5.2.	Клеточная стенка <i>E. coli</i> и <i>P. megaterium</i>	29
2.6.	Бактериальные механизмы противодействия лизоциму	32
2.6.1.	Химическая модификация пептидогликана.....	32

2.6.2.	Изменение заряда и целостности клеточной оболочки	34
2.6.3.	Периплазматические ингибиторы лизоцима	35
2.7.	Совместное действие эффекторов ферментов	35
2.8.	Вещества, влияющие на лизис бактерий лизоцимом	38
2.8.1.	Глицин и заряженные аминокислоты	41
2.8.2.	Ионы кальция	45
2.9.	Методы регистрации бактериолитической активности	47
2.10.	Турбидиметрический метод анализа	50
2.11.	Адсорбция лизоцима на клетках	53
3.	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	55
3.1.	Материалы и оборудование	55
3.2.	Методы исследования	56
3.2.1.	Измерение бактериолитической активности	56
3.2.2.	Нахождение связи оптического поглощения клеточной суспензии и концентрации колониеобразующих единиц (КОЕ) в ней.	58
3.2.3.	Исследование адсорбции лизоцима на клетках <i>E. coli</i>	58
3.2.4.	Обработка суспензии клеток <i>E. coli</i> раствором ЭДТА	59
3.2.5.	Микроскопическое исследование бактериальных клеток <i>E. coli</i>	59
3.2.6.	Исследование роста бактериальных клеток <i>E. coli</i>	60
3.2.7.	Нахождение минимальной бактерицидной концентрации лизоцима	60
3.2.8.	Измерение спектров флуоресценции	61
3.2.9.	Молекулярный докинг	61
4.	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	62
4.1.	Влияние концентрации фермента, концентрации соли и рН на скорость лизиса клеток <i>E. coli</i> лизоцимом	62
4.2.	Раздельное влияние заряженных аминокислот и глицина на скорость лизиса клеток <i>E. coli</i> лизоцимом	69
4.3.	Совместное влияние заряженных аминокислот и глицина на скорость лизиса клеток <i>E. coli</i> лизоцимом	72

4.4. Сравнение бактериолитической активности лизоцима в присутствии одной аминокислоты, а также в сочетании двух и трех аминокислот.....	74
4.5. Влияние ионной силы на величину эффектов тройных сочетаний аминокислот	78
4.6. Сочетанное антибактериальное действие четырех и пяти заряженных аминокислот и лизоцима	79
4.7. Влияние заряженных аминокислот и глицина на скорость лизиса различных бактерий в присутствии лизоцима	86
4.8. Молекулярный докинг и выводы о молекулярных причинах изменения ферментативной активности в присутствии эффекторов	91
4.9. Спектры флуоресценции лизоцима в присутствии аминокислот.....	95
4.10. Связь адсорбции лизоцима на бактериях с бактериолитической активностью	98
4.11. Влияние ионной силы и рН на адсорбцию лизоцима на клетках <i>E. coli</i> ..	99
4.12. Влияние свободных аминокислот на адсорбцию лизоцима на клетках <i>E. coli</i> при разных рН	104
4.13. Совместное влияние заряженных аминокислот и глицина на адсорбцию лизоцима на клетках <i>E. coli</i>	109
4.14. Влияние ионов кальция на бактериолитическую активность лизоцима	117
4.15. Влияние ионов кальция на адсорбцию лизоцима на клетках <i>E. coli</i>	119
4.16. Совместное влияние ионов кальция и свободных аминокислот на адсорбцию лизоцима на клетках <i>E. coli</i>	121
4.17. Лизис клеток с удаленным поверхностным кальцием.....	128
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	133
Основные результаты и выводы	133
6. БЛАГОДАРНОСТИ	135
7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	137
8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	138

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1. Актуальность темы исследования

С каждым годом проблема антибиотикорезистентности бактерий становится все более и более острой. Уже обнаружены патогенные штаммы бактерий, устойчивые ко всем известным антибиотикам [1,2]. В этой бесконечной «гонке вооружений» между людьми, что вкладывают колоссальные средства в разработку все новых антибактериальных препаратов, и бактериями с их удивительной мутационной изменчивостью, позволяющей им крайне быстро приобретать устойчивость к антибиотикам, ученые все время оказываются на шаг позади. Однако существуют альтернативные подходы в решении этой проблемы. Бактериолитические ферменты – это природные ферменты, которые разрушают бактериальную клеточную стенку, вызывая лизис и гибель бактерий. Особый интерес представляет фермент лизоцим, который обладает не только бактериолитическим действием, но также проявляет противогрибковую [3–5], противовирусную [6–9] и даже противоопухолевую активность [10–12]. В настоящей работе мы проводим исследование двух типов лизоцима – куриного яичного, который получил широкое распространение в пищевой промышленности и медицине [13,14], а также человеческого, являющегося как ферментом, так и важным иммуномодулятором человека [15–17]. Бактериолитическая активность лизоцима зависит от ряда факторов, таких как рН, температура и ионная сила, однако существуют низкомолекулярные вещества, которые специфично регулируют его активность – эффекторы [18–22]. Так, было показано, что глицин и заряженные аминокислоты, в отличие от неполярных аминокислот (кроме глицина), существенно увеличивают скорость лизиса бактериальных клеток лизоцимом [18,21]. Аминокислоты являются безвредными, разрешенными к использованию компонентами биологических добавок и лекарственных средств, которые сами по себе в большом количестве содержатся в организме. Эффекты увеличения скорости лизиса клеток лизоцимом в присутствии заряженных аминокислот и глицина превосходили таковые для других низкомолекулярных веществ, например, для биогенных аминов триптамина и тирамина, а также милдроната и таурина [18]. Поэтому в данном исследовании в качестве эффекторов-активаторов лизиса клеток мы выбрали именно глицин и заряженные аминокислоты. Ионы кальция, которые являются одними из наиболее распространенных ионов в биологических жидкостях, наоборот, уменьшают активность лизоцима [23]. Их присутствие в растворе может замедлять протекание ферментативного лизиса клеток, поэтому нам было важно проверить,

способны ли добавки эффекторов-аминокислот преодолеть ингибирующее действие ионов кальция. Кроме того, совместное действие эффекторов-активаторов на лизис бактериальных клеток лизоцимом также не было изучено. Здесь следует отметить, что механизмы влияния низкомолекулярных эффекторов еще не выяснены. В настоящей работе мы демонстрируем связь между активностью лизоцима и его адсорбцией на поверхности живых бактериальных клеток в присутствии эффекторов. Так называемая «непродуктивная» адсорбция бактериолитического фермента на бактериальной клетке, которая, в отличие от «продуктивной», не приводит к протеканию каталитического акта, является одним из эффективных механизмов защиты бактерий против бактериолитических факторов [24,25]. Ввиду этого, исследование адсорбции лизоцима на живых бактериальных клетках обретает особую значимость. Изучение же совместного действия эффекторов позволит приблизиться к пониманию процесса ферментативного лизиса бактерий *in vivo*, а также отыскать комбинации эффекторов, обладающие фермент-активирующими свойствами пригодными для разработки новых эффективных антибактериальных препаратов на основе как куриного, так и человеческого лизоцимов.

1.2. Степень разработанности темы исследования

Была разработана и теоретически обоснована методика определения бактериолитической активности лизоцима турбидиметрическим методом анализа [26], а также методика изучения адсорбции лизоцима на живых бактериальных клетках [27]. Ранее в литературе было изучено действие различных аминокислот на лизис клеток *E. coli* куриным лизоцимом [18]. Было показано, что ароматические и неполярные аминокислоты не влияют на бактериолитическую активность лизоцима, в то время как глицин и заряженные кислоты увеличивают скорость лизиса клеток *E. coli* лизоцимом. Были также определены сорбционные параметры куриного лизоцима на клетках *Lactobacillus plantarum* при разном рН среды [28] и на клетках *Escherichia coli* при разной ионной силе буферного раствора [27]. Кроме того, в литературе сообщалось, что смеси двух и трех аминокислот усиливают антибактериальную активность миелопероксидазы [29]. Однако ранее не было исследовано совместное действие эффекторов на лизис клеток лизоцимом, а также на его адсорбцию на живых бактериальных клетках. Кроме того, лизис клеток человеческим лизоцимом и его адсорбция на клетках также не были изучены.

1.3. Цели и задачи исследования

Целью данного исследования является выявление основных закономерностей действия глицина, глутамата, лизина, гистидина, аргинина, аспартата и ионов кальция в разных сочетаниях на лизис бактериальных клеток *E. coli* куриным и человеческим лизоцимами. Исследование лизиса бактериальных клеток в присутствии смесей эффекторов позволит разработать новые эффективные лекарственные препараты на основе лизоцима, а также приблизиться к пониманию работы фермента *in vivo*.

Поставленные задачи:

1) Определить начальные скорости лизиса клеток *E. coli* куриным и человеческим лизоцимами в присутствии сочетаний глицина, глутамата, лизина, гистидина, аргинина, аспартата и ионов кальция.

2) Измерить максимальные сорбционные емкости клеток *E. coli* по отношению к куриному и человеческому лизоцимам и константы десорбции куриного и человеческого лизоцимов на бактериальных клетках *E. coli* в присутствии глицина, глутамата, лизина, гистидина, аргинина, аспартата и ионов кальция, а также в их двойных и тройных сочетаниях. Найти корреляцию между изменением сорбционных параметров лизоцима и скорости лизиса клеток *E. coli* в присутствии двойных и тройных сочетаний аминокислот.

3) Найти сочетания аминокислот, усиливающие антибактериальное действие куриного и человеческого лизоцима по отношению к разным бактериальным штаммам.

4) Исследовать принципиальную возможность взаимодействия поверхности лизоцима с аминокислотами-эффекторами.

1.4. Научная новизна

В работе впервые изучено сочетанное действие глицина, заряженных аминокислот и ионов кальция на лизис бактериальных клеток куриным и человеческим лизоцимами. Продемонстрирована связь между изменением сорбционных параметров человеческого и куриного лизоцимов на поверхности живых бактериальных клеток и активирующим действием эффекторов.

1.5. Теоретическая и практическая значимость работы

Исследование лизиса бактериальных клеток лизоцимом в присутствии эффекторов, которые являются компонентами биологических жидкостей человека, способствует более детальному пониманию функционирования лизоцима *in vivo*, а также путей регуляции его активности. Подобранные в настоящей работе сочетания аминокислот, в разы увеличивающие скорость лизиса клеток как куриным, так и человеческим лизоцимом в широком диапазоне рН и ионной силы, могут быть использованы в качестве дополнительной компоненты лекарственных препаратов, консервантов и дезинфицирующих средств на основе лизоцима, увеличивающей эффективность работы данного фермента.

1.6. Положения, выносимые на защиту

1) Начальная скорость лизиса клеток *E. coli* лизоцимом в присутствии смесей аминокислот-эффекторов существенно превосходит начальную скорость лизиса клеток *E. coli* лизоцимом в присутствии только одной аминокислоты. В присутствии ионов кальция начальная скорость лизиса бактериальных клеток лизоцимом уменьшается.

2) Заряженные аминокислоты и глицин уменьшают константу десорбции лизоцима на клетках *E. coli*, при этом константы десорбции лизоцима при совместном присутствии эффекторов ниже, чем в случае их отдельного действия. Ионы кальция уменьшают максимальную сорбционную емкость клеток *E. coli* по отношению к лизоциму.

3) Комбинация аминокислот (1,5 мМ глицина, по 5 мМ глутамата, лизина, аргинина и гистидина) понижает минимальную бактерицидную концентрацию куриного и человеческого лизоцимов с 175 мкг/мл до 125 мкг/мл по отношению к *E. coli*. Эффект увеличения скорости лизиса клеток лизоцимом в присутствии заряженных аминокислот и глицина зависит от природы субстрата – бактериальных клеток.

4) В связывании лизоцима с аминокислотами, предположительно, участвуют ароматические аминокислотные остатки белка. Наиболее вероятно, что в связывании куриного лизоцима с аминокислотами задействованы остатки Trp-123 и Trp-63, а у человеческого - Trp-34 и Trp-64.

1.1. Личный вклад автора

Представленные в настоящей работе данные были получены автором лично либо при его непосредственном участии на всех этапах проведения исследования под руководством Левашова П.А. Автором проведён самостоятельный анализ литературных источников и подготовлен соответствующий литературный обзор. Все экспериментальные исследования выполнены автором самостоятельно или при его активном участии, включая обработку и интерпретацию полученных данных. Автор внёс значительный вклад в подготовку текстов публикаций, их оформление и представление. В работах, опубликованных в соавторстве, определяющий вклад принадлежит автору. На защиту вынесены исключительно те положения и результаты, в получении которых роль автора являлась ключевой.

1.2. Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных экспериментальных данных обеспечена выполнением работы с помощью точных инструментальных методов, проведением повторных и контрольных измерений и обработкой полученных данных методом математической статистики.

Результаты работы представлены на научных конференциях: Международная научно-практическая конференция «Химия и АПК: актуальные вопросы и научные достижения», посвященная 100-летию со дня рождения А.Г. Малахова, Москва, Россия, 17-18 июня 2024; III Международная научно-практическая конференция «Концепция устойчивого развития: сельское хозяйство и окружающая среда» (ТАЕЕ-III-2024), Карши, Узбекистан, 22-24 мая 2024; Международный научный форум «Современные достижения и проблемы физиологии и кормления животных» ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, п. Дубровицы, Россия, 21-24 мая 2024; Четырнадцатая Всероссийская научная конференция с международным участием «Химическая термодинамика и кинетика», Тверь, Россия, 13-17 мая 2024; XXV Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы экологии и природопользования» (RIEEM-2024), Москва, Россия, 26-28 апреля 2024; XI Международная научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика», Москва, Россия, 14-16 ноября 2023; 13-я Международная научная конференция «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения», Суздаль, Россия, 25-29 июня 2023; VII съезд биофизиков России, Краснодар, 17-23 апреля 2023; XIII Молодежная школа-

конференция «Актуальные аспекты современной микробиологии», Москва, Россия, 16-18 ноября 2022; Девятый всероссийский симпозиум и школа-конференция молодых ученых «Кинетика и динамика сорбционных процессов», приуроченные к 150-летию со дня рождения М.С. Цвета, Сочи, Россия, 30 октября – 3 ноября 2022; Международная научно-практическая конференция «Инновации, технологические решения и менеджмент в современной биотехнологии и биомедицине» (ITSM-2022), Пушкино, Россия, 20 октября 2022; IUBMB–FEBS–FABMB Congress, Лиссабон, Португалия, 9 – 14 июля 2022; XXVII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2020», Москва, Россия, 20 ноября 2020.

1.3. Публикации

По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования «eLibrary Science Index», а также 3 публикации в сборниках конференций, индексируемых в базе «Scopus».

1.4. Структура и объем работы

Диссертация включает в себя следующие разделы: введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследований, результаты и их обсуждение, заключение и список литературы, включающий 356 ссылок. Диссертация изложена на 171 странице и включает 41 рисунок, 16 таблиц.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Представление о бактериолитических ферментах

Ферментативный лизис бактерий – это деструкция бактериальных клеток под действием различных белков, способных расщеплять пептидогликан (ПГ), он же муреин, – опорный полимерный компонент клеточной стенки (прочной внешней структуры) бактерий. ПГ состоит из регулярно чередующихся звеньев N-ацетилглюкозамина (NAG) и N-ацетилмурамовой кислоты (NAM) с ковалентно связанными с NAG олигопептидами [30].

На рис. 1 представлено строение ПГ, где стрелками указаны химические связи, которые подвергаются разрыву под действием разных бактериолитических факторов.

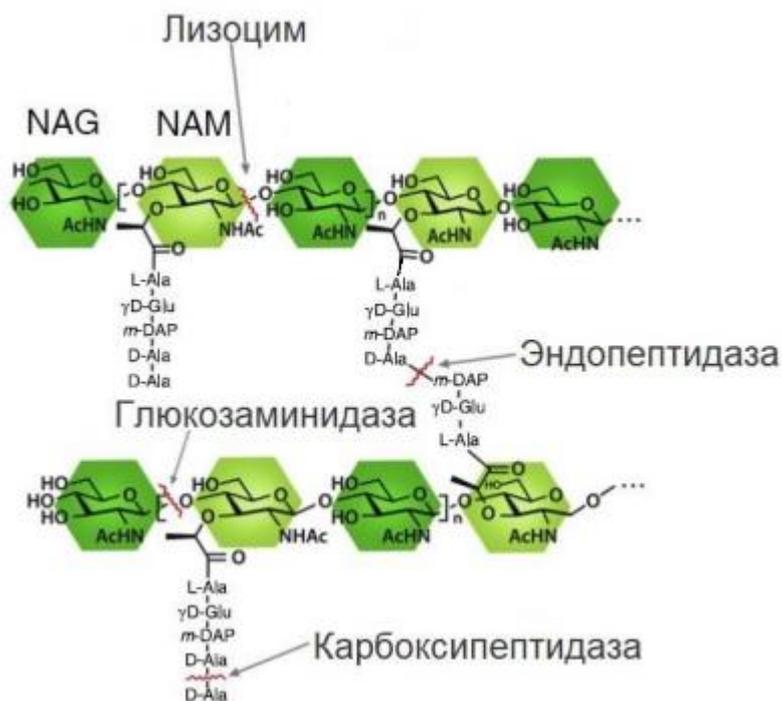


Рисунок 1. Структура ПГ и химические связи, гидролизуемые бактериолитическими ферментами. *m-DAP* – остаток мезо-диаминопимелиновой кислоты [31].

Бактериолитические ферменты экспрессируются представителями всех царств живой природы и в зависимости от организма выполняют различные функции. Если животные, грибы и растения используют бактериолитические ферменты в целях защиты, то бактерии экспрессируют их не только в целях защиты, но и для реструктуризации своей клеточной стенки [32–34].

Ввиду того, что муреин в составе своем имеет как углеводную, так и пептидную часть, бактериолитические ферменты по своей специфичности делятся на гликозидазы и пептидазы. Гликозидазы осуществляют деструкцию полисахаридной части ПГ, а пептидазы – олигопептидной. Гликозидазы принято подразделять на лизоцимы и глюкозаминидазы (рис. 1) [35]. Лизоцимы гидролизуют 1,4- β -гликозидную связь между остатками NAM и NAG в ПГ с образованием фрагмента углеводной цепи с остатком NAM на восстанавливающем конце [36]. В активном центре лизоцимов всегда присутствуют остатки аспарагиновой и глутаминовой кислот. В случае глюкозаминидаз на восстанавливающем конце полисахаридной цепи образуется остаток NAG, а не NAM [37]. Пептидазы, в свою очередь, различаются специфичностью гидролиза амидных связей в

пептидной части ПГ (рис. 1) [32,38,39]. Если карбопептидазы начинают последовательно разрушать олигопептидную цепочку с карбоксильной группы концевой аминокислоты, то эндопептидазы гидролизуют амидные связи внутри олигопептидного фрагмента ПГ [39].

2.2. Лизоцим

В данной работе мы исследуем куриный и человеческий лизоцимы, поэтому следует более подробно остановиться на описании этих бактериолитических ферментов подробнее.

Напомним, что лизоцимы (мурамидазы) – это гидролазы, осуществляющие реакцию гидролиза муреина (ПГ), основного компонента клеточной стенки бактерий, путем разрыва β -1,4-гликозидной связи между остатками NAM и NAG [36].

2.2.1. Разнообразие форм и функций лизоцима

На основе аминокислотной последовательности белка лизоцимы принято условно разделять на несколько типов. У животных представлено три основных типа: С (~11-15 кДа), G (~20-22 кДа), I (~11-15 кДа) [40,41]. У млекопитающих это, прежде всего, С (куриный) и G (гусиный) типы, различающиеся между собой примерно на 30% первичной структуры, что наводит на мысль об их близком эволюционном родстве [42,43]. Лизоцим I типа (беспозвоночный тип) преобладает у беспозвоночных животных, причем у кольчатых червей и моллюсков фермент обладает как мурамидазной, так и изопептидазной активностью, осуществляемой двумя независимыми каталитическими центрами [44]. В зависимости от строения белка и тканей, в которых происходит экспрессия фермента, лизоцим животных может осуществлять пищеварительные и защитные функции [45]. Лизоцим также обнаружен у бактериофагов (например, T4 и λ) [46,47]. Он позволяет вирусу разрушать клеточную стенку бактерии как для проникновения в клетку-хозяина, так и для дальнейшего высвобождения из нее. Лизоцимы бактериофагов относят к отдельному V типу (вирусному), но они структурно схожи с животными лизоцимами (вплоть до 70% гомологии) [42]. У бактерий также обнаружены лизоцимы, которые вместе с другими бактериолитическими ферментами используются для контролируемого разрушения клеточной стенки в целях ее перестройки, что позволяет осуществлять процесс деления клетки или прорастания эндоспоры у спорообразующих прокариот. Следует отметить, что в одном организме часто присутствует несколько форм лизоцима. Так, например, у жвачных животных можно выделить отдельные формы лизоцима почек, желудка и молока,

причем, внежелудочные лизоцимы той же коровы и кролика имеют гораздо большую структурную идентичность между собой, чем с собственной желудочной формой [48,49].

Расщепление муреина, катализируемое лизоцимом, значительно снижает прочность клеточной стенки бактерии, что при наличии разницы внешнего и внутриклеточного давлений, в конечном счете, приводит к разрушению клеточной стенки и последующему лизису бактерии. На этом основывается антибактериальное действие лизоцима. Причем для ряда форм фермента оно осуществляется не только путем катализа, но и «разрыхлением» мембраны клетки самой молекулой белка [50–52]. Такой механизм действия возможен для тех ферментов, которые имеют значения изоэлектрической точки, лежащие в щелочной области, то есть являются катионными белками. В нейтральных средах такие белки заряжены положительно и электростатически притягиваются к, как правило, отрицательно заряженной поверхности бактериальной клетки. Это облегчает сорбцию фермента на клеточном субстрате и объясняет наличие остаточной активности даже у денатурированной формы лизоцима [50]. Однако помимо выраженной бактериолитической активности, проявляемой как на грамотрицательных, так и на грамположительных бактериях [14,53–55], лизоцим, как выяснилось, обладает еще противовирусными [6–9], противогрибковыми [3–5] и противоопухолевыми свойствами [10–12]. Наибольшее количество исследований в данной области было проведено для лизоцима С-типа. Было обнаружено, что лизоцим связывается с ДНК и РНК в разных соотношениях, образуя малоактивные комплексы, по строению напоминающие комплексы гистон-ДНК [56]. При этом ферментативная активность таких комплексов существенно зависит от природы нуклеиновой кислоты. Именно связывание лизоцима с нуклеиновыми кислотами позволяет использовать лизоцим в лечении вирусных заболеваний. Так, в литературе сообщается, что лизоцим уничтожает вирусы ВИЧ и герпеса [6,56], значительно ингибирует транскрипцию вирусного гена у рыб [8], и, образуя комплексы с ДНК [57,58], эффективно предотвращает размножение вируса синдрома белых пятен у *Litopenaeus stylirostris* [7]. Противогрибковое действие лизоцима объясняется тем, что лизоцим как катионный белок обладает слабой хитиназной активностью [59]. Тем не менее, этой активности оказывается достаточно, чтобы лизоцим мог лизировать дрожжи в связке с другими противогрибковыми препаратами [3,4]. При этом кратковременная обработка веществами с противогрибковыми свойствами значительно повышает восприимчивость дрожжей к действию лизоцима [5]. Противоопухолевую же активность лизоцима исследователи связывают с его иммуномодулирующим действием. Так, сообщается, что лизоцим тормозит пролиферацию опухолевых клеток посредством активации клеток иммунитета [10]. Исследователи

отмечают, что лизоцим способен стимулировать лимфоциты, моноциты, а также индуцировать супрессорные и хелперные Т-клетки [60,61].

Остановимся на феномене иммуномодуляции подробнее. Лизоцим, продуцируемый нейтрофилами и макрофагами, может доставляться в фагосомы, где включается в процесс фагоцитоза бактерий [40]. На примере *N. gonorrhoeae* была продемонстрирована корреляция между чувствительностью бактерии к лизоциму и усилением активации нейтрофилов [17]. Вероятно, деградация и лизис бактерий лизоцимом высвобождают бактериальные продукты, в том числе фрагменты ПГ, активирующие образ-распознающие рецепторы в клетках-хозяевах [15]. Известно, что фрагменты ПГ, образующиеся при лизисе бактериальной клетки, улавливаются цитозольными рецепторами NOD1 и NOD2, экспрессируемыми в эпителиальных тканях и фагоцитах, соответственно [62,63]. Малые фрагменты гидролизата ПГ стимулируют последующий иммунный ответ организма путем активации сигнального пути, включающего продукцию провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-8 и антимикробные молекулы [62,64]. Примечательно, что лизоцим может высвобождать достаточное количество стимулирующих фрагментов ПГ, даже если это не влияет на жизнеспособность бактерий [65]. Замечено также, что, в то время как фрагменты пептидогликана, продуцируемые лизоцимом, могут стимулировать NOD2, мономеры пептидогликана, полученные в результате катализа бактериальными литическими трансгликозилазами, плохо стимулируют NOD2 [66,67]. Это также свидетельствует об особой роли лизоцима в активации иммунного ответа в сравнении с иными бактериолитическими ферментами. Интересен также тот факт, что лизоцим принимает участие в активации так называемых инфламмасом, то есть белковых комплексов, стимулирующих секрецию цитокинов [68]. Показано, что ингибирование лизоцима в макрофагах тримером NAG вызывает меньшую активацию инфламмосомы, чем в отсутствие ингибитора [69]. При этом чувствительные к лизоциму штаммы больше подвержены деградации макрофагами, что коррелирует с повышенной продукцией цитокинов [70,71].

Звучит на первый взгляд парадоксально, но тот же лизоцим участвует в снятии воспаления. Он может напрямую связывать и нейтрализовать внеклеточные прооксидантные биореактивные соединения, обладающие провоспалительными свойствами [72,73]. Причем их взаимодействие с лизоцимом дезактивирует фермент, что также приводит к снижению интенсивности иммунного ответа организма по причине невозможности гидролитически расщеплять ПГ и активировать инфламмосомы [73]. Наконец, внеклеточные нерастворимые фрагменты ПГ могут запускать мощный

хемотаксис фагоцитов через факторы комплемента C3a и C5a, которые продуцируются, когда комплемент фиксируется на нерастворимых фрагментах ПГ. Опосредованное лизоцимом расщепление ПГ в растворимые фрагменты снижает производство этих анафилатоксинов (активных фрагментов системы комплемента), тем самым уменьшая приток фагоцитов и сопутствующие воспалительные реакции клеток [74]. Таким образом, учитывая двоякую и даже противоречивую роль лизоцима (одновременно про- и противовоспалительную), регуляция его активности необходима для нормального функционирования иммунной системы, что наводит на мысль о существовании его природных эффекторов (активаторов/ингибиторов), еще не открытых исследователями.

2.2.2. Куриный лизоцим

Лизоцим, давший название С (куриному) типу лизоцимов, изначально был выделен из белка куриного яйца. Позже лизоцимы С-типа были также обнаружены в слюне, слезах и молоке, то есть в биологических жидкостях, контактирующих с внешней средой и подверженных бактериальному заражению. Так, яичный лизоцим своим бактерицидным действием предотвращает размножение микробов в яйце в случае нарушения его целостности. Антибактериальные свойства фермента вкупе с его способностью сохранять ферментативную активность в широком диапазоне рН и температур позволили лизоциму найти широкое применение в медицине (в виде активной компоненты в таблетках для рассасывания, спреях, антисептических средствах), а также в биотехнологии и пищевой промышленности. Лизоцим добавляют в качестве природного консерванта в пищевые продукты, такие как мясной фарш, мясо птицы, сыр, копченую рыбу [53,75,76], в том числе посредством нанесения тонкого слоя фермента на поверхность пищевой пленки [77]. Лизоцим также используют при приготовлении алкогольных напитков, например, вина и пива [78,79]. В сельском хозяйстве лизоцим служит консервирующей добавкой в кормах для животных, предотвращающей их инфекционные заболевания [80], а в ветеринарии – иммуностимулирующим и антибактериальным препаратом для крупного рогатого скота (например, препарат «ВИСО Лизоцим 70» [81,82]). Обработка лизоцимом образцов воды из водоемов позволяет вычислить отношение лизируемых и нелизируемых микроорганизмов и сделать выводы о состоянии водного биоценоза [83]. Лизоцим также применяется для получения клеточного лизата *Escherichia coli* [84], используемого в качестве иммуностимулятора и основы для системы бесклеточного синтеза белка [85].

преобладанием β -слоистой вторичной структуры (фибриллы с так называемой кросс- β -структурой). Частично денатурированный белок образует малорастворимые отложения, что приводит к потере его нормальной функции и, как следствие, к ряду заболеваний, называемых амилоидозами. Амилоиды лизоцима в организме, в особенности в почках, образуются, как правило, по причине генетической предрасположенности, то есть измененной первичной структуры белка, и вызывают наследственное заболевание - невропатический системный амилоидоз [90]. При отсутствии медикаментозного лечения и соблюдения требуемой диеты амилоидоз может привести к ряду серьезных осложнений, в том числе к хронической почечной недостаточности.

Говоря о третичной структуре молекулы лизоцима, в его строении можно выделить выраженные элементы вторичной структуры, а именно четыре α -спирали в первом (α) домене и антипараллельная β -складка во втором (β) домене [91–93]. Рабочая конформация активного центра поддерживается преимущественно в результате гидрофобных взаимодействий, в которые вовлечены неполярные аминокислотные остатки обоих доменов [94]. Что типично для многих ферментов, аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в катализе, а именно Glu-35 и Asp-52, находятся на достаточно удаленном расстоянии в аминокислотной последовательности полипептидной цепи белка, однако в результате его сворачивания оказываются пространственно сближены. Внутри глобулы лизоцима имеется бороздка, в которой находится центр связывания гексасахаридного фрагмента муреина. Традиционно шесть подцентров связывания обозначают латинскими буквами от А до F, где неполярные аминокислотные остатки связывают субстрат гидрофобно, а полярные образуют водородные связи с -ОН и -NHAc группами NAM и NAG. Остатки NAM связываются подцентрами В, D и F, а NAG – в подцентрах А, С и Е. Гликолитический разрыв 1,4- β -гликозидной связи между NAM и NAG осуществляется между участками D и E [95]. Ввиду наличия шести подцентров связывания, большие фрагменты муреина (шесть и более сахарных остатков в цепи) являются оптимальными субстратами для лизоцима. Образующиеся в ходе гидролиза фрагменты пептидогликана (три- и дисахариды) связываются с лизоцимом, что приводит к ингибированию фермента [36].

В формировании оптимального многоточечного связывания субстрата важен остаток Trp-62. Он одновременно осуществляет связывание сахаридов в двух подцентрах – С (посредством водородной связи) и В (гидрофобно). Мутанты лизоцима с заменой аминокислоты в положении 62 хуже связывают как ингибиторы, так и субстрат [96].

Каталитический центр куриного лизоцима, как было упомянуто ранее, включает в себя аминокислотные остатки Glu-35 и Asp-52, при этом (при pH 5) Glu-35 находится в неионизированной форме, а Asp-52 отрицательно заряжен (pKa 5,9 и 3,4, соответственно) [97]. На константы диссоциации аминокислотных остатков каталитического центра влияет их окружение, а именно, неполярные аминокислотные остатки (Ile-55, Leu-56, Gln-57, Trp-108, Ala-110) формируют локальную микросреду вокруг Glu-35, а Asp-52 участвует в системе водородных связей между полярными аминокислотными остатками Asn-44, Asn-46, Asp-48, Ser-50, Thr-51, Asn-59 и Trp-63 [98].

2.2.3. Механизм действия лизоцима

Удивительно, но вопреки многолетнему изучению лизоцима, его общепринятого механизма катализа до сих пор не существует, однако еще в прошлом веке были выдвинуты две основные гипотезы (Д. Филиппса и Д. Кошланда), обе из которых имеют своих преверженников в кругах ученых [99–101]. Свои обоснованные предположения биофизик Д. Филиппс [102] и химик-биорганик Д. Кошланд [103] обнародовали после того, как было выяснено, что гидролиз природного субстрата лизоцима протекает с сохранением конфигурации углеродного атома гликозидной связи. Оба возможных пути ферментативной реакции приведены на рис. 3.

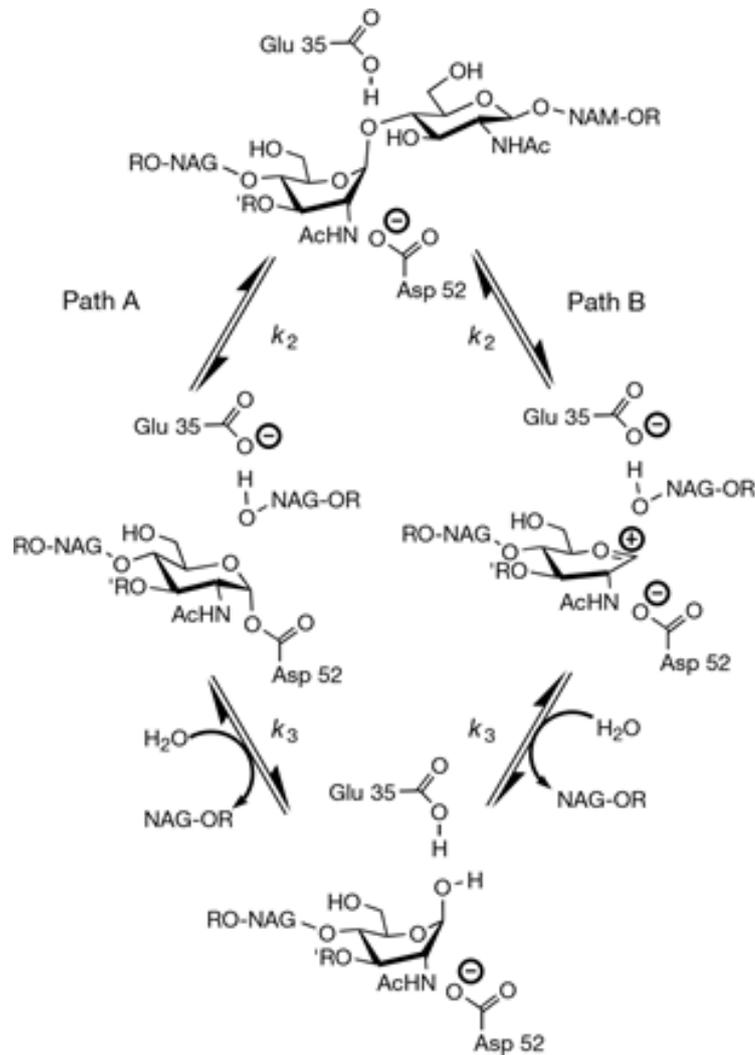


Рисунок 3. Схема двух вероятных механизма катализа лизоцимом [104]. *A* – механизм Кошланда, *B* – механизм Филлипса.

Иллюстрированные выше механизмы, главным образом, различаются описанием состояния остатка NAM, образующегося после разрыва гликозидной связи между остатками NAM и NAG в ПГ. Оба ученых сходятся во мнении, что разрыв гликозидной связи осуществляется в результате общего кислотного катализа путем передачи протона от неионизированного остатка Glu-35 к кислороду гликозидной связи, соединяющей остатки NAM и NAG, которые связаны в подцентрах D и E, соответственно. Согласно механизму Филлипса это приводит к стабилизации остатка NAM в форме оксикарбоний-катиона, находящегося в конформации полукресла. В пользу существования именно ионного интермедиата говорит термодинамический расчет, показывающий, что за счет стабилизации заряженного остатка NAM ионизированным остатком Asp-52, образование катиона оказывается выгоднее, чем образование ацилфермента [105]. Более того, аналоги субстрата, имеющие стабилизированную конформацию полукресла, например, лактонный аналог NAG₄ имеет на два порядка более прочное связывание с лизоцимом, чем

соответствующий немодифицированный субстрат [106]. Согласно же механизму Кошланда, NAM оказывается ковалентно связан с Asp-52 через C1 атом углерода, и этому также имеются экспериментальные подтверждения, например, рентгеновские структуры, полученные при кристаллизации некоторых мутантных форм лизоцима с ингибирующими дисахаридами, а также нативного лизоцима с модифицированным субстратом [104,107]. Однако рентгеноструктурный анализ кристалла лизоцима с природным субстратом не выявил наличие ковалентного интермедиата, что говорит, скорее, в пользу механизма Филиппса [108].

На последующих стадиях реакции остаток Glu-35, находящийся в ионизированном состоянии, совершает общий основной катализ, а именно принимает протон от вошедшей в активный центр молекулы воды. Образующийся гидроксид-анион присоединяется к атому C1 в остатке NAM, что приводит к высвобождению субстрата из активного центра и возвращению лизоцима в начальное состояние.

2.2.4. Человеческий лизоцим

Человеческий лизоцим также, как и куриный, относится к С-типу. Эти два белка имеют идентичные функции и высокую степень гомологии [109]. Оба фермента имеют только одну полипептидную цепь, которая образует двухдоменную субъединицу с бороздкой между доменами [110]. Полипептидная цепь человеческого лизоцима всего на один аминокислотный остаток длиннее куриного и составляет 130 аминокислотных остатков. Схожесть третичных структур обоих лизоцимов наглядно продемонстрирована на рис. 4.

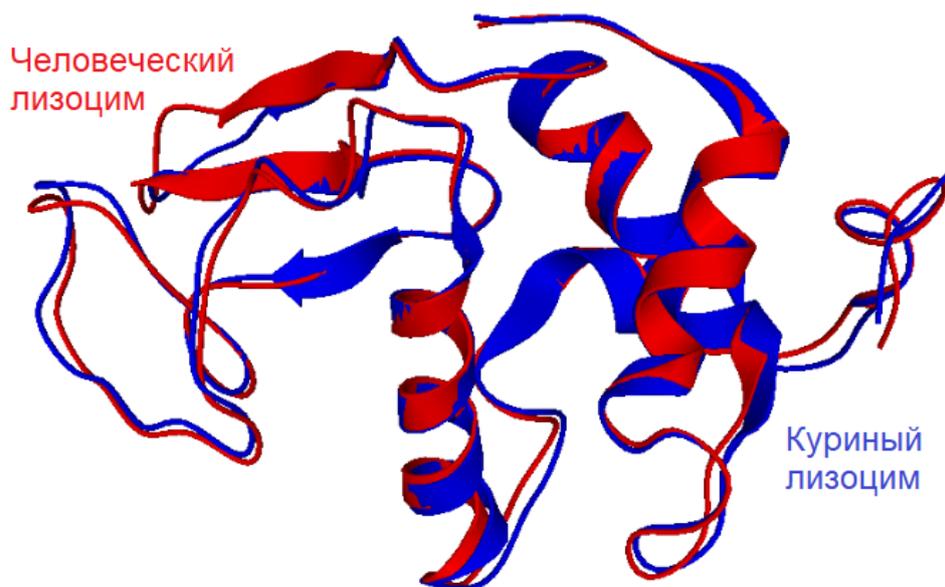


Рисунок 4. Наложение трехмерных структур куриного и человеческого лизоцимов [109]. Третичная структура куриного лизоцима представлена синим цветом, человеческого – красным.

На рис. 4 видно, что α -спирали у обоих лизоцимов практически накладываются друг на друга, в то время как β -листы несколько различаются. В пространственной структуре человеческого лизоцима имеется двойной антипараллельный β -складчатый лист, а в структуре куриного лизоцима β -лист сложен тремя цепями. Однако получены кристаллические структуры белка, где β -лист человеческого лизоцима также описан сложением из трех цепей [111,112]. А-домен включает в себя четыре α -спирали и две 3_{10} спирали, β -домен содержит одну 3_{10} спираль, β -складку и длинную петлю. Белок имеет четыре дисульфидные связи, две из которых расположены в α -доме (Cys-6–Cys-128, Cys-30–Cys-116) и одна в длинной петле β -домена (Cys-65–Cys-81); оставшаяся дисульфидная связь связывает два домена (Cys-77–Cys-95) [111]. Активные центры обоих лизоцимов практически идентичны и ключевую роль в них играют остатки Glu-35 и Asp-52 (в курином лизоциме)/Asp-53 (в человеческом). Сорбционный центр человеческого лизоцима также как и у куриного представлен шестью участками для связывания субстрата. При этом для связывания сахара в подцентре А у человеческого лизоцима вместо Asp-101 задействован остаток пролина [113]. Кроме того, в глобуле человеческого лизоцима реализуется гидрофобное взаимодействие между остатками Trp-63 и Trp-64, которого нет в курином [114].

Изоэлектрическая точка человеческого лизоцима $pI = 9,3$, что несколько ниже, чем у куриного лизоцима ($pI = 10,5$). Молекулярная масса человеческого лизоцима 14,7 кДа

(выше на 0,4 кДа, чем у куриного) [110]. Человеческий лизоцим был обнаружен в печени и хрящах, а также различных биологических жидкостях, включая слюну, слезы и молоко. Человеческий лизоцим экспрессируется в гемопоэтических клетках, а также обнаружен в макрофагах, моноцитах и гранулоцитах [115]. Нормальная концентрация лизоцима в плазме крови варьируется в диапазоне от 4 до 13 мг/л [116], причем время жизни белка в плазме весьма мало (75% белка выводится в течение 1 часа за счет почечного клиренса). Подсчитано, что в день человек вырабатывает не менее 500 мг лизоцима [117]. Однако повышенное содержание человеческого лизоцима в крови может свидетельствовать о ряде заболеваний, в частности, о моноцитарном лейкозе [113]. Как было упомянуто ранее, точечные замены в структуре лизоцима могут привести к образованию агрегатов, называемых амилоидами. Именно необходимость поиска лекарственных средств для лечения наследственных амилоидозов послужила одним из главных посылом к активному изучению человеческого лизоцима и его структуры, в особенности исследованию его взаимодействия с другими молекулами, в том числе с низкомолекулярными ингибиторами.

2.3. *Escherichia coli*

Escherichia coli (кишечная палочка) – грамотрицательная палочковидная бактерия семейства Enterobacteriaceae, хемогетеротроф, мезофильный факультативный анаэроб размером от 0,5×2 мкм до 1,5×6 мкм [118]. Названа вместе со всем своим родом в честь открывшего ее в 1895 году австрийского ученого Теодора Эшериха [119]. *E. coli* считается частью нормальной микрофлоры человека и составляет менее процента массы кишечной микробиоты. *E. coli*, как правило, обнаруживают в нижних отделах кишечника теплокровных животных в концентрации 10^6 - 10^8 КОЕ/г [120]. Однако ввиду наличия собственных патогенных штаммов *E. coli*, способных вызывать тяжелые пищевые отравления [121], инфекции мочевыводящих путей, перитонит [122], менингит и сепсис [119], а также с учетом того, что в семейство Enterobacteriaceae, в которое входит род *Escherichia*, входят близкородственные кишечной палочке патогенные рода, такие как *Salmonella*, *Shigella* [118] и *Yersinia* [123], *E. coli* принято относить к условно патогенным бактериям. Тем не менее, опасность *E. coli* для здоровья человека не стоит недооценивать. Так, патогенный штамм O157:H7 *E. coli* вызвал вспышку желудочно-кишечного заболевания в 1982 г. [124], тогда как штамм O104:H4 был ответственен за более 1,5 тысячи случаев гемолитико-уремического синдрома в 2011 г. [125], убив 48 человек. При этом

дикие штаммы кишечной палочки устойчивы к действию антибиотиков стрептомицину и гентамицину [126].

2.3.1. Биохимия и особенности культивируемых штаммов *E. coli*

Поскольку *E. coli* традиционно используют в качестве модельного организма для изучения метаболических путей, биохимия этой бактерии за десятилетия фундаментальных исследований изучена наиболее подробно. Популярность выбора *E. coli* как объекта микробиологического исследования обуславливается, в частности, простотой ее культивирования. Будучи факультативным анаэробом, данная бактерия способна расти как в кислородной, так и бескислородной среде. Кроме того, она не образует эндоспор, а при благоприятных условиях клетки удваиваются путем бинарного деления менее чем за полчаса. Культивирование *E. coli*, как правило, проводится при 37°C в лизогенной (LB) питательной среде. Наибольшую популярность среди микробиологов получили рекомбинантные штаммы линий К-12 и В, которые способны расти исключительно в лабораторных условиях, не патогенны и не образуют биопленки.

E. coli активнейшим образом используется в генно-инженерных исследованиях. Ее полный геном (а именно, штамма К-12) был расшифрован одним из первых в 1997 году [127]. ДНК *E. coli* состоит из более чем 3 миллионов пар оснований, причем число пар нуклеотидов АТ к GC примерно одинаково. В 1978 году благодаря использованию генетического материала *E. coli* был совершен настоящий прорыв в области биотехнологии. Гормон инсулин, жизненно необходимый для больных диабетом 1-ого типа, был впервые синтезирован с использованием технологии рекомбинантной ДНК *E. coli* и в настоящее время производится в промышленном масштабе [128]. Однако спектр белков, которые потенциально может продуцировать *E. coli*, ограничен отсутствием в этих бактериях аппарата гликозилирования, что не позволяет совершать один из распространенных видов посттрансляционной модификации [129].

Возвращаясь к вопросу биохимии *E. coli*, скажем несколько слов об ее метаболических путях. Как было упомянуто ранее, *E. coli* может жить и размножаться как в присутствии кислорода, так и в его отсутствии. Это объясняется тем, что в воздушной среде в качестве конечного акцептора электронов в электрон-транспортной цепи *E. coli* использует молекулы кислорода, а в бескислородной среде получает энергию за счет

процессов брожения. *E. coli* метаболизируют сахарозу и ксилозу, а также проводят декарбоксилирование лизина [130]. Немаловажно, что *E. coli* в ходе своей жизнедеятельности синтезирует витамины К, В2, В3, В5, В6, В9, В12 [131].

В настоящей работе в качестве основного объекта исследования был выбран штамм *E. coli* из линии К-12 (KS-507). Вообще большинство промышленных и лабораторных штаммов *E. coli* были выведены из штаммов линии В и К-12, впервые полученных в 1911 и 1922 годах, соответственно [132]. Если штаммы линии В используют, в основном, для экспрессии рекомбинантных белков, то штаммы линии К-12 традиционно используют для генетических и биохимических исследований. При этом только около 4% генома приходится на специфические для каждого штамма регионы. Хромосома *E. coli* К-12 представлена 4401 геном, кодирующим 116 РНК и 4285 белков [133]. В штаммах линии К-12 сохраняются мутации, позволяющие осуществлять высокий выход экспрессируемых плазмид. Штаммы линии К-12 отличаются от штаммов линии В замедленным биосинтезом аминокислот, наличием жгутиков, большим количеством протеаз, сравнительно высоким уровнем экспрессии белков теплового шока и отсутствием системы секреции II типа, отвечающей за транспортировку белков из периплазматического пространства во внешнюю среду. Кроме того, строения наружной мембраны и клеточной стенки этих двух штаммов также различны. Так, штаммы могут отличаться количеством и соотношением поринов - мембранных белков, осуществляющих специфический транспорт молекул. Штаммы линии В синтезируют большее число поринов OmpF с большим радиусом пор, в то время как наружная мембрана К-12 богата поринами OmpC и OmpA, обладающими меньшим радиусом пор [134]. Порины осуществляют пассивный, но специфичный транспорт различных типов молекул благодаря координации их аминокислотными остатками, экспонированными во внутреннюю поверхность белкового канала. Штаммы линии К-12 лучше приспособлены к стрессовым условиям за счет наличия не менее пяти модулей токсин-антитоксин, играющих важную роль в физиологии бактериального стресса и способствующих развитию множественной лекарственной устойчивости [135]. Помимо этого, К-12 отличает от В повышенная экспрессия шаперонов (т.е. белков, которые связываются с экспонированными гидрофобными частями белка, тем самым обеспечивая правильное сворачивание белка и предотвращая его агрегацию) (dnaK, groES, htpG, ibpA и clpB), белка холодового шока (cspE), белка углеродного голодания (cstA), осмотически индуцируемой пероксидазы (osmC), белка фагового шока (pspE) и универсального белка стресса (uspA) [134]. В рамках одной линии штаммы, как правило, различаются между собой генетическим материалом встроенных плазмид.

2.3.2. Транспортные системы аминокислот в *E. coli*

Поскольку значительная часть настоящей работы посвящена исследованию поведения системы живых бактериальных клеток *E. coli* из линии штаммов K-12 в присутствии лизоцима и аминокислот, имеет смысл отдельно рассмотреть пути поглощения аминокислот данным видом бактерий. *E. coli* обладают способностью синтезировать все необходимые аминокислоты из неорганических солей и глюкозы, сохраняя при этом способность активно накапливать их извне. У штамма *E. coli* K-12 имеются по меньшей мере четыре отдельные белковые системы транспорта незаряженных аминокислот. Первая транспортирует через внешнюю мембрану аминокислоты аланин, серин и глицин, вторая – валин, лейцин и изолейцин, третья – триптофан, тирозин и фенилаланин, четвертая транспортирует метионин [136]. Транспорт лизина у *E. coli* как у грамотрицательной бактерии опосредуется двумя различными системами пермиаз (транспортных белков, находящимися в периплазме): первой, специфичной только для него, и второй, осуществляющей АТР-зависимый транспорт, помимо лизина, еще его предшественников орнитина и цитруллина. Эта система называется LAO или лизин-аргинин-орнитинпермеазой. Она ингибируется аргинином, который, однако, транспортируется своими собственными белковыми системами, зависящими от периплазматического связывающего белка [137,138]. Примечательно, что осмотический шок вызывает снижение транспорта аргинина с одновременным высвобождением аргинин-специфического связывающего белка, в то время как лизин-специфический транспорт продолжает свое функционирование [139]. Транспорт гистидина в *E. coli* осуществляется гомологичным LAO белком, транспортером ABC-типа, помимо энергии АТР, требующим также участие гистидин-специфичного периплазматического связывающего белка [138]. Транспорт глутамата в *E. coli* K-12 осуществляется посредством нескольких белковых переносчиков, интегрированных в цитоплазматическую мембрану [140]. На настоящий момент у *E. coli* обнаружены три транспортные системы глутамата: 1) пермиаза, переносящая как глутамат, так и аспартат с участием вспомогательного периплазматического связывающего белка 2) натрий-зависимая глутамат-специфическая система 3) система протонного симпорта для глутамата и аспартата (GltPЕс) [141,142]. GltPЕс катализирует электрогенный симпорт глутамата по крайней мере с двумя протонами [143]. Как мы видим, и перенос глутамата, и аспартата через мембрану осуществляется посредством котранспорта ионов Na^+ и H^+ , следовательно, транспорт этих аминокислот зависит как от рН среды, так и от ее осмимольности.

2.4. *Priestia megaterium*

В качестве второго модельного микроорганизма, исследуемого в настоящей работе, была выбрана бактерия *Priestia megaterium* (ранее относилась к роду *Bacillus*). Поскольку с ней было проведено значительно меньше экспериментов, чем с *E. coli*, то здесь ограничимся ее кратким описанием. *P. megaterium* выбрана в связи с тем, что данная бактерия, в отличие от *E. coli*, относится к грамположительным видам, поэтому строение ее клеточной стенки принципиально отличается от строения клеточной стенки *E. coli*. Если у *E. coli* имеется внешняя и внутренняя мембраны и периплазматическое пространство между ними, то клеточная стенка *P. megaterium* представлена несколькими десятками слоями мурина, а также тейхоевыми кислотами, состоящими из остатков глюкозы и NAG с присоединенными к ним остатками глицеролфосфата [144]. *P. megaterium* является факультативным анаэробом, способна к спорообразованию и встречается в основном в почве [145]. Некоторые штаммы *P. megaterium* способны осуществлять азотфиксацию [146]. Бактерии *P. megaterium*, как и кишечная палочка имеет вытянутую форму, однако в разы крупнее последних (5-7 мкм), за что, собственно и получили свое название [145]. Существуют промышленные штаммы этой бактерии, используемые в качестве продуцента пищеварительных ферментов [147,148], антител [149], а также для нормализации микрофлоры рыб [150]. Существенные различия в строении клеточной стенки бактерий *E. coli* и *P. megaterium* позволяют оценить роль субстрата во влиянии исследуемых здесь низкомолекулярных веществ на скорость лизиса клеток лизоцимом. Кроме того, исследование лизиса бактерий *P. megaterium* актуально ввиду того, что данная бактерия близкородственна патогенным штаммам из рода *Bacillus* [151], а также ее ферментативное разрушение необходимо в биотехнологическом производстве для аккуратного высвобождения накапливаемых в ней пищеварительных ферментов или иных продуктов [148,152].

2.5. Строение клеточной стенки бактерий

В 1884 году датский бактериолог Ганс Грам разработал метод окраски бактерий метиловым фиолетовым красителем с последующей фиксацией в йодном растворе [153]. Бактерии, сохранившие окраску после промывания спиртом, были условно названы грамположительными, а обесцвечивающиеся – грамтрицательными. Впоследствии было выяснено, что разная реакция на краситель была вызвана различием в строении клеточных

стенок бактерий. Клеточная стенка – это прочная внешняя структура бактерии, отвечающая за поддержание ее целостности и формы и защищающая клетку от внешних механических воздействий [154]. Клеточная стенка грамположительных бактерий находится снаружи от цитоплазматической мембраны, представленной бислоем фосфолипидов с интегрированными в нее белками, и состоит из 30-40 слоев муреина, сшитых между собой пептидными мостиками. Оболочка грамотрицательных бактерий состоит из двух мембран: внутренней цитоплазматической и внешней, также состоящей из фосфолипидного несимметричного бислоя с экспонированными вовне липопротеинами и липополисахаридами, выполняющими защитную функцию и представляющими собой антигенные детерминанты [155]. Пространство между двумя мембранами называется периплазмой и кроме различных белков, например, пермиаз, протеинкиназ, нуклеаз, периферических белков цитоплазматической мембраны, а также олигосахаридов, содержит один или несколько слоев ПГ [156]. Внешняя мембрана осуществляет селективную передачу необходимых для бактерии веществ через интегрированные в нее белки-порины [157]. Ввиду постоянно открытых в мембране ионных каналов между периплазмой и внешней средой невозможно поддержание электрохимического градиента, поэтому внешняя мембрана не используется бактериями для работы АТФ-синтаз. Именно наличие внешней мембраны в клеточной стенке препятствует окрашиванию грамотрицательных клеток по Граму, в связи с недоступностью для красителя слоев ПГ [158].

2.5.1. Пептидогликан

Пептидогликан, он же муреин – опорный каркас клеточной стенки бактерии, позволяющий ей выдерживать осмотическое давление. Он представляет собой сложный сополимер, состоящий из углеводной и пептидной частей. Углеводная часть ПГ, как было упомянуто ранее, является гетерополимером, состоящим из остатков NAM и NAG, соединенных 1,4-β гликозидными связями. Ее длина варьируется от 10 до 100 звеньев в цепи. Пептидная часть представлена 4-5 (реже 2-3) остатками как L, так и D-аминокислот. Различия в структуре пептидной части ПГ представлены на рис. 5.

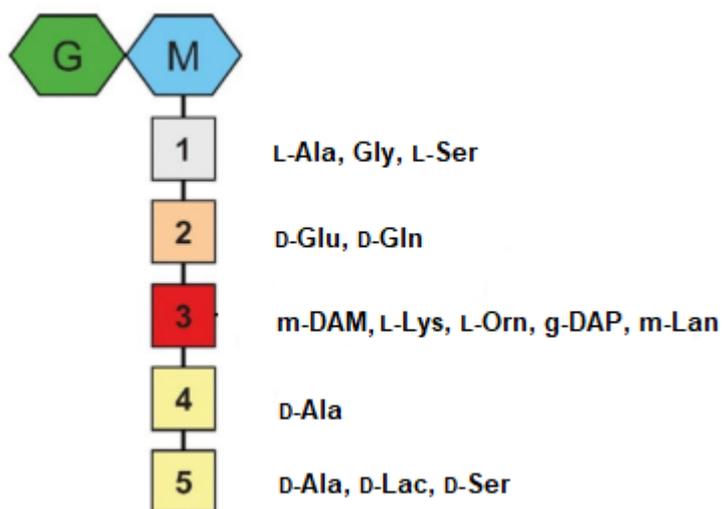


Рисунок 5. Схематичное представление пептидной части ПГ. G – NAG, M – NAM, m-DAM – мезо- диаминопимелиновая кислота, L-Orn – L-орнитин, g-DAP – 2,4-диаминомасляная кислота, m-Lan – мезо-лантионин, D-Lac – D-лактат [159].

Из D-аминокислот наиболее характерны D-аланин (с ним связываются тейхоевые кислоты) и D-глутамат; встречаются также D-серин и D-лактат [160]. Существует более 100 структурных типов пептидогликана, отличающихся и составом пептидной части, и положениями межмолекулярных сшивок [161]. Первый остаток олигопептидного фрагмента ПГ связан амидной связью с карбоксильной группой NAM (кстати, встречающейся только в бактериях), а последний или промежуточный остаток - пептидную связь с соседним олигопептидным участком, исходящим из другой полисахаридной цепи муреина [162]. Связь между олигопептидами осуществляется как напрямую амидной связью (что характерно для грамотрицательных бактерий), так и посредством поперечного олигопептидного мостика (в основном, встречается у грамположительных бактерий) (см. рис. б) [30]. Чтобы сшивка между пептидными частями муреина была возможна, в их состав, как правило, в 3-ем положении входит остаток аминокислоты, имеющей две аминогруппы (например, диаминопимелиновая кислота) [162,163]. Чаще всего сшивки между олигопептидами двух цепей осуществляется между аминокислотными остатками в положениях 3 и 4, реже 3 и 3 или 2 и 4 [30,160]. Способы соединения пептидных частей ПГ между собой иллюстрированы на рис. б.

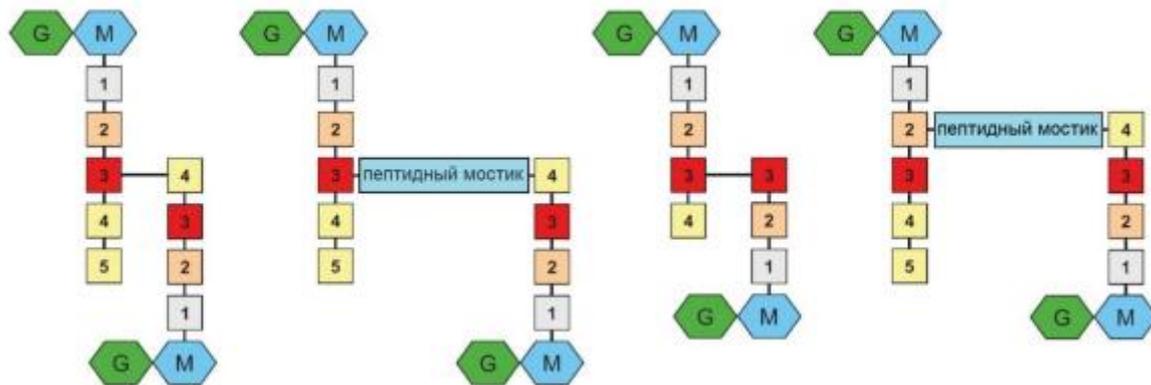


Рисунок 6. Схематичное представление соединений двух соседних цепей ПГ [159].

Остаток D-глутаминовой кислоты, второй по счету от NAM, может посредством амидирования превращаться в D-глутамин [164]. Аминокислотные остатки в положении 4 и 5 (если они есть) чаще всего представлены D-аланином (см. рис. 5) [160].

В грамположительных бактериях с ПГ нерегулярным образом связываются остатки тейхоевых или липотейхоевых кислот. Они представляют собой сополимер от 8 до 50 фосфатов глицерола, маннита или рибита, где последний в цепи многоатомный спирт связан с углеводной или липополисахаридной частью [165]. Тейхоевые кислоты отвечают за отрицательный заряд поверхности клетки и служат мишенью для катионных белков [166]. Они входят не только в состав пептидогликанового остова (например, связываясь с -ОН группой NAG), но и бывают «заякорены» гидрофобной частью в цитоплазматическую мембрану (что типично для липотейхоевых кислот) [167]. Состав тейхоевых кислот влияет как на иммуногенные свойства бактерии, так и на доступность ПГ для лизоцима [165]. Их предполагаемая функция – удерживание ионов кальция и магния на поверхности клеток посредством фосфатных групп [168].

2.5.2. Клеточная стенка *E. coli* и *P. megaterium*

Поскольку главным объектом нашего исследования является бактерия *Escherichia coli*, особый интерес представляет рассмотреть именно ее клеточную стенку. *Escherichia coli* относится к грамотрицательным бактериям, и ее клеточная стенка состоит из тонкого слоя пептидогликана, расположенного в периплазматическом пространстве, обособленном от внешней среды дополнительной внешней липидной мембраной. Мурейн *E. coli* содержит 40-50 муропептидов (повторяющихся пептидных фрагментов пептидогликана). Часть связей между 3-им и 4-ым аминокислотным остатком разных цепей в пептидных

фрагментах пептидогликана *E. coli* частично заменены на связи между двумя 3-ими остатками (см. рис. 6) [169]. В строении пептидогликана штаммов *E. coli* часто нет химически модифицированных, например, O-ацетилированных участков, однако некоторая устойчивость *E. coli* к лизоциму имеется за счет экспрессии бактерией особых периплазматических ингибиторов лизоцима [170] (об этих и других бактериальных механизмах противодействия лизоциму более подробно рассказано в следующем разделе). Строение внешней мембраны *E. coli* показана на рис. 7.

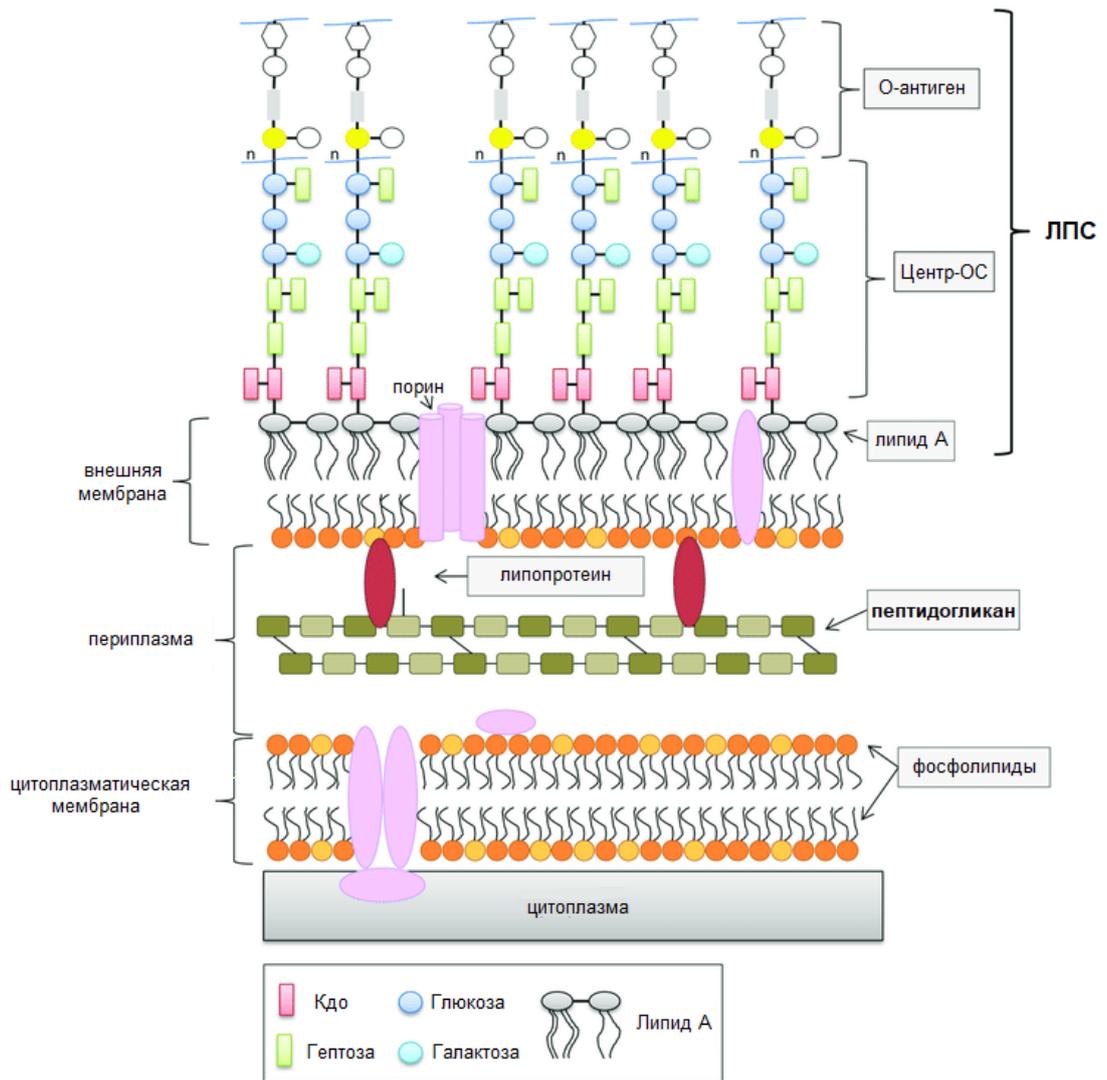


Рисунок 7. Строение клеточной стенки *E. coli* [169]. ЛПС – липополисахарид, Центр-ОС – центральный олигосахарид, Кдо - 2-кето-3-дезоксид-D-маннооктулозоновая кислота.

Внутренняя сторона ассиметричной внешней мембраны *E. coli* представлена, в основном, фосфолипидами, а внешняя – липополисахаридами. Липополисахариды состоят из трех ковалентно-связанных компонент. Нижний слой включает в себя липиды А

(дисахариды, соединенные с несколькими углеводородными фрагментами гидроксимиристиновой жирной кислоты). Они гидрофобными частями взаимодействует с фосфолипидами внутреннего слоя мембраны и как бы «заякоривают» липополисахарид в ней. Часть липидов А ковалентно связаны с фосфолирированными основными олигосахаридами (у *E. coli* имеется, как минимум, пять вариаций основных олигосахаридов). Они представлены остатками 2-кето-3-дезоксид-маннооктулозоновой кислоты (Кдо), одним или несколькими остатками L-глицеро-D-манногептозы, а также остатками глюкозы и галактозы. Внешний слой липополисахарида образован так называемыми О-антигеновыми фрагментами, т.е. олигосахаридными цепями из нескольких типов повторяющихся сахаров, варьирующимися для каждого основного олигосахарида [171]. Они, как и липид А, чрезвычайно иммуногены, поэтому липополисахариды еще по-другому называют эндотоксинами. За счет анионных фосфатных групп во внутренней области основных олигосахаридов молекулы эндотоксинов способны образовывать межмолекулярные электростатические связи с соседними молекулами липополисахаридов. Взаимодействие осуществляется посредством связывания фосфатных групп с двухвалентными катионами, в основном, Mg^{2+} и Ca^{2+} . Такие связи вносят значительный вклад в устойчивость внешней мембраны *E. coli* к гидрофобным противомикробным агентам, а также ограничивает проникновение в клетку иных гидрофобных соединений [172]. Строение основных олигосахаридов играет большую роль в восприимчивости *E. coli* к катионным противомикробным агентам, например, к антибактериальным пептидам и лизоциму. Влияние оказывает как фосфолирированность сахаридов в основных олигосахаридах, так и строение углеводородной части липополисахарида в целом, различающиеся у разных штаммов *E. coli*. Разумеется, величина и направление изменения устойчивости клеток к противомикробному агенту при том или ином строении основного олигосахарида сильно зависит от природы самого агента. При этом протеаза наружной мембраны OmpT практически не оказывает влияния на противодействие *E. coli* катионным антибактериальным пептидам [173].

Что касается *P. megaterium*, второго основного объекта нашего исследования, в отличие от *E. coli* эти бактерии относятся к грамположительным штаммам, а следовательно, имеют принципиально иное строение клеточной стенки [174,175]. Клеточная стенка *P. megaterium* типична для грамположительных видов и структурна схожа с клеточной стенкой *B. subtilis* [176]. Она состоит из 30-40 слоев пептидогликана, не содержит периплазматического пространства (однако некоторые грамположительные бактерии, например, *S. aureus* содержат ее аналоги [177]), не содержит внешней мембраны,

липополисахаридов, но включает в себя упомянутые ранее тейхоевые кислоты и липотейхоевые кислоты [178]. Цитоплазматическая мембрана *P. megaterium*, содержит фосфолипидный бислой, кардиолипины, поверхностные белки и полисахариды [179]. Капсульные полисахариды ковалентно связаны с ПГ, а внеклеточные полисахариды образуют аморфный внешний слой [180,181]. Из химических модификаций клеточной стенки для *P. megaterium* известны D-аланирование тейхоевых кислот и N-деацилирование ПГ [182]. Эти химические модификации понижают отрицательный заряд клеточной стенки *P. megaterium* и придают ей устойчивость к катионным антибиотикам [183].

Сравнивая строение клеточной стенки *E. coli* и *P. megaterium* мы можем заключить, что клеточная стенка *E. coli* разительно отличается от клеточной стенки *P. megaterium*, а именно: 1) наличием второй внешней мембраны и периплазматического пространства, 2) меньшим (в десятки раз) количеством ПГ слоев, составляющих опорный каркас клеточной стенки, 3) наличием липополисахаридов (эндотоксинов), 4) отсутствием тейхоевых и липотейхоевых кислот, 6) отсутствием аминокислотных остатков, имеющих две аминогруппы в составе пептидной части ПГ и как следствие, пептидных мостиков между пептидными участками ПГ.

2.6. Бактериальные механизмы противодействия лизоциму

Теперь, когда мы в общих чертах рассмотрели строение клеточной стенки бактерии и ее ПГ, уместно будет поговорить о способах ее защиты от лизоцима. Далее приведены основные стратегии бактерий к обретению резистентности к лизоциму.

2.6.1. Химическая модификация пептидогликана

На рис. 8 представлены модификации ПГ, которые получили наибольшее распространение [184,185].

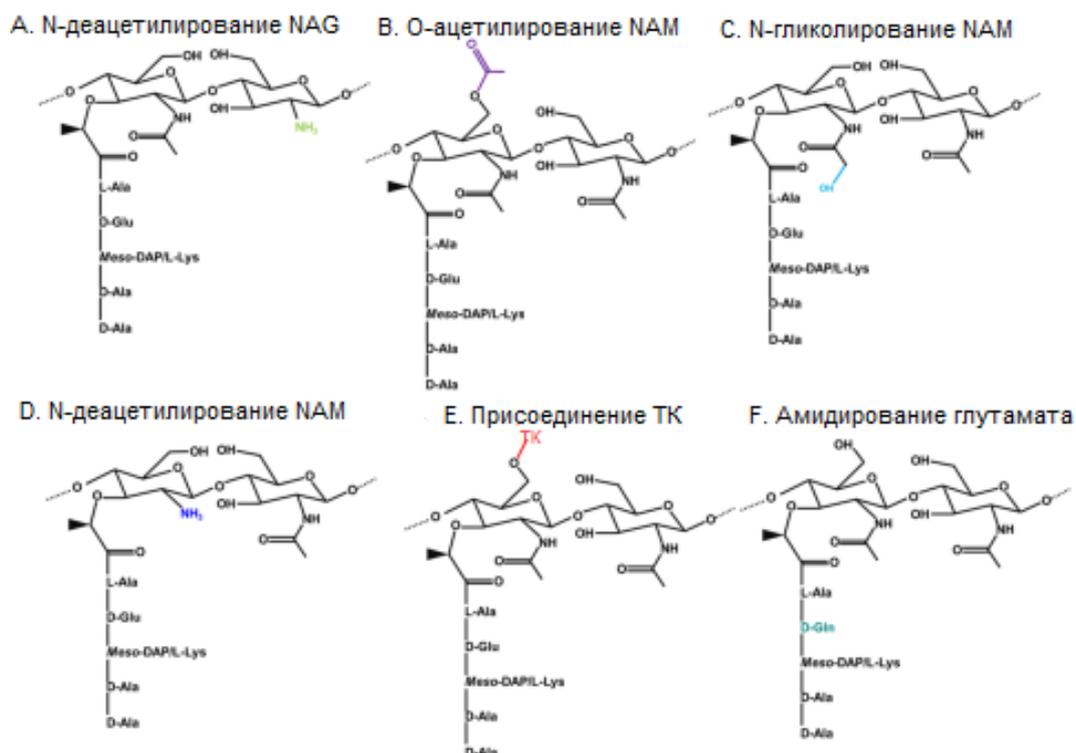


Рисунок 8. Наиболее распространенные химические модификации ПГ. ТК-тейхоевая кислота, Meso-DAP - мезо-диаминопимелиновая кислота [15].

Известно, что взаимодействие между активным центром лизоцима и ацетил-группы гликанового остова ПГ способствуют гидролитической активности фермента [40]. Чтобы нивелировать вклад этих взаимодействий в связывание субстрата некоторые патогенные бактерии экспрессируют деацетилазу NAG, которая удаляет ацетильную группу в положении C2 NAG (см. рис. 8A) [186]. Кроме того, это приводит к понижению общего отрицательного заряда клетки, что повышает устойчивость бактерии против катионных белков. Присоединение ацетильной группы к гидроксильной группе C6 NAM, так называемое O-ацетилирование, предотвращает связывание лизоцима с ПГ через стерические препятствия (рис. 8B). O-ацетилирование NAM является распространенной химической модификацией, хотя механизм происходит по-разному у грамотрицательных и грамположительных бактерий [187]. Так, например, у грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus* для ацетилирования NAM требуется только O-ацетилтрансфераза A (OatA) [188], в то время как у грамотрицательных бактерий помимо периплазматической O-ацетилтрансферазы (PatB или PacB) для O-ацетилирования NAM требуется еще трансмембранный белок (PatA или PacA), осуществляющий перенос ацетата из цитоплазмы в периплазму [187]. Микобактерии и некоторые близкородственные актиномицеты имеют в строении ПГ N-гликолат NAM (рис. 8C). У микобактерий образование N-

гликолилмурамовой кислоты катализируется гидроксилазой NamH. Показано, что потеря гена *namH* у *Mycobacterium smegmatis* приводит к снижению устойчивости к лизоциму [189]. Помимо этих трех химических модификаций, встречаются и другие, например, N-деацелирование NAM (рис. 8D) [190] или присоединение тейхоевой кислоты к гидроксильной группе C6 NAM (рис. 8E) [167].

2.6.2. Изменение заряда и целостности клеточной оболочки

Как правило, ввиду обилия кислот на внешней клеточной оболочке, поверхность бактерий заряжена отрицательно. Это приводит к возможности катионным белкам эффективно атаковать ее. Как было упомянуто ранее, лизоцим также относится к типичным катионным белкам, поэтому уменьшение отрицательного заряда бактерий приводит к снижению эффективности бактериолитического действия лизоцима.

Уже было сказано о роли тейхоевых кислот в создании отрицательного заряда на поверхности грамположительных клеток, однако такая химическая модификация, как, например, D-аланирование позволяет понизить его [191]. D-аланирование, в частности, наблюдается у бактерий *B. subtilis* и *P. megaterium* [182]. Уменьшение заряда полярных липидов цитоплазматической мембраны (например, посредством лизинирования ферментами семейства MrgF) также препятствует лизису бактерий лизоцимом [192]. Амидирование D-глутаминовой и D-аспарагиновой кислоты в ПГ также повышает устойчивость как интактных бактерий, так и самого муреина к действию лизоцима (рис. 8F) [193,194]. К уменьшению отрицательного заряда клетки так же приводит увеличение доли фосфоэтаноламина во внешней мембране. Так, было показано на примере *Neisseria gonorrhoeae*, что добавление ферментом LptA фосфоэтаноламина к липиду А липоолигосахарида внешней мембраны повышает устойчивость бактерии к лизоциму [195].

Нарушение целостности внешней мембраны также приводит к увеличенной восприимчивости бактерий лизоцимом. Например, было сообщено, что ингибирование ферментов, перестраивающих ПГ, а именно литических трансгликозилаз LtgA и LtgD, снижает резистентность *N. gonorrhoeae* к лизоциму [17].

2.6.3. Периплазматические ингибиторы лизоцима

Хотя внешняя мембрана и придает дополнительную защиту от агрессивных химических агентов для бактериальных клеток, лизоцим все-таки способен преодолевать ее. Чтобы предотвратить гидролиз ПГ на этапе проникновения лизоцима в периплазму, ряд грамотрицательных бактерий, например, *Pseudomonas aeruginosa* [196], *Proteus mirabilis* [197], *E. coli* [170] и *Yersinia pestis* [198], использует специальные белки – периплазматические ингибиторы лизоцима (Pli). Их молекулярная масса, как правило, превосходит массу самого лизоцима и в зависимости от семейства ингибиторов составляет 10-30 кДа и более [199,200]. Pli ингибируют лизоцим лабильным участком полипептидной цепи [200]. Помимо ингибирования лизоцима, белки типа IvyC (семейства первого открытого периплазматического ингибитора лизоцима, обнаруженного в 2001 году в *E. coli* [170]) также ингибируют литические трансгликозилазы бактерий [201]. Бактерия *N. gonorrhoeae* задействует одновременно два белка, которые гомологичны периплазматическим/мембраносвязанным ингибиторам лизоцима С-типа (PliC/MliC): Ng_1063 и Ng_1981 [202]. Вероятно, Ng_1063 взаимодействует с человеческим лизоцимом посредством аминокислотных остатков Ser-83 и Lys-103. Ингибиторы лизоцима I и G-типа (PliI и PliG) обнаружены у *Aeromonas hydrophila* и *Escherichia coli*, соответственно [203,204]. В связывании PliI с лизоцимом важную роль играют пары остатков Ser-104 и Tyr-107, Ser-46 и Asp-76.

Взаимодействие лизоцима со своим периплазматическим ингибитором, вероятно, вносит вклад в непродуктивную сорбцию лизоцима, о чем будет отдельно сказано в разделе 2.11 «Адсорбция лизоцима на клетках». Периплазматические ингибиторы лизоцима активно секретируются грамотрицательными бактериями во время экспоненциальной и стационарной стадии роста. Примечательно, что подавляющее число бактерий, вырабатывающих их, патогенны или условно-патогенны для человека и животных [200].

2.7. Совместное действие эффекторов ферментов

Эффекторами ферментов принято называть вещества, которые оказывают влияние на каталитическую активность. По направлению действия эффекторы делят на ингибиторы (уменьшающие активность фермента) и активаторы (увеличивающие активность). Ингибиторы бывают обратимыми (не вносят изменения в работу фермента после своей диссоциации из комплекса белок-ингибитор) и необратимые (ковалентно связываются с

белком). Кроме того, исходя из кинетики ферментативной реакции, ингибирование бывает конкурентным, то есть, когда ингибитор и субстрат конкурируют за сайт связывания (часто такими ингибиторами являются аналоги субстрата или переходного состояния), и неконкурентным (такие ингибиторы, как правило, связываются необратимо с участком белка, не оказывающем влияние на эффективность связывания субстрата). Как ингибиторы, так и активаторы могут взаимодействовать с ферментом аллостерически, то есть с отдельными участками, находящимися вне активного центра фермента, что наблюдается, как правило, для олигомерных белков.

Связывание белка с обратимым эффектором осуществляется посредством нековалентных взаимодействий, а именно с помощью электростатического притяжения разноименно заряженных групп белка и эффектора, образования водородных связей между полярными частями молекул, а также гидрофобных взаимодействий. В случае необратимого ингибирования происходит, как правило, ковалентное связывание с ключевым для работы фермента аминокислотным остатком.

Нельзя не упомянуть, что эффекторы играют важнейшую роль в регуляции ферментативных реакций в живых организмах. Одним из видов регуляции является так называемое ингибирование продуктом, которое позволяет поддерживать оптимальный уровень выработки требуемого метаболита.

Поскольку к ферменту зачастую удается подобрать сразу несколько эффекторов, особый интерес представляет их совместное влияние на протекание каталитической реакции. Выделяют три вида сочетанного действия эффекторов. В случае, если эффекторы действуют независимо друг от друга, имеют разные молекулярные мишени, возможен (хотя и редок) аддитивный эффект их взаимодействия, то есть, когда совместный эффект существенно не превосходит сумму отдельных эффектов, а приблизительно равен ей. Чаще встречается иная картина, когда совместное действие эффекторов значительно отличается от раздельного действия эффекторов. В случае, если наблюдается существенное усиление эффекта, эффект называется синергическим. Если же, наоборот, происходит уменьшение эффекта, в таком случае говорят об антагонистическом действии эффекторов.

В литературе можно найти исследования совместного действия активатора и ингибитора на скорость ферментативной реакции. Так, изоформа 3-фосфоглицератдегидрогеназы с АХТ доменом (АХТ - аспартаткиназа – хоризматмутаза – ТугА) в присутствии 0,1 мМ L-гомоцистеина (активатора) увеличивает значение концентрации L-серина (ингибитора), требуемой для достижения половины максимального

эффекта ингибирования (EC_{50}), почти в три раза. Использование других аминокислот вместо L-гомоцистеина, только в больших концентрациях, также приводило к кратному изменению EC_{50} [205].

Совместное неаддитивное действие двух ингибиторов продемонстрировано на примере влияния ионов Cd^{2+} , Hg^{2+} и Bi^{3+} и серосодержащих ингибиторов 1,3-дитиотреитола и диэтилдитиокарбамина натрия (ДЭДТК) на скорость реакции окисления ароматических диаминов пероксидазой корней хрена. Серосодержащие ингибиторы значительно усиливают ингибирующую способность Cd^{2+} и Bi^{3+} , при этом сочетание Bi^{3+} и ДЭДТК (второго субстрата пероксидазы) снижает индукционный период индикаторной реакции, которая появляется в присутствии второго субстрата. Добавление тиомочевины увеличивает собственную ингибирующую способность ионов ртути посредством восстановления дисульфидных мостиков в молекуле фермента [206].

Все виды сочетанного действия обнаружены для смеси различных фосфолипидов и арахидоновой кислоты на активность липидзависимой протеинкиназы С. Авторы предполагают наличие разного количества сайтов связывания с липидами у разных форм белка, причем в случае существования только одного центра связывания эффект аддитивен, а при наличии нескольких сайтов связывания фосфолипиды и арахидоновая кислота в зависимости от конкретного фосфолипида проявляют, как синергизм, так и антагонизм [207]. Замечено также, что лизофосфатидилхолины и их производные активируют протеинкиназу С в малых концентрациях, а в высоких, наоборот, ингибируют [208]. Такая сложная зависимость активности фермента от концентрации эффектора, в целом, характерна для аллостерически регулируемых белков.

В случае, когда для изменения активности фермента требуется одновременное присутствие сразу нескольких эффекторов, говорят о так называемом мультивалентном ингибировании/активации. Так, активность аспартаткиназы *Escherichia coli* подавляется сочетанием лизина, метионина и лейцина. Восемь взаимно усиливающих низкомолекулярных эффекторов обнаружены для глутаминсинтетазы: глицин, аланин, триптофан, гистидин, СТР, АМР, карбамоилфосфат и глюкозамин-6-фосфат [209].

На примере эффекторов щелочной фосфатазы в литературе продемонстрировано различие в величине и направлении совместного действия эффекторов при изменении их концентраций. Ионы цинка и цистеин по отдельности оказывают влияние на активность щелочной фосфатазы. Ионы цинка концентрации до 10^{-5} М активируют фермент, по-видимому, посредством восполнения потребности в металле активного центра фермента, а

при больших концентрациях ингибируют за счет формирования нерастворимых хелатов. Цистеин ингибирует фермент во всем диапазоне концентраций эффектора. Было показано, что ионы цинка и цистеин концентраций 10^{-3} М, каждый в отдельности, снижают активность фермента примерно в два раза. Однако если эффекторы в тех же концентрациях добавить к ферменту одновременно, то ингибирующий эффект окажется значительно ниже действия отдельно взятых эффекторов. Интересно то, что при снижении концентрации обеих эффекторов до 10^{-4} М, то есть в область концентраций, где они оба по отдельности проявляют ингибирующее действие, активность фермента, наоборот, увеличивается примерно в два раза по сравнению с активностью фосфатазы в отсутствие эффектора. Этот эффект авторы объясняют тем, что цинк, вероятно, связывается в значительной степени с цистеином, а не с белком, и уменьшение концентрации его свободного состояния позволяет системе перейти в зону активации реакции [210].

Аминокислоты в разных сочетаниях увеличивают антибактериальную активность ферментов миелопероксидазы и глюкозооксидазы [29]. Было изучено множество различных комбинаций эффекторов, при этом один из наилучших эффектов активации наблюдался в присутствии 1,25 мМ глицина и 1,25 мМ D-изолейцина. Авторы определили синергетические или антагонистические действия аминокислот на активность миелопероксидазной системы, исходя из варибельности величины колониеобразующих единиц (КОЕ). Так, синергетическое действие оказывают двойные смеси глицина и гистидина, глицина и лизина, глицина и глутаминовой кислоты. Наоборот, антагонистические действия проявили сочетания изолейцина и лейцина, лейцина и серина, валина и пролина. Аддитивное действие проявили двойные сочетания лизина и глутаминовой кислоты, аргинина и изолейцина, гистидина и лейцина.

Из вышеизложенных литературных данных можно заключить, что совместное действие эффекторов на ход каталитических реакций весьма разнообразно и порой даже неожиданно, поэтому исследование такого рода эффектов сложная, но интересная задача.

2.8. Вещества, влияющие на лизис бактерий лизоцимом

В литературе имеется не так много сведений о влиянии других веществ на бактериолитическую активность лизоцима. В ранних работах было показано, что гепарин концентрации выше 0,05 мг/мл уменьшает каталитическую активность лизоцима. Некоторые ядерные белки, такие как высокомолекулярные гистоны и низкомолекулярные протамины, а также пептон, гидролизат животных белков, полученный действием фермента

трипсина, являются активаторами лизоцима при общей концентрации активатора выше 10 мг/мл [211].

Ингибиторами лизоцима являются малые фрагменты муреина (тетра- и трисахариды), которые естественным образом образуются в ходе лизиса пептидогликана, а также их синтезированные аналоги [212]. Показано, что и более мелкие сахараиды, например, сам N-ацетилглюкозамин и его дисахарид тоже ингибируют лизоцим [213]. Ингибиторами лизоцима являются и другие, в том числе субстрат подобные олигосахариды, например, N,N-диацетилхитобиоза, N-ацетиллактозамин, N,N,N-триацетилхитотриоза. При этом, N,N,N-триацетилхитотриоза нашла применение в медицине в качестве лекарственного средства для лечения лизоцимного амилоидоза человека [39]. В литературе также можно найти сведения об уменьшении скорости лизиса клеток *Micrococcus luteus* лизоцимом в присутствии газообразных углеводов, таких как н-бутан, изобутан и пропан [214]. Имидазол и некоторые производные индола также ингибируют лизоцим, образуя комплекс с переносом заряда [215]. Ароматические аминокислоты триптамин и тирамин снижают скорость лизиса клеток *E. coli* лизоцимом [18].

Некоторые металлоорганические комплексы тоже уменьшают каталитическую активность лизоцима. Так, например, Ni₂AMD3100 (ADM3100 - ксиллибициклам, [1,4-фениленбис-(метилден)]-бис-1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан) имеет два сайта связывания с лизоцимом. В первом из них связывание осуществляется путем координации Ni(II) с Asp-101, а также гидрофобными взаимодействиями между цикламным кольцом и остатками Trp-62 и Trp-63 в лизоциме. Второй сайт связывания обусловлен гидрофобными взаимодействиями с Trp-123 [216]. Кроме того, куриный яичный лизоцим способен образовывать белково-аминокарбеновые конъюгаты в реакции с металлокарбеными комплексами. При этом фермент на 50% теряет свою каталитическую активность [217].

И хотя примеров ингибирования лизоцима в литературе описано существенно больше, чем активации, обнаружены и некоторые ускоряющие лизис бактериальных клеток молекулярные добавки. В ряде случаев наблюдается совместное синергетическое действие лизоцима и различных антибиотиков на лизис бактериальных клеток. Так, при содержании в среде пенициллина концентрацией 5 мкг/мл активность лизоцима на восприимчивом к пенициллину штамме *Staphylococcus aureus* в 10 раз выше, чем на штамме, резистентном к антибиотику [218]. Помимо пенициллина, антибиотики бацитрацин и полимиксин В ускоряют лизис клеток лизоцимом, при этом наибольшие активационные эффекты наблюдаются при 8-10 и 5 мкМ бацитрацина и полимиксина, соответственно [18]. Показано

также, что ЭДТА концентрации 0,1 мМ и выше в три раза увеличивает скорость лизиса клеток *E. coli* лизоцимом [18].

Некоторые ПАВ тоже влияют на скорость лизиса клеток лизоцимом, оказывая как активирующее, так и ингибирующее влияние. Высокие концентрации додецилсульфата натрия (SDS), додецилового спирта, лаурата натрия, децилбензолсульфоната натрия ингибируют лизоцим [219,220]. Однако при концентрации лизоцима 10 мкг/мл микромолярные концентрации SDS и DTAB (бромид додецилтриметиламмония), напротив, увеличивают скорость лизиса *M. luteus* [20]. Зависимость скорости лизиса от данных ПАВ имеет куполообразный вид. Эффект увеличения скорости лизиса клеток лизоцимом при малых концентрациях ПАВ предположительно объясняется изменившимся микроокружением активного центра фермента, а также уменьшением электростатического отталкивания между белком и бактериальной клеткой в результате взаимодействия молекулы фермента и молекул ПАВ. При высоких концентрациях ПАВ, вероятно, формируется гидрофобный комплекс ПАВ с лизоцимом, обладающий более низкой бактериолитической активностью [20]. Было исследовано также влияние неионногенных ПАВ на лизис клеток *Micrococcus luteus* куриным лизоцимом и обнаружен эффект ингибирования лизоцима в микромолярных концентрациях плюроники. Снижение бактериолитической активности фермента вызвано, по-видимому, образованием комплекса белок-ПАВ, который хуже связывается с поверхностью клетки бактерии за счет стерического фактора [22,221]. Показано также, что анионный ПАВ SDS и неионногенный ПАВ Tween-21 (этоксилированный эфир сорбитана на основе лауриновой кислоты) оказывают влияние на лизис бактерий *Lactobacillus plantarum* куриным лизоцимом. Наибольшая бактериолитическая активность фермента наблюдается в присутствии 0,1 мМ SDS и 0,1 мкМ Tween-21 [19].

Наиболее значимые эффекты ускорения лизиса бактериальных клеток куриным лизоцимом обнаружены в присутствии ряда аминокислот [18,21]. Если эффекты гидрофобных аминокислот слабо выражены, глицин и заряженные аминокислоты существенно увеличивают скорость лизиса клеток *E. coli* лизоцимом в миллимолярном диапазоне концентраций аминокислот. Свободные аминокислоты широко распространены в организме, поэтому они вполне могут быть рассмотрены в качестве потенциальных природных эффекторов лизоцима. Кроме того, аминокислоты сами по себе оказывают терапевтический эффект, что в перспективе позволяет создавать новые лекарственные препараты комплексного действия на основе лизоцима с добавлением наиболее эффективных сочетаний ускоряющих бактериальный лизис аминокислот. Здесь следует

упомянуть, что аминокислоты используются для получения антимикробных пептидов, которые являются эффективными противомикробными и антибиотикопреночными агентами, менее подверженными резистентности, нежели традиционные антибиотики [222,223]. Аминокислоты также используются для повышения эффективности (*in vitro*) существующих лекарственных средств, например, эффективность противомикробного препарата триметоприма была повышена посредством образования солей триметоприма с глутаминовой и аспарагиновыми кислотами [224]. Аминокислоты применяются в качестве антибиотикопреночных средств, усилителей растворимости существующих лекарственных препаратов и в комбинациях с противомикробными препаратами для повышения их эффективности за счет аддитивного эффекта или синергизма [225–228]. В следующем разделе приведены сведения об аминокислотах, прежде всего, как о лекарственных средствах. Речь пойдет о глицине, гистидине, глутаминовой кислоте, аспарагиновой кислоте, аргинине и лизине, выбранных нами в качестве низкомолекулярных веществ, влияние которых на ферментативный лизис бактерий *E. coli* предстоит изучить в настоящей работе.

2.8.1. Глицин и заряженные аминокислоты

Глицин представляет собой простейшую каноническую природную аминокислоту. Сам по себе глицин обладает бактериостатическим действием, обусловленным его способностью ингибировать синтез ПП клеточной стенки [229]. Так, было показано, что 6% содержание глицина в питательной среде приводит к снижению скорости роста бактериальной культуры *Enterococcus faecalis* на 90% [230]. Поскольку количество слоев ПП в клеточной стенке грамотрицательных бактерий значительно меньше, чем у грамположительных, считается, что количество глицина, необходимое для подавления роста грамотрицательных клеток, ниже, чем количество, необходимое для подавления роста грамположительных бактерий. Например, рост грамотрицательных бактерий *Selenomonas ruminantium* очень чувствителен к присутствию глицина. Лизис клеток происходил в течение 30 мин при 0,5% содержании глицина в среде. Грамположительные *Streptococcus bovis*, в свою очередь, более устойчивы к глицину, чем *E. coli* и *B. subtilis* [231]. Скорость роста *E. coli* замедляется уже в присутствии 0,5% глицина, а при содержании 1% и 2% глицина в питательной среде наблюдается лизис в течение 6 и 2 часов, соответственно. Добавление незаряженных L-аминокислот, а именно аланина, серина и треонина нивелирует бактериостатическое действие глицина на *E. coli*. Добавление заряженного L-

лизина, что интересно, не приводит к снятию эффекта глицина, а D-лизин также, как и глицин, оказывает бактериостатическое действие на *E. coli* [231]. Причем грамположительные бактерии *Staphylococcus aureus* оказались нечувствительны к действию как L, так и D-аминокислот. Эти литературные данные свидетельствуют о том, что влияние аминокислот на рост и лизис клеток существенно зависит от самих бактерий, при этом именно *E. coli* проявляет особую чувствительность к действию глицина и заряженных аминокислот, что дополнительно обуславливает выбор именно этих бактерий в качестве объекта исследования. Отметим так же, что глицин восстанавливает чувствительность к антибиотикам у бактерий с множественной лекарственной устойчивостью [232].

Глутамат натрия является универсальным усилителем вкуса в пищевой промышленности. Считается, что посредством действия глутамата на рецепторы языка формируется вкус высокобелковой пищи или «умами», как его еще называют в странах Дальнего Востока [233]. Однако этим биологическая роль глутаминовой кислоты, конечно, не ограничивается. Глутамат выполняет роль возбуждающего нейромедиатора у позвоночных. При этом, в синоптическую щель секретируется исключительно эндогенный глутамат, поэтому злоупотребление глутаматом, получаемым с пищей, не может вызвать нарушения в работе мозга и нервной системы в целом [234]. Тем не менее, в случае некоторых психических расстройств возможно терапевтическое лечение глутаматом. Известно, что глутамат натрия, как и глицин, действует на NMDA-рецепторы (ионотропные рецепторы глутамата), что приводит к активации протеинкиназы CaMK-II. Она, в свою очередь, фосфолирует ряд белков нейрона-реципиента, и этот каскад химических реакций в результате приводит к улучшению памяти и обучаемости [235]. Влияние глутамата на организм комплексно. Он активизирует гормоны надпочечников, что приводит к повышению сопротивляемости физическим и психоэмоциональным нагрузкам. Кроме того, глутамат участвует в подавлении воспалений и аллергических реакций. Глутаматсодержащие фармацевтические препараты применяют при лечении пневмонии, эпилепсии, деменции и постродовых травм [236]. Отметим также, что метаболизм глутамата играет ключевую роль в выживании бактерий в условиях кислотных, гипоксических и гиперосмотических стрессоров [237]. Так, делеция генов транспортеров глутамата *GltS*, *GltP* и *GltI* в штамме *E. coli* K-12 приводит к снижению толерантности данной бактерии к антибиотикам (а именно, к левофлоксацину и офлоксацину), стрессовым факторам (кислоту pH и теплу), а также к снижению способности к адгезии и инвазии в эпителиальные клетки мочевого пузыря человека [238]. Роль переносчика глутамата в

кислотоустойчивости *E. coli*, в частности, может быть объяснена тем, что он позволяет высвобождать внутриклеточный глутамат, образующийся при дезаминировании глутамина, что, в свою очередь, сопровождается образованием аммиака и повышением внутриклеточного pH [239].

Лизин, как и глутамат, задействован в работе нервной системы. Так, известно, что в нейронах преобладают белки, богатые лизином [240]. Было показано, что лизин действует как депрессант основной нервной системы с антисудорожным действием [241], а также проявляет свойства частичного антагониста серотониновых рецепторов [242]. Примечательно, что пипеколовая кислота, главный метаболит лизина в мозговых тканях, выполняет роль нейромодулятора в ГАМК-системе [243]. Нарушения метаболизма лизина могут запустить дегенеративные процессы в нервной ткани, способные привести к серьезным когнитивным расстройствам, вплоть до умственной отсталости [240]. При этом, участием в работе нервной системы роль лизина в организме не ограничивается. С помощью остатков лизина осуществляется межмолекулярная «сшивка» фибрилл костного коллагена, то есть лизин крайне важен для нормального функционирования опорно-двигательной системы [244]. Лизин в сочетании с экстрактом прополиса и оксидом цинка используется в лечении симптоматики герпеса [245]. Активные формы кислорода, высвобождающиеся в ходе окисления лизина ферментом L-лизин-альфа-оксидазой, эффективно убивают клетки, что находит применение в противоопухолевой терапии [246]. Известно также, что лизин увеличивает кишечную абсорбцию кальция и устраняет его почечную экскрецию, что предполагает потенциальную роль лизина в лечении остеопороза [247]. Внутривенное введение больших доз лизина повышает секрецию инсулина, что приводит к уменьшению концентрации глюкозы в крови и может использоваться при лечении диабета [248]. Использование же лизина в качестве пищевой добавки в рационе недоношенных младенцев способствует их росту и развитию [249]. Лизин также применяется для лечения симптомов гипераргининемии и гипертриглицеридемии [250,251]. Показано также, что лизин в концентрациях до 20 мМ повышает антибактериальную активность миелопероксидазной системы по отношению к штамму *Staphylococcus aureus* [29].

Аспарагиновая кислота получила применение в форме растворимых аспаратов магния и кальция при лечении аритмии, стенокардии и профилактике инсульта. Данная композиция является активным компонентом лекарственного препарата под коммерческим названием «Панангин», при этом лечебное действие оказывают не только ионы кальция и магния, но и сама аспарагиновая кислота, так как было замечено, что она повышает

потребление кислорода сердечной мышцей. Кроме того, аспарагиновая кислота снижает риск появления уродств на эмбриональной стадии развития [252]. Примечательно, что производное аспарагиновой кислоты, ацетиласпарагиновая кислота, как было показано, уменьшает признаки старения кожи и рассматривается в качестве перспективного активного компонента для использования в косметологии [253].

Гистидин является предшественником биогенного амина гистамина, в который он превращается путем декарбоксилирования, осуществляемого ферментом гистидиндекарбоксилазой. Гистамин принимает участие во многих физиологических процессах, в частности, путем активации гистаминового рецептора H₂ увеличивает секрецию желудочного сока. Активация же другого гистаминового рецептора H₄ приводит к выработке цитокинов, осуществляющих иммунный ответ организма. Химически модифицированная аминокислота α -фторметилгистидин является необратимым ингибитором гистидиндекарбоксилазы и находит применение при лечении язвы желудка и аллергии [254]. Препарат гидрохлорида гистидина назначают при комплексном лечении гепатита и атеросклероза [255]. Гистидин также минимизирует повреждения сосудов, вызванные химиотерапевтическим средством сорафенибом (SFN), назначаемым при терапии пациентов, больных гепатоцеллюлярной карциномой [256]. Кроме того, недавно было показано, что гистидин и аргинин способствуют восстановлению клеток кишечника путем поддержания необходимой внеклеточной концентрации трансформирующего фактора роста- β_1 [257].

Роль аргинина в организме весьма обширна. Аргинин участвует в регуляции уровня глюкозы и холестерина в крови, способствует ускоренному восстановлению соединительных тканей, активирует секрецию соматропина, является одним из компонентов цикла мочевины, снижает молочнокислый ацидоз, появляющийся в результате интенсивной мышечной нагрузки, служит единственным источником нейромедиатора оксида азота (II) в нейронах [255]. Пищевые добавки с аргинином используются в качестве средства улучшения функции Т-лимфоцитов и находят наибольшую клиническую пользу у пациентов, перенесших плановое хирургическое вмешательство [258]. Аргинин особенно активно потребляется быстрорастущими раковыми клетками, поэтому использование превращающих его ферментов, например аргининдезимины, аргиназы или аргининдекарбоксилазы, позволяет ограничить рост злокачественной опухоли [259]. Более того, было замечено положительное влияние аргинина в устранении эндотелиальной дисфункции, являющейся основной причиной сердечно-сосудистых заболеваний, таких как гипертензия и атеросклероз [260]. Это связано

с тем, что аргинин тормозит агрегацию тромбоцитов и препятствует формированию атеросклеротических бляшек [261]. Агматин, продукт декарбоксилирования аргинина, может активировать α -1-адренорецепторы и имидазолгуанидиновые рецепторы, что приводит к увеличению таких важных показателей работы почек как скорости клубочковой фильтрации и канальцевой реабсорбции. Это свойство агматина используется для лечения острой почечной недостаточности и преэклампсии [262]. Замечательно использование аргинина также как компонента зубной пасты, повышающего рН зубной полости для предотвращения развития кариеса вследствие превращения аргинина в цитруллин нормальными стрептококками микрофлоры человека, продуцирующими аргининдезимиразу [263].

2.8.2. Ионы кальция

Ионы кальция являются одними из самых многочисленных ионов в организме. Вместе с фосфат ионами они формируют нерастворимые гидроксиапатиты, служащие основой костей и зубов [264]. Ионы кальция – чрезвычайно распространенный вторичный мессенджер, участвующий во множестве биологических процессов, начиная от сокращения мышц, заканчивая свертыванием крови [265]. Кальций задействован в механизмах выработки гормонов и нейромедиаторов, а также регулирует работу кальций-зависимых ферментов. Содержание кальция в крови находится на уровне 2,5 ммоль/л. Регуляция его концентраций в различных биологических жидкостях и костях в организме осуществляется посредством паратиреоидного гормона, кальцитонина и витамина D3 [266]. Основной кальций-связывающий белок - кальмодулин [267]. Нарушением кальциевого обмена в организме обусловлены такие заболевания как остеопороз, гипо- и псевдогипопаратиреоз и ряд других [268–270]. При этом ионы кальция могут оказывать влияние на эффективность некоторых лекарственных препаратов, например, таких белковых антибиотиков, как даптомицин и малацидин [271].

Важно отметить, что кальций стабилизируют поверхностные структуры бактериальной клетки. В частности, он связывается с фосфатами в липополисахаридах или в тейхоевых кислотах, формируя ионные мостики между молекулами сахаридов, что в свою очередь увеличивает прочность клеточной стенки бактерии [168,172]. Помимо фосфатов, кальций связывается с карбоксильными группами ПГ [272]. Ионы магния, также вовлеченные в данный процесс, предположительно, играют несколько меньшую роль, однако было выяснено, что их удаление приводит к осмотической неустойчивости клеток

Pseudomonas aeruginosa, которая восстанавливается в присутствии добавленного извне раствора соли магния [273]. При этом у *P. aeruginosa* ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} связаны с мембраной примерно в равных количествах [274]. Факт стабилизирующего действия ионов кальция на оболочку бактерий наводит на мысль о неизбежности их влияния на лизис бактериальных клеток лизоцимом.

В литературе было показано, что обработка бактерий в трис буфере раствором ЭДТА, обладающим выраженной хелатирующей способностью по отношению к двухвалентным металлам, приводит к наиболее эффективной десорбции ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} с поверхности клеток [275]. Так, при обработке 1 мкМ ЭДТА изолированных оболочек клеток *P. aeruginosa* в раствор переходят 42% Ca^{2+} и 83% Mg^{2+} от общего количества ионов, связанных со клеточной стенкой [276]. Обработка бактерий ЭДТА частично разрушает оболочку клетки, что позволяет лизоциму и другим бактерицидным агентам, например, антибиотикам, проникать внутрь клетки, и, в конечном счете, приводит к ее лизису под действием осмотического шока [277].

Дополнительно скажем, что совместное действие лизоцима и ЭДТА на лизис бактериальных клеточных стенок *P. aeruginosa* в трис буфере ранее уже было исследовано. При pH 8 было продемонстрировано более чем 6-ти кратное увеличение скорости и степени разрушения клеточных стенок в присутствии 30 мкг/мл лизоцима и 1 мкМ ЭДТА по сравнению с образцом в отсутствие ЭДТА [276]. Кроме того, ЭДТА позволяет обойти устойчивость некоторых бактерий к действию ряда лекарств [275]. Так, изолированные цитоплазматические мембраны *E. coli* чрезвычайно восприимчивы к действию валиномицина, облегчающему транспорт калия, однако препарат неактивен на цельные клетки, пока те не подверглись воздействию ЭДТА [278]. Влияние декальцинации бактериальных клеток, вызванной действием ЭДТА, на скорость их лизиса лизоцимом будет изучено в рамках настоящей работы.

Здесь же следует отметить, что не только поверхность бактериальной клетки, но и сам лизоцим может связываться с ионами кальция [279]. Для связывания с двухвалентными металлами у молекулы фермента имеется два сайта, оба в непосредственной близости от активного центра. Показано, что при изменении pH от 7,4 до 8 константа связывания кальция с лизоцимом понижается с $66,7 \text{ M}^{-1}$ до $40,7 \text{ M}^{-1}$. При этом добавление $0,2 \text{ M Ca}^{2+}$ к раствору лизоцима концентрации $1,4 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ при pH 6 приводит к снижению ферментативной активности на искусственном субстрате $(\text{NAG})_6$ в среднем до 26% от ее первоначальной величины [23]. Можно ожидать, что ингибирующее действие кальция на лизоцим проявляется и по отношению к живым клеткам.

2.9. Методы регистрации бактериолитической активности

Мерой интенсивности протекания лизиса клеток путем воздействия на них некоторого фактора (например, фермента) называется бактериолитической активностью данного фактора. Для того чтобы определить ее, требуется выбрать надежный метод детекции процесса разрушения клеток путем измерения параметра, различного для цельных и лизированных клеток, например, их светорассеивания, концентрации определенных клеточных метаболитов или способности клеток к размножению.

Начать рассмотрение логично с прямого метода подсчета КОЕ [280]. В данном методе бактериальные колонии подсчитывают визуально в прошедшей инкубацию питательной среде, в которую предварительно высеяли соответствующие объемы клеточных суспензий, отобранных по истечении разного времени после обработки бактериолитическим ферментом. Чем позже после добавления фермента отобрана проба, тем меньше живых нелизированных клеток в ней остается, а следовательно, меньше колоний вырастает на чашке Петри. Разница в числе КОЕ на чашках позволяет определить скорость лизиса клеток. Очень длительное время инкубации, определяемое скоростью роста бактерий (часто длящимся более суток), и высокая трудоемкость метода делает его больше пригодным для качественной детекции жизнеспособных бактерий в образцах с их низким содержанием, например, в продуктах питания, нежели для определения бактериолитической активности ферментов.

Для мониторинга роста бактериальных культур используются автоматические приборы, такие как цитосенсорный микрофизиометр [281], измеряющий изменение pH питательной среды, а также инструменты, детектирующие жизнедеятельность клеток на основе измерения проводимости, связанном с выделением бактериями заряженных метаболитов. Изменение соотношения жизнеспособных и разрушенных клеток, происходящее в результате лизиса, приводит к изменению аналитического сигнала, однако это изменение в ряде случаев носит сложный характер, что ограничивает использование этих методов для непосредственного определения скорости лизиса [282,283].

Лизис бактерий сопровождается выделением во внешнюю среду внутриклеточных компонент. Измерение их концентрации может служить альтернативным способом определения доли лизированных бактерий с условием, если данная компонента выделяется во внешнюю среду только при полном разрушении клетки (а не в результате нормальной жизнедеятельности или резких изменений условий внешней среды). Фермент бактерий

глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД) как раз подходит под этот критерий и является хорошим маркером для определения доли лизированных клеток. Измерение его ферментативной активности проводится спектрофотометрически при длине волны 340 нм, соответствующей максимуму поглощения NADH [284]. Измерение количества белка, выделяемого в результате лизиса клеток во внешнюю среду такими методами как, например, методом Бредфорд и Лоури или с использованием бидинхониновой кислоты [285–287] осложнено характером изменения сигнала. Однако существует возможность измерять концентрацию белков цитоплазмы, которые в обычных условиях не экспрессируются во внешнюю среду и выделяются только при нарушении целостности внешней мембраны бактерии. Определение такого белка принципиально возможно посредством использования специфических к ним антител или путем радиоактивного мечения [288,289].

К методам количественного определения общего числа бактерий относят биолюминесцентный метод определения АТФ, проточную цитометрию, количественную ОТ-ПЦР, ИФА, а также ряд электрохимических методов. Биолюминесценция АТФ широко используется для оценки общей микробной массы, но она больше пригодна для выявления бактериологического заражения, нежели для определения изменения числа живых клеток со временем [290]. Это связано с тем, что АТФ выделяется не только живыми клетками, но и клетками в момент их лизиса, что затрудняет проведение такого анализа в режиме реального времени. Кроме того, строгая корреляция между количеством клеток и уровнем АТФ получена только при определенных условиях, поскольку содержание внутриклеточного АТФ различается между микробными таксонами и сильно зависит от внешних условий, фазы роста клеток и иных факторов [291]. Данный метод имеет высокую чувствительность, но вместе с тем и высокий фоновый шум, поэтому пригоден в основном для определения малого количества биомассы.

Проточная цитометрия основана на последовательной детекции единичных окрашенных флуоресцентным красителем клеток путем определения их светорассеивания и флуоресценции [292]. С помощью этого высокотехнологичного метода возможно как определение внутриклеточных белков, так и числа и морфологии клеток с пределом обнаружения 10^4 - 10^5 клеток в мл. Цитометрия одновременно регистрирует не только цельные клетки, но более мелкие частицы, например, фрагменты разрушенных бактерий, что осложняет интерпретацию результатов [293]. Данный метод позволяет решать широкий спектр задач, однако он требует дорогого оборудования и реактивов.

Метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), как и биолюминесцентный метод, имеет низкий предел обнаружения. Он может проводиться в режиме реального времени по изменению интенсивности флуоресценции красителей, связывающихся с ДНК. В ходе лизиса клеток ДНК высвобождается, и введенный экспериментатором фермент ДНК полимеразы осуществляет получение множества копий ДНК и тем самым усиливает аналитический сигнал. По изменению интенсивности флуоресценции можно оценить скорость лизиса бактерий [294]. Минусом ПЦР метода также является его трудоемкость и дороговизна.

К электрохимическим методам можно отнести методы, в которых обнаружение клеток осуществляется с помощью амперометрических, потенциометрических и кондуктометрических детекторов. Они базируются на том, что в ходе своей жизнедеятельности клетка меняет состав внешней среды, а, следовательно, и ее электрохимические свойства [295]. Так, в процессе микробного окисления компонентов среды изменение окислительно-восстановительного потенциала может быть зафиксировано с помощью потенциометрического детектора [296,297]. Такие ионы как SO_4^{2-} , NO_3^- , HCO_3^- , а также органические кислоты и секретируемые во внешнюю среду белки позволяют количественно определять бактерии в образце [298,299], однако на точность подобных измерений существенно влияет метаболическая активность клеток, которая, в свою очередь, сильно зависит от стадии роста культуры [300]. В ходе бактериального лизиса также можно ожидать изменение электрохимических свойств среды ввиду как прекращения жизнедеятельности клеток, так и высвобождения их внутреннего содержимого. Тем не менее, интерпретация этого сигнала может быть затруднена ввиду сложности химического состава цитоплазмы бактерий.

Следует отметить, что одну из ведущих позиций в клинической диагностике среди методов обнаружения патогенных микроорганизмов, занимает иммуноферментный анализ (ИФА) [301]. Он может быть выполнен во множестве вариаций, но всегда основывается на специфичности связывания антитела с антигеном. Так, например, если к специфичному к антигену (например, бактерии) антителу присоединить ковалентно ферментную метку, то при образовании комплекса антитело-антиген фермент будет превращать добавляемый извне реагент в продукт, передающий аналитический сигнал (будь то изменение оптического поглощения, флуоресценция или Red-Ох потенциал среды). Таким образом по величине сигнала можно судить о количестве связавшегося антигена, а следовательно, о бактериологической загрязненности исследуемого образца. Для обнаружения штаммов *Y. pestis*, морфологически схожих с *E. coli*, было предложено использовать меченные

пероксидазой моноклональные антитела с детекцией изменения потенциала системы на потенциометрических датчиках [302]. Несмотря на низкие пределы обнаружения и высокую селективность метода ИФА он требует больших затрат времени, поэтому больше подходит для детекции малых количеств патогена, нежели для непосредственного наблюдения за процессом лизиса клеток.

2.10. Турбидиметрический метод анализа

Среди существующих методов регистрации бактериолитической активности наиболее методически удобным для измерения скоростей лизиса живых клеток в режиме реального времени является турбидиметрический метод анализа [303,304]. Экспрессный, не требующий дорогостоящего оборудования и реагентов (расходных материалов), он прост в исполнении и хорошо подходит для выполнения поставленных в данной работе задач.

Турбидиметрия представляет собой метод количественного измерения светорассеяния суспензии с использованием спектрофотометра или фотометра при фиксированной длине волны света, пропускаемого через исследуемый образец [305]. Аналитическим сигналом в турбидиметрии служит оптическое поглощение $A(t)$ при заданной длине волны испускаемого света, то есть десятичный логарифм отношения интенсивности излучаемого света I_0 к интенсивности прошедшего излучения I :

$$A(t) = \lg \frac{I_0}{I} \quad (1)$$

Метод турбидиметрии используется для оценки числа клеток в суспензии при контроле их роста [306–308]. Для нас же особый интерес представляет тот факт, что данный метод зарекомендовал себя в области исследования работы бактериолитических факторов [309,310]. Скорость ферментативного лизиса клеток в общем случае находится как разница наклонов прямолинейных участков изменения поглощения (т.е. величин dA/dt) суспензии до и после добавления фермента. Типичный вид кривой, полученный в ходе турбидиметрического эксперимента, представлен на рис. 9. Не так давно была разработана математическая модель, позволяющая количественно описывать процесс лизиса бактерий с возможностью корректного перевода турбидиметрически измеряемых величин непосредственно в величины скорости изменения числа живых колониеобразующих единиц (КОЕ) [26,311]. Для вывода математического уравнения начальной скорости лизиса было сделано справедливое допущение, что изменение оптических свойств цельной и

разрушенной клетки различаются, и изменение их оптического поглощения происходит скачкообразно в момент разрушения клетки. При этом в зависимости от вида клеток возможна некоторая остаточная величина оптического поглощения разрушенных клеток, отличная от нуля (а иногда равная нулю, например, для используемых в настоящей работе бактериальных клеток *Escherichia coli*) [311].

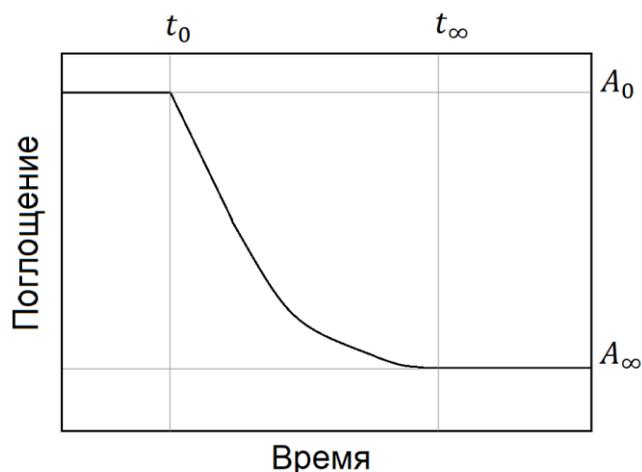


Рисунок 9. Типичный вид падения оптического поглощения клеточной суспензии. t_0 – момент добавления фермента.

Разумно предположить, что $A(t)$ клеточной суспензии прямо пропорционально числу содержащихся в ней клеток в любой момент времени. Соответственно, это справедливо как для начального значения оптического поглощения суспензии A_0 , так и для остаточного значения A_∞ . Пусть $\theta(t)$ – доля разрушенных клеток в определенный момент времени. Тогда доля целых клеток можем записать, как $1 - \theta(t)$. В любой момент времени справедливо следующее выражение:

$$A(t) = A_0 \cdot (1 - \theta(t)) + A_\infty \quad (2)$$

Отсюда легко определяется $\theta(t)$:

$$\theta(t) = \frac{A_0 - A(t)}{A_0 - A_\infty} \quad (3)$$

Одновременно с этим, путем прямого подсчета живых клеток (колониобразующих единиц КОЕ) в мл суспензии имеем:

$$[\text{КОЕ}] = [\text{КОЕ}]_0 \cdot (1 - \theta(t)), \quad (4)$$

где $[\text{КОЕ}]_0$ – исходное число клеток. Тогда $\theta(t)$ имеет вид:

$$\theta(t) = 1 - \frac{[\text{КОЕ}](t)}{[\text{КОЕ}]_0} \quad (5)$$

Приравняв выражения (3) и (5) и продифференцировав по времени, находим выражение для начальной скорости лизиса:

$$V = -\frac{d[\text{КОЕ}](t)}{A_0 - A_\infty} \cdot \frac{dA(t)}{dt} \quad (6)$$

Полученное выражение демонстрирует принципиальную возможность измерять скорость лизиса клеток с помощью турбидиметрического метода анализа. Ее справедливость подтверждена методом прямого подсчета КОЕ [26,311]. Однако для грамотного определения бактериолитической активности фермента необходимо соблюсти ряд дополнительных экспериментальных условий. Во-первых, зависимость оптического поглощения суспензии имеет линейность только на участке до 0,8 опт. ед. (при длине волны 650 нм). Это значит, что только в пределах этого диапазона можно с уверенностью утверждать, что оптическое поглощение клеток прямо пропорционально концентрации бактерий в суспензии [26,28]. Во-вторых, следует учесть, что лизис клеток происходит в два этапа. В начале фермент адсорбируется на клеточной стенке бактерии и осуществляет непосредственно каталитический акт гидролиза муреина, после чего ввиду потери целостности внешней оболочки клетки при наличии разности давлений внутри и снаружи клетки происходит ее разрушение (см. рис. 10).



Рисунок 10. Схематическое представление ферментативного лизиса бактериальных клеток.

Поскольку оптическое поглощение бактерий изменяется только в момент деструкции клетки, для корректной интерпретации данных турбидиметрического эксперимента необходимо проводить его в условиях, когда каталитический акт происходит медленнее, чем разрыв бактерий. Как добиться этого условия? Осмотическое разрушение поврежденной клетки происходит только в гипотоническом растворе [312]. Поскольку внутренняя ионная сила большинства прокариот приблизительно равна таковой для физиологического раствора, то можно утверждать, что скорость лизиса клеток убывает с

возрастанием ионной силы среды до величин около 150 мМ. При низкой же ионной силе фермент непродуктивно связывается на поверхности клетки, и скорость лизиса в этой области также невелика. Поэтому существует некоторое оптимальное значение ионной силы буферного раствора, в котором лизис бактерий происходит с наибольшей скоростью. В окрестности оптимального значения осмимольности буфера активность бактериолитического фермента достаточно высока, и одновременно с этим процесс разрыва клетки не лимитирует скорость процесса лизиса.

Кроме того, следует учитывать, что бактериолитическая активность фермента зависит от рН среды. Для каждой бактерии существует свой оптимум рН, в котором фермент проявляет наибольшую активность. Измерения, проведенные при значениях рН существенно отстоящих от оптимума работы фермента, не позволяют корректно измерять кинетику процесса. Подбор оптимальных значений рН и осмимольности среды для проведения турбидиметрического анализа необходим при проведении исследования лизиса любых бактериальных клеток. В частности, это было продемонстрировано на примере лизиса *M. luteus* [313], *E. coli* [26], *L. plantarum* [314].

Наконец, выбор количества добавляемого к суспензии фермента также не может быть произвольным. Было показано, что линейность зависимости скорости лизиса бактериальных клеток от концентрации лизоцима наблюдается только при малых (микрограммовых) количествах фермента [27]. Предполагается, что при больших концентрациях фермента каталитическая стадия перестает быть скоростью лимитирующей, а следовательно процесс лизиса в таких условиях определяется осмотическим разрывом клетки.

2.11. Адсорбция лизоцима на клетках

Изменения скорости процесса ферментативного лизиса клеток, вызванные влиянием различных физико-химических факторов, могут сказываться как непосредственно на каталитическом акте реакции, так и на предшествующей ему сорбции фермента на субстрате. В случае лизиса живых бактерий лизоцимом, этим субстратом служит поверхность самой бактериальной клетки. В литературе ферментативная активность лизоцима изучалась, в основном, на искусственных субстратах или изолированных клеточных оболочках [23,276]. В нашей лаборатории был разработан удобный метод исследования адсорбции бактериолитических ферментов на живых бактериях [27], описанный в разделе «Материалы и методы». Именно турбидиметрическое определение

концентрации лизоцима по его активности оказалось предпочтительным для выполнения данной задачи, поскольку измерение лизоцима иными, например, стандартными колориметрическими методами, дает неточный результат, ввиду того что концентрация общего белка в растворе в ходе лизиса может меняться.

Следует отметить, что в зависимости от вклада в ход протекания химической реакции сорбцию принято разделять на два типа: продуктивную и непродуктивную [24,25]. Продуктивная сорбция предшествует успешному каталитическому акту, в то время как непродуктивная препятствует протеканию ферментативной реакции. В случае лизиса бактериальных клеток лизоцимом, непродуктивная сорбция вызвана связыванием фермента с молекулярными структурами поверхности клеток, отличными от муреина, или же со специальными «молекулами-ловушками», например, упомянутыми ранее параплазматическими ингибиторами лизоцима, которые, кстати, способны экспрессировать клетки *E. coli*. Изменение параметров адсорбции лизоцима на бактериальных клетках может быть вызвано изменением вкладов в общую адсорбцию фермента продуктивного и непродуктивного типов сорбции.

Показано, что адсорбция лизоцима на бактериальных клетках удовлетворительно описывается уравнением сорбции Ленгмюра [27].

$$\Gamma = \frac{\Gamma_{max} \cdot [E]}{K_d + [E]}$$

где Γ – адсорбция лизоцима на клетках (пг/клетка); Γ_{max} – максимальное количество фермента, связавшегося с клеткой (пг/клетка) (так называемая максимальная сорбционная емкость клеток по отношению к лизоциму); $[E]$ – концентрация свободного фермента (М); K_d – константа десорбции (М).

Было также продемонстрировано влияние ионной силы и рН на изменение параметров адсорбции лизоцима на клетках в отсутствие каких-либо эффекторов. Увеличение концентрации NaCl в буферном растворе приводит к увеличению K_d при неизменном Γ_{max} [27], в то время как отхождение от оптимального для лизиса данной системы значения рН приводит к снижению Γ_{max} при неизменном K_d [314]. Исследование влияния эффекторов на изменение сорбционных параметров является одной из ключевой задач данной работы.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Материалы и оборудование

В работе использованы следующие реактивы: куриный лизоцим из яйца, MES, Трис (Amresco, США); борная кислота, HCl (Компонент-Реактив, Россия); ЭДТА, гидроксид натрия, дигидрофосфат калия, гидрофосфат натрия (Panreac, Испания); дигидрат хлорида кальция (Fluka, Германия); L-глутамат (MeiHua (梅花), Китай); глицин (Roth, Германия); L-аргинин, L-аспарагиновая кислота, карбонат натрия (Merck, Германия); L-лизин, L-гистидин (Serva, Германия); хлорид натрия (Isocommerz, Германия); глюкоза (Rokett Frer, Франция); сульфат магния (Helicon, Россия); дрожжевой экстракт (Biospringer, Франция); бактотриптон, бактоагар (BD Difco, США); триптозный агар (Ferak Berlin, Германия); рекомбинантный лизоцим человека (выращенный в рисе), лиофилизированные бактериальные клетки *Micrococcus luteus* (Sigma, США).

Для работы применяли следующее оборудование: спектрофотометр UV-1800 (Shimadzu, Япония), микропланшетный фотометр Multiskan Ascent (Thermo Scientific, США), спектрофлуориметр Cary Eclipse Varian (Agilent, США), центрифугу Minispin (Eppendorf, Германия), центрифугу 5804R (Eppendorf, Германия), ротор F-34-6-38, pH-метр Thermo Orion-420 (Thermo Scientific, США), термостат суховоздушный TCO-1/80 СПУ модель 1005 (Россия), термостат водяной LT-105a (LOIP, Россия), весы аналитические ОН-РА64 (Ohaus, США), шейкер-ротатор Multi Bio RS-24 66 (Biosan, Латвия), монокулярный биологический микроскоп КР-РН35-1600 (Коррасе, Китай), зеркальный фотоаппарат Canon EOS 5D Mark IV (Canon, Япония).

Культуры бактериальных клеток *Escherichia coli* штамм KS-507 линии K-12 (B-3254) и *Priestia megaterium* штамм ATCC 14581 (B-9869) (основные штаммы в настоящей работе) получены из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (НИЦ “Курчатовский институт”, Россия). Культуры бактериальных клеток *Priestia megaterium* (KM МГУ 17), *Pseudomonas fluorescens* (KM МГУ 71), *Alcaligenes faecalis* (KM МГУ 82), *Escherichia coli* (KM МГУ 85), *Aeromonas liquefaciens* (KM МГУ 89), *Citrobacter freundii* (KM МГУ 115), *Erwinia cerotovorora* (KM МГУ 173), *Proteus vulgaris* (KM МГУ 206) коллекции микроорганизмов биофака МГУ любезно предоставлены Чердынцевой Татьяной Андреевной. Все используемые в исследовании бактерии были охарактеризованы с использованием метода микроскопии.

Бактерии *E. coli* KS-507, а также все бактериальные штаммы из коллекции микроорганизмов биофака МГУ (КМ МГУ) выращивали при 37°C в жидкой питательной среде LB, pH 7,2 в соответствии со стандартной методикой [315]. Клетки в виде суспензии с концентрацией 10^9 КОЕ/мл в буферном растворе 0,01 М Трис-MES-CH₃COOH замораживали путем погружения пробирок в жидкий азот порциями по 0,5 мл. Для каждого эксперимента суспензию бактерий размораживали, центрифугировали при 6000 об/мин (2073 g) на центрифуге Minispin в течение 7 минут. После отделения супернатанта, осадок ресуспендировали в 400 мкл буферного раствора, используемого в конкретном эксперименте. В полученной суспензии с оптическим поглощением $A_{650} = 0,45$ концентрация клеток *E. coli* равнялась $3,0 \cdot 10^8$ КОЕ/мл.

Культивирование клеток *P. megaterium* ATCC 14581 (B-9869) осуществляли в жидкой питательной среде LB, pH 7,2; при температуре 30°C [152]. Полученные аликвоты клеточной суспензии объемом 1,5 мл замораживали при температуре -70°C. Непосредственно перед проведением экспериментов суспензию клеток размораживали, центрифугировали 7 мин при 6000 об/мин (2073 g) на центрифуге Minispin и ресуспендировали осажденные клетки в буферном растворе 0,02 М Трис-HCl, 55 мМ NaCl, pH 8,0. Оптическое поглощение полученной суспензии $A_{650} = 0,40$ соответствовало концентрации живых клеток $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл.

Однократное замораживание и оттаивание не влияло на концентрацию живых клеток в пределах погрешности эксперимента. Аликвоты с суспензией бактериальных клеток хранились не более 3-х недель в холодильнике при температуре -70°C. Концентрация клеток в суспензии была определена пересевом на чашки Петри на твердую агаризованную среду.

3.2. Методы исследования

3.2.1. Измерение бактериолитической активности

Бактериолитическую активность (скорость лизиса клеток) измеряли турбидиметрическим методом по изменению оптического поглощения A_{650} суспензии клеток во времени ($-A_{650}/dt$). Изменение во времени оптического поглощения ($V = -dA_{650}/dt$) пропорционально изменению числа бактериальных клеток во времени ($-d\text{КОЕ}/dt$) [26,311]. Измерения проводили на двухлучевом спектрофотометре UV-1800 в кювете объемом 500

мкл и длиной оптического пути 1 см при длине волны 650 нм и температуре 37 °С. Если не указано иное, в начале измерения концентрация бактериальных клеток *E. coli* KS-507 и *P. megaterium* ATCC 14581 (B-9869) в суспензии равнялись $3,0 \cdot 10^8$ КОЕ/мл ($A_{650} = 0,45$) и $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл ($A_{650} = 0,40$), соответственно. Начальное оптическое поглощение суспензии бактериальных клеток из коллекции микроорганизмов биофака МГУ (A_{650}) составляло 0,45 (стандартное оптическое поглощение бактериальной суспензии для определения бактериолитической активности лизоцима [316]). Начальная скорость ферментативного лизиса клеток *E. coli* линейно зависит от концентрации лизоцима, возрастая в диапазоне 0,05–1,00 мкг/мл [26,311,317]. Скорость лизиса клеток *P. megaterium* прямо пропорциональна концентрации фермента при его концентрации от 0 до 7 мкг в мл. В экспериментах по измерению активности лизоцима добавляли до его конечной концентрации в кювете 0,1 мкг/мл (в работе с *E. coli*) и 0,5 мкг/мл (в работе с *P. megaterium*). Концентрация фермента для иных микроорганизмов указана в табл. 5 (см. с. 86). После внесения в реакционную смесь субстрата (суспензии бактериальных клеток) и растворов эффекторов до добавления фермента (т.е. до начала регистрации скорости ферментативного лизиса клеток) в течение 3–4 минут регистрировали фоновое изменение поглощения, которое далее учитывали как поправку при расчете скорости ферментативного лизиса. Скорость фонового изменения поглощения A_{650} не превышала средней величины погрешности измерения скорости лизиса клеток в присутствии фермента. Скорость ферментативного лизиса клеток регистрировали на протяжении 5 минут. рН растворов всех добавок доводили с помощью растворов HCl и NaOH до значения рН буфера, в котором проводились измерения. Все используемые в работе эффекторы в концентрациях, как минимум, до 50 мМ каждого, во всех используемых в работе сочетаниях не влияют на фоновое изменение оптического поглощения суспензии клеток (в отсутствие фермента). Результаты представлены как среднее и погрешность, рассчитанная по Стьюденту для доверительного интервала 0,95 для не менее чем трех независимых измерений. Планки погрешностей на графиках представляют собой 95% доверительный интервал для среднего. В случае, если на графике или в таблице не указана погрешность, она не превышала 15% от значений. Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена были вычислены в программе Wolfram Mathematica 10. Version number 10.2.0.0. (Wolfram Research, США).

3.2.2. Нахождение связи оптического поглощения клеточной суспензии и концентрации колониеобразующих единиц (КОЕ) в ней.

К суспензии бактериальных клеток с начальным оптическим поглощением 0,5, добавлялся лизоцим до его концентрации в кювете 0,1 мкг/мл. Измерения проводили на двухлучевом спектрофотометре UV-1800 в кювете объемом 500 мкл и длиной оптического пути 1 см при длине волны 650 нм и температуре 37°C. В разные промежутки времени отбирали пробы из реакционной смеси для посева на чашки Петри с твердой агаризованной средой. Подсчет числа колониеобразующих единиц (КОЕ) проводили через 30-35 ч инкубации при 37°C.

3.2.3. Исследование адсорбции лизоцима на клетках *E. coli*

Адсорбцию лизоцима на бактериальных клетках определяли по методике, аналогичной той, что описана в литературе [27,28]. Схема эксперимента представлена на рис. 11.



Рисунок 11. Методика определения адсорбции лизоцима на поверхности живых бактериальных клеток

Начальная концентрация бактерий *E. coli* KS-507 в суспензии составляла $3,2 \cdot 10^8$ КОЕ/мл ($A_{650} = 0,46$). К суспензии добавляли лизоцим до конечной концентрации 5–100 мкг/мл и эффекторы (хлорид кальция и/или аминокислоты) до соответствующих значений концентрации. Поскольку предварительно было показано, что адсорбция лизоцима на обломках клетках не отличается от его адсорбции на интактных клетках, а время достижения сорбционного равновесия составляет 4–5 минут при температуре 37°C [27,28], суспензию инкубировали в течение 7 минут. Инкубацию проводили в суховоздушном

термостате TCO-1/80 СПУ модель 1005 при 37°C на качалке-мультиротаторе Multi Bio RS-24 со скоростью вращения-переворачивания пробирок 15 об/мин. После термостатирования образцы центрифугировали на центрифуге Minispin в течение 7 минут при 6000 об/мин (2073 g), а затем отбирали надосадочную жидкость для дальнейшего определения концентрации несвязанного с клетками лизоцима по его активности на вспомогательном субстрате *M. luteus* [26,28]. Исходя из количества изначально добавленного и оставшегося в растворе свободного лизоцима, было рассчитано количество связанного с клетками лизоцима.

3.2.4. Обработка суспензии клеток *E. coli* раствором ЭДТА

Суспензию клеток *E. coli* KS-507 выдерживали 5 минут на качалке-мультиротаторе Multi Bio RS-24 со скоростью вращения-переворачивания пробирок 15 об/мин с 0,1-5 мМ ЭДТА. Затем клетки центрифугировали на центрифуге Minispin в течение 7 минут при 6000 об/мин (2073 g). Далее полученный осадок ресуспендировали в 0,01 М Трис-MES с добавлением 25 мМ NaCl, pH 8,5 и центрифугировали 7 минут в том же скоростном режиме, после чего осадок клеток был повторно декантирован. Промывка клеточной суспензии буферным раствором в целях избавления от ЭДТА, проведенная вышеописанным способом, была повторена два раза. Полученная суспензия с концентрацией клеток $3,2 \cdot 10^8$ КОЕ/мл ($A_{650} = 0,46$) была использована для дальнейшего измерения активности фермента.

3.2.5. Микроскопическое исследование бактериальных клеток *E. coli*

Суспензия бактериальных клеток *E. coli* KS-507 с концентрацией 10^9 КОЕ/мл в буферном растворе 0,01 М Трис-MES с добавлением 25 мМ NaCl, pH 8,5, была получена согласно стандартной методике [315]. Микроскопическое исследование мазка бактериальных клеток проводилось при помощи светового монокулярного биологического микроскопа КР-РН35-1600. Для фотографирования мазков был использован зеркальный фотоаппарат Canon EOS 5D Mark IV.

3.2.6. Исследование роста бактериальных клеток *E. coli*

Ночная культура бактериальных клеток *E. coli* KS-507 в жидкой питательной среде LB (pH 7,2) была прилита в лунки 96-луночного планшета до начального оптического поглощения суспензии в лунке $A_{630} = 0,12$ и суммарного объема реакционной смеси 250 мкл. Оптическое поглощение суспензии детектировали на микропланшетном фотометре Thermo Multiskan Ascent с длиной оптического пути 0,6 см при длине волны 630 нм и температуре 37 °С в течение 8 часов в присутствии куриного, человеческого лизоцима (10 мкг/мл) и смеси аминокислот (эффекторов), а также в отсутствие фермента и эффекторов. Скорость перемешивания планшета составляла 180 об/мин. Измерения проводились в трех повторях.

3.2.7. Нахождение минимальной бактерицидной концентрации лизоцима

Суспензия клеток с концентрацией $\sim 10^5$ КОЕ/мл была получена последовательным разбавлением ночной культуры бактериальных клеток *E. coli* KS-507 ($\sim 10^9$ КОЕ/мл) в жидкой питательной среде LB (pH 7,2). 200 мкл приготовленной суспензии клеток добавили к равному объему водного раствора лизоцима разных концентраций и смеси аминокислот (эффекторов). Пробирки с полученными суспензиями инкубировали в течение 3 часов в суховоздушном термостате ТСО-1/80 СПУ модель 1005 при 37°С на качалке-мультиротаторе Multi Bio RS-24 со скоростью вращения-переворачивания пробирок 15 об/мин. По истечении времени термостатирования смеси разбавляли стерилизованной деионизированной водой в соотношении 1:1000 и по 200 мкл разбавленного раствора наносили на чашки Петри с твердой агаризированной LB питательной средой (pH 7,2) и культивировали при 37°С в течение 24 часов для наблюдения роста колоний. Для визуального подсчета КОЕ образец без лизоцима, после трехчасовой инкубации наносимый на чашку Петри, был предварительно разбавлен еще в 100 раз. В качестве контроля раствор образца был заменен на 200 мкл 0,05 М фосфатного буфера с pH 7,2. Наименьшая концентрация лизоцима в чашке, на которой не наблюдался рост бактерий, была определена как минимальная бактерицидная концентрация. Высев каждого образца был осуществлен в трех повторях.

3.2.8. Измерение спектров флуоресценции

Спектр испускания флуоресценции лизоцима и аминокислот измеряли в кювете объемом 700 мкл на спектрофлуориметре Cary Eclipse Varian в диапазоне длин волн от 290 до 450 нм при температуре 37°C в буферном растворе 0,01 М Трис-MES с добавлением 25 mM NaCl, pH 8,5. Концентрация лизоцима в кювете составила 100 мкг/мл. Концентрация глицина 1,5 mM, заряженных аминокислот 5 mM. Длина волны возбуждения 280 нм.

3.2.9. Молекулярный докинг

Выравнивание и поиск потенциальных участков связывания свободных аминокислот (молекулярный докинг) мы проводили с помощью общедоступных веб-сервисов и открытого программного обеспечения: Jalview (выравнивание аминокислотных последовательностей, локально установленное свободное программное обеспечение, <https://www.jalview.org>) [318]; SwissDock (докинг лигандов, публичный веб-сервис, <https://swissdock.ch>) [319]; USCF-Chimera (подготовка белков и лигандов для докинга, обработка и визуальное представление результатов докинга, локально установленное свободное программное обеспечение, <https://www.cgl.ucsf.edu>) [320]; vsFilt (пост-докинг и структурная фильтрация уже докированных позиций, публичный веб-сервис, <https://biokinet.belozersky.msu.ru/vsfilt>) [321]; AutoDock Vina (докинг лигандов, локально установленное свободное программное обеспечение, <https://vina.scripps.edu>) [322]; Zinc database (общедоступная база данных файлов химических соединений в 3D форматах, <http://zinc.docking.org>) [323,324]; Open Babel (конвертация форматов файлов pdb, mol2, sdf и др., локально установленное свободное программное обеспечение, <http://openbabel.org>) [325].

В работе были использованы PDB-файлы для структур куриного (1DPX) и человеческого (1REX) лизоцимов. Молекулярный докинг проводился по всей поверхности белка в публичном веб-сервисе SwissDock, основанном на стыковочном программном обеспечении EADock DSS [326]. Энергии взаимодействия лиганда и белка были рассчитаны в силовом поле CHARMM [327] с использованием модели неявной сольватации FACTS [328]. Молекулярные модели лизоцима и лигандов (аминокислот) были протонированы/депротонированы в USCF-Chimera соответствующе значению pH 8,5. Торсионные углы в PDB файле молекулы белка не изменялись.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Влияние концентрации фермента, концентрации соли и рН на скорость лизиса клеток *E. coli* лизоцимом

В разделе 2.10., посвященном описанию сути и тонкостей турбидиметрического метода анализа, было особо подчеркнута необходимость подбора правильных условий для проведения эксперимента с живыми клетками, чтобы его результаты можно было верно интерпретировать. Здесь тезисно приведу четыре главных параметра, которые требуют оптимизации. Концентрация добавляемого фермента должна попадать в диапазон линейности зависимости скорости лизиса клеток от его концентрации, оптическое поглощение суспензии не должно превышать 0,8 опт. ед, а рН и ионная сила используемого буфера должны быть такими, чтобы клетки в нем оставались стабильны, и при этом их ферментативный лизис был измеримой величиной. В первую очередь мы поставили перед собой задачу подобрать оптимальные условия для работы с нашим видом клеток. Основным объектом нашего исследования являлся штамм *E. coli* линии К-12 (KS-507), который для краткости далее именуется просто *E. coli*.

Прежде чем продолжать, следует сделать ремарку, что в дальнейшем изложении мы будем использовать такие выражения как «увеличение скорости лизиса клеток лизоцимом» и «увеличение бактериолитической активности лизоцима» как взаимозаменяемые, т.е. синонимичные, не проводя смысловых различий между ними. При этом мы допускаем, что влияние эффекторов на скорость лизиса клеток складывается из влияния на фермент (т.е. на его каталитическую активность) и влияния эффектора на саму живую бактериальную клетку.

Бактериолитический фермент лизоцим гидролизует муреин клеточной стенки бактерий, что приводит к разрушению клеток и осветлению бактериальной суспензии (т.е. падению ее оптического поглощения). Процесс бактериального лизиса под действием лизоцима наглядно показан на рис. 12.

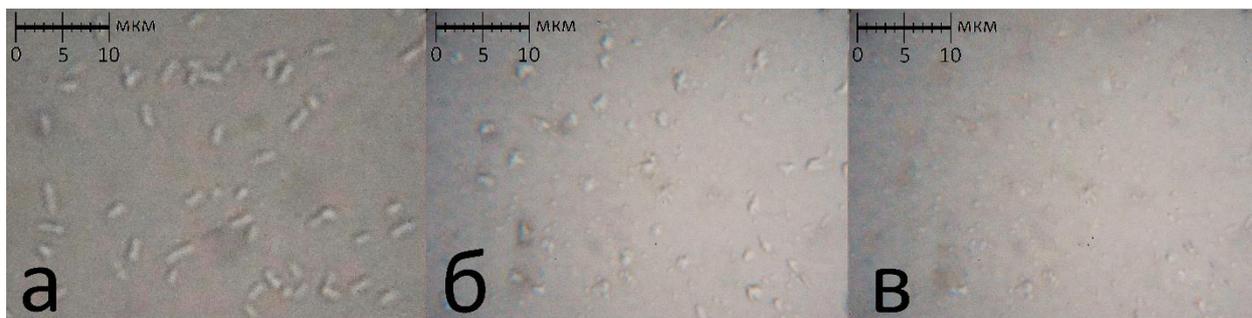


Рисунок 12. Микроскопические фотографии бактериальных клеток *E. coli*. а) – живые бактерии до добавления лизоцима, б) – в присутствии 1 мкг/мл лизоцима по истечении 5 минут, в) – в присутствии 1 мкг/мл лизоцима по истечении 30 минут. Буферная смесь 0,01 М Трис-MES с добавлением 25 мМ NaCl, pH 8,5. Начальная концентрация клеток в суспензии 10^9 КОЕ/мл.

Как видим, в присутствии лизоцима бактериальные клетки со временем полностью лизируются. При этом, падение оптического поглощения бактериальной суспензии может служить показателем скорости литического процесса. Так, ранее было показано, что суспензия клеток *E. coli* с оптическим поглощением 0,45 опт. ед. имеет концентрацию $3 \cdot 10^8$ КОЕ/мл [311]. На рис. 13 продемонстрирована взаимосвязь между оптическим поглощением клеточной суспензии и числом жизнеспособных клеток (КОЕ) в процессе их лизиса лизоцимом.

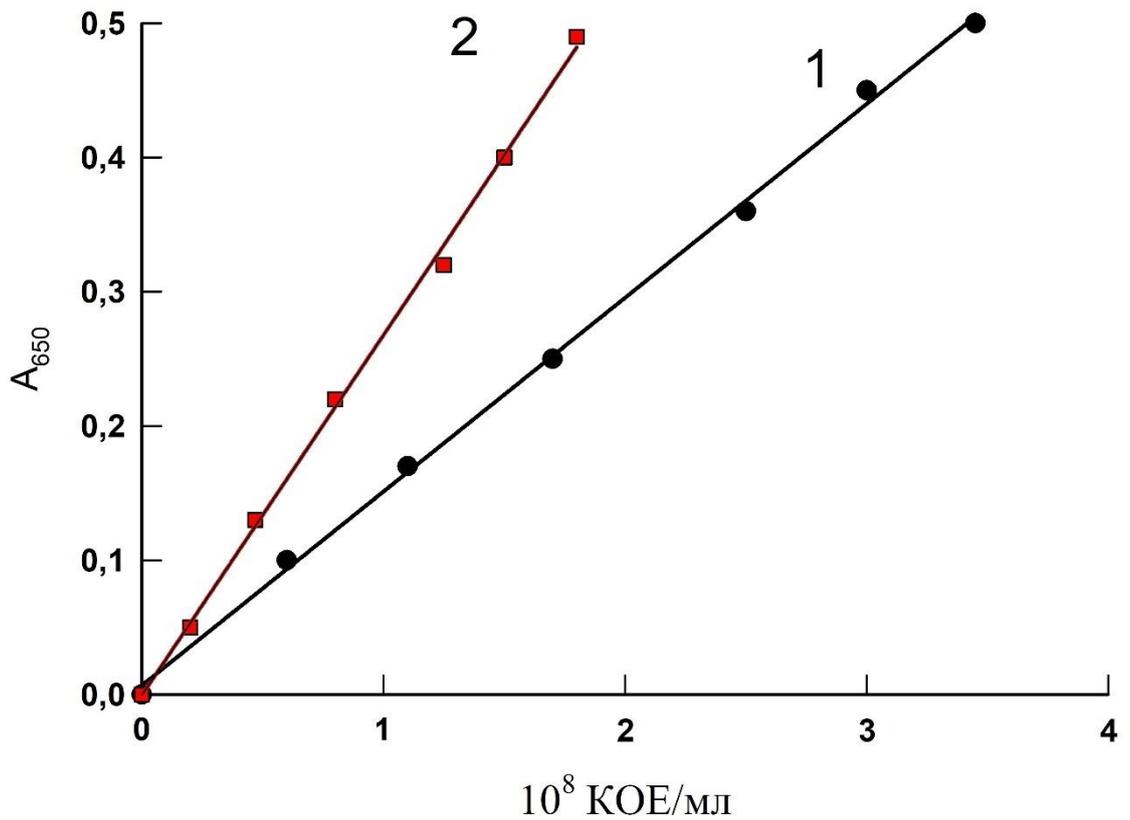


Рисунок 13. Связь оптического поглощения суспензии клеток: 1 – *E. coli* KS-507, 2 – *P. megaterium* ATCC 14581 (В-9869) и концентрации колониеобразующих единиц (КОЕ/мл) в ходе лизиса клеток лизоцимом.

Из рис. 13 видим, соотношение между оптическим поглощением клеточной суспензии и числом жизнеспособных клеток в ней может различаться для разных видов клеток (из-за различия в их формах и размерах). В ходе ферментативного лизиса оптическое поглощение клеточной суспензии в исследуемом диапазоне линейно уменьшается. Вычисленные угловые коэффициенты полученных прямых позволяют осуществлять перевод единиц оптического поглощения в КОЕ/мл для конкретного вида бактерий. Ввиду этого, начальные скорости лизиса клеток, выраженные в ед. опт. погл. \cdot время $^{-1}$ при необходимости мы можем записывать в КОЕ \cdot мл $^{-1}$ \cdot время $^{-1}$. Для *E. coli* коэффициент перевода ед. опт. погл. в КОЕ/мл составляет $6,80 \cdot 10^8$ КОЕ \cdot мл $^{-1}$ \cdot ед. опт. погл $^{-1}$ а для *P. megaterium* $3,73 \cdot 10^8$ КОЕ \cdot мл $^{-1}$ \cdot ед. опт. погл $^{-1}$.

В наших экспериментах по измерению скорости лизиса клеток лизоцимом мы использовали суспензию с оптическим поглощением 0,45 опт. ед. (стандартное оптическое поглощение суспензии для определения бактериолитической активности лизоцима). Однако скорость лизиса даже различных штаммов одного и того же вида бактерий может

существенно различаться, поэтому нам необходимо было подобрать концентрацию фермента для нашего конкретного случая. Кроме того, до настоящего момента в литературе не имелось каких-либо данных по скорости лизиса бактерий *E. coli* человеческим лизоцимом.

На рис. 14 приведена зависимость скорости лизиса клеток *E. coli* от концентрации человеческого (1) и куриного (2) лизоцимов.

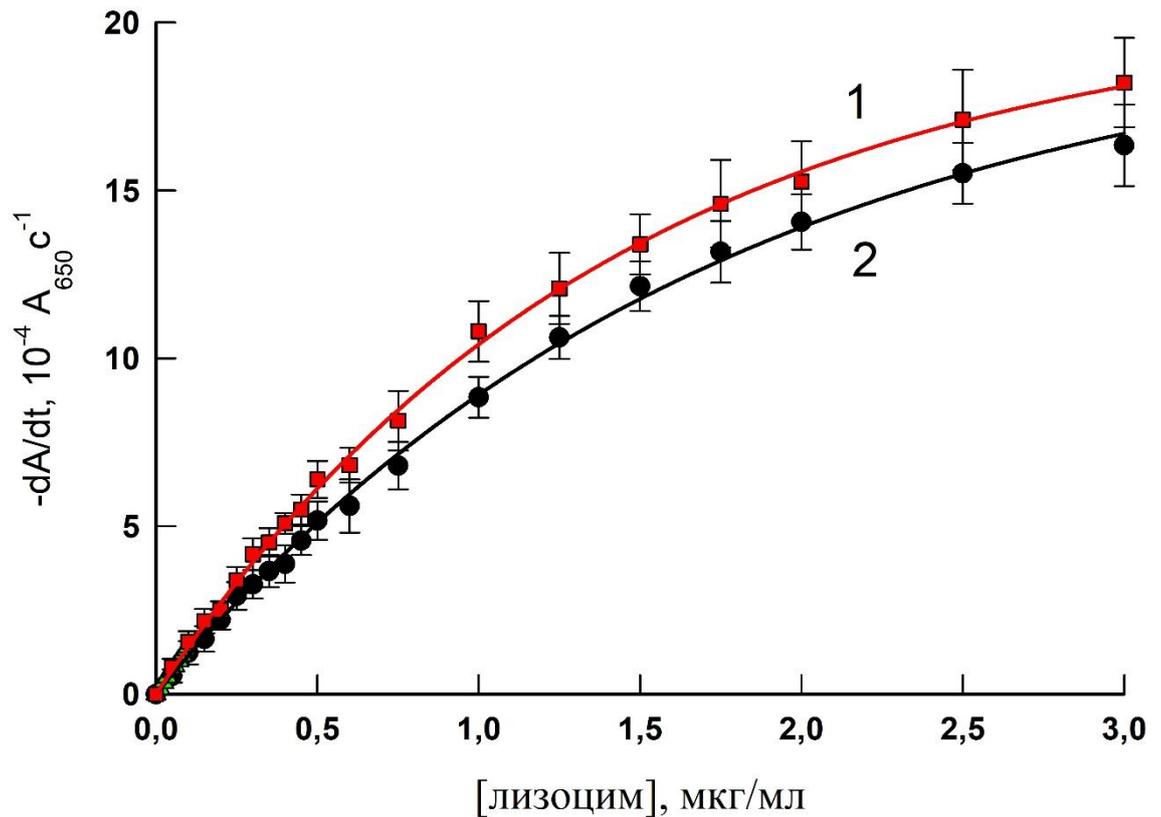


Рисунок 14. Зависимость начальной скорости лизиса клеток *E. coli* от концентрации лизоцима. 1 – человеческий лизоцим, 2 – куриный лизоцим. Буферная смесь 0,01 М Трис-MES с добавлением 25 мМ NaCl, pH 8,5.

Используемый нами препарат человеческого лизоцима имел несколько более высокую активность по отношению к штамму *E. coli*, нежели куриный. Видно, что линейность зависимости начальной скорости лизиса сохраняется лишь на небольшом промежутке малых концентраций фермента (до 0,5 мкг/мл включительно), а при более высоких концентрациях фермента линейность нарушается. Линейность зависимости при малых значениях фермента свидетельствует о том, что в данном диапазоне концентраций лизоцима осмотический разрыв бактериальных клеток протекает быстрее самой

ферментативной реакции. В области отклонения от линейности, зависимость скорости лизиса от концентрации добавляемого фермента становится все менее выраженной. Возможно, это связано с ростом доли молекул лизоцима, которые не осуществляют катализ, а агрегируют, формируя, гексамерные и другие олигомерные комплексы [329,330].

В настоящей работе предполагается, что низкомолекулярные вещества в первую очередь оказывают свое влияние на первую, каталитическую стадию лизиса, поэтому мы должны работать в том диапазоне концентраций фермента, при котором наблюдается строгая линейность скорости лизиса клеток от концентрации лизоцима. Вне всякого сомнения, концентрация 0,1 мкг/мл для обоих типов лизоцима входит в этот диапазон, и при этом, что немаловажно, дает измеримую скорость лизиса клеток. Таким образом, мы выбрали концентрацию лизоцимов 0,1 мкг/мл и использовали ее в течение всего дальнейшего исследования. Усиление антибактериальных свойств лизоцима в присутствии эффекторов в более высоких концентрациях фермента продемонстрировано в разделе 4.6.

Далее мы должны были подобрать состав буферного раствора, а именно его оптимальную соленость и кислотность. Согласно литературным данным, зависимость бактериолитической активности от pH и ионной силы для куриного лизоцима на клетках *E. coli* имеет характерный вид с оптимумом при pH 8,3-8,8 и концентрации NaCl 30-40 мМ [26]. Мы провели аналогичные измерения для человеческого лизоцима в сравнении с куриным лизоцимом. Результаты, полученные для этих двух ферментов, приведены на рис. 15.

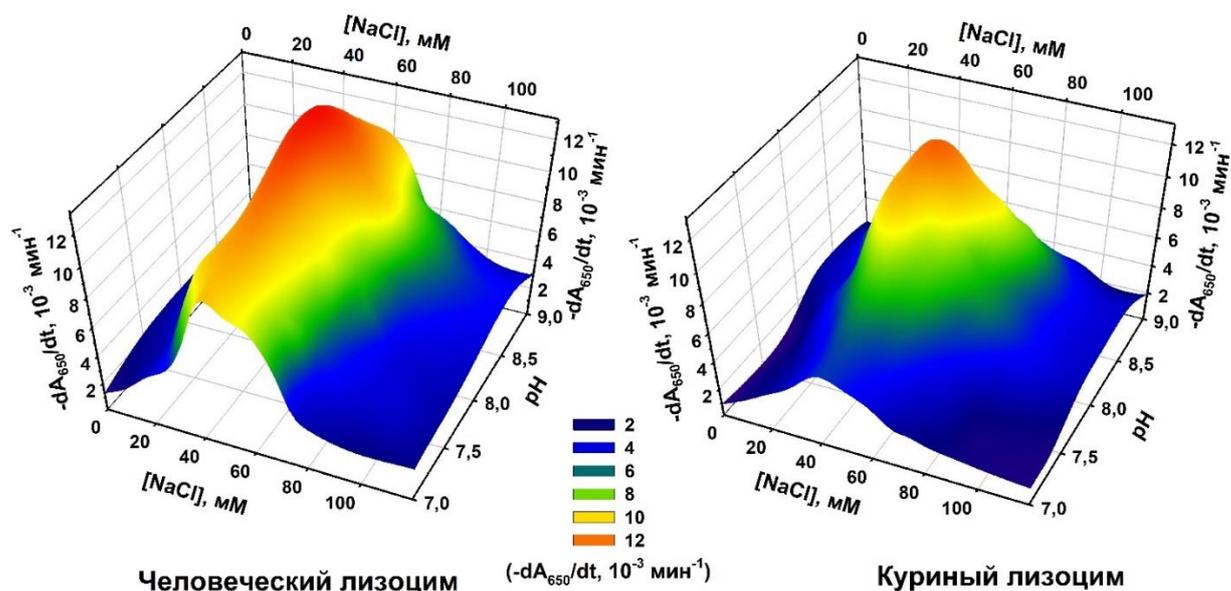


Рисунок 15. Зависимости скорости лизиса клеток *E. coli* в присутствии человеческого и куриного лизоцимов от pH и концентрации NaCl. Буферная смесь 0,01 М Трис-НСl.

Как видим, человеческий лизоцим демонстрирует схожую с куриным лизоцимом зависимость от pH и концентрации NaCl. pH-оптимум активности для обоих лизоцимов составляет 8,5. Нахождение оптимума активности в щелочной области, а не в слабокислой, как, согласно литературе, наблюдается при действии лизоцима на искусственный субстрат [331], по всей видимости, связано с отрицательным поверхностным зарядом бактерий и, как следствие, сдвигом локального pH на поверхности бактерий в более щелочную область. Так, на поверхности клеток *E. coli* носителями отрицательного заряда являются преимущественно липополисахариды или эндотоксины [332]. Оптимальная концентрация NaCl при наибольшей скорости лизиса клеток для обоих ферментов составляет 30-40 мМ. При снижении ионной силы активность уменьшается вследствие непродуктивной сорбции лизоцима на клетках бактерий [27]. При повышении ионной силы активность уменьшается вследствие замедления стадии осмотического разрыва клеток после ферментативного повреждения полимера клеточной стенки [26]. Из отличительных особенностей для человеческого лизоцима следует отметить менее выраженную зависимость активности от pH.

Отметим, что для того чтобы убедиться, что используемые нами эффекторы (заряженные аминокислоты, ионы кальция) увеличивают скорость лизиса клеток не по

причине отклонения от оптимального значения ионной силы буферного раствора в сторону большей осмимольности (поскольку они сами являются электролитами), а за счет специфического действия на комплекс фермента с субстратом (клеткой), мы на первых этапах исследования намеренно отказались от использования буферного раствора с оптимальным значением ионной силы (30-40 мМ). Таким образом, мы решили выбрать буфер с суммарной ионной силой заведомо выше оптимальной (70 мМ), чтобы ожидаемые нами эффекты увеличения скорости лизиса клеток лизоцимом однозначно говорили о специфическом эффекте активирующих добавок, противоположном влиянию ионной силы.

Перед нами встала задача выбора буфера такого состава, чтобы он, во-первых, не подвергал деструкции живые клетки, во-вторых, обеспечивал широкую буферную емкость и подходил для проведения экспериментов в разных рН среды, и, в-третьих, имел в своем составе компоненты, которые сами по себе не изменяют скорость лизиса клеток (не являются эффекторами). Нашим требованиям удовлетворила буферная смесь 0,01М Трис-MES- Na₂CO₃ с добавлением 25 мМ NaCl. Данные из табл. 1 демонстрируют, что, действительно, все компоненты данного буферного раствора не оказывают влияние на скорость ферментативного лизиса разведенных в нем суспензии клеток.

Таблица 1. Сравнение скоростей лизиса клеток E. coli куриным лизоцимом в буферных растворах разных составов с одинаковой кислотностью и ионной силой.

Состав буферного раствора	рН	Скорость лизиса клеток, -dA/dt, 10 ⁻³ мин ⁻¹
0,01 М Трис-MES-Na ₂ CO ₃ с добавлением 25 мМ NaCl	7	3,0±0,4
0,01 М MES-Na ₂ CO ₃ с добавлением 35 мМ NaCl (без триса)	7	2,8±0,4
0,01 М Трис-MES-Na ₂ CO ₃ , с добавлением 25 мМ NaCl	8,5	7,6±0,6
0,01 М Трис-Na ₂ CO ₃ , с добавлением 35 мМ NaCl (без MES)	8,5	7,3±0,6
0,01 М Трис-MES с добавлением 55 мМ NaCl (без Na ₂ CO ₃)	8,5	8,0±0,6

Итак, в дальнейших экспериментах, проводимых в разных рН в присутствии заряженных аминокислот и глицина мы выбрали буферный раствор 0,01М Трис-MES-Na₂CO₃ с добавлением 25 мМ NaCl.

4.2. Раздельное влияние заряженных аминокислот и глицина на скорость лизиса клеток *E. coli* лизоцимом

Ранее нами было показано, что заряженные аминокислоты в концентрациях как минимум до 15 мМ увеличивают скорость лизиса клеток *E. coli* JM-109 куриным лизоцимом [18,21]. Наибольшая скорость лизиса клеток лизоцимом в присутствии глицина достигалась при концентрации аминокислоты 1,5 мМ. Мы исследовали влияние аминокислот на лизис клеток *E. coli* KS-507 в рН оптимуме активности фермента.

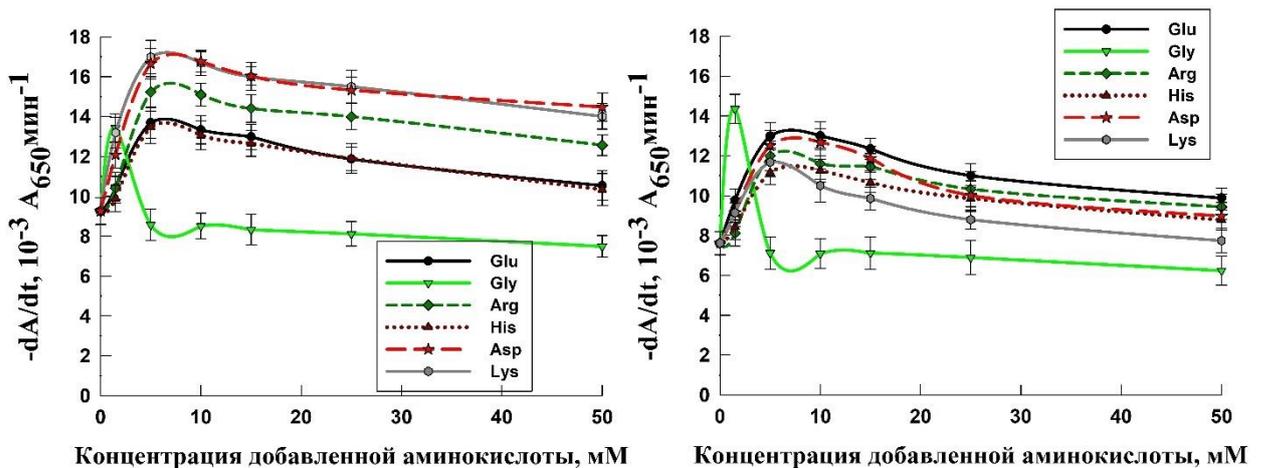


Рисунок 16. Зависимости скорости лизиса клеток *E. coli* человеческим и куриным лизоцимами от концентрации соответствующей свободной аминокислоты (согласно обозначениям на рисунке). Буферная смесь 0,01М Трис-MES- Na_2CO_3 с добавлением 25 мМ NaCl , рН 8,5.

Видим, что наибольшая скорость лизиса клеток лизоцимом достигается в присутствии 5-7 мМ заряженной аминокислоты, а далее уменьшается, по-видимому, в связи с увеличением ионной силы раствора. Для глицина наблюдается куполообразная зависимость скорости лизиса клеток в области от 0 до 5 мМ концентрации аминокислоты. Таким образом, мы посчитали целесообразным детальнее изучить наблюдаемые эффекты ускорения лизиса клеток лизоцимом в диапазоне концентраций аминокислот до 5 мМ включительно.

Для того чтобы выяснить как меняется влияние на скорость лизиса клеток *E. coli*, оказываемое заряженными аминокислотами и глицином в зависимости от условий среды, мы провели измерения в буферных растворах с разными значениями рН. На рис. 17 показаны трехмерные зависимости активности человеческого и куриного лизоцимов от

концентрации эффектора (аминокислоты) и pH. И хотя индивидуальное влияние глицина и заряженных аминокислот на лизис клеток куриного лизоцима было ранее изучено нами на другом штамме *E. coli* (JM 109), тем не менее результаты прошлого исследования хорошо коррелируют с настоящим [18,21].

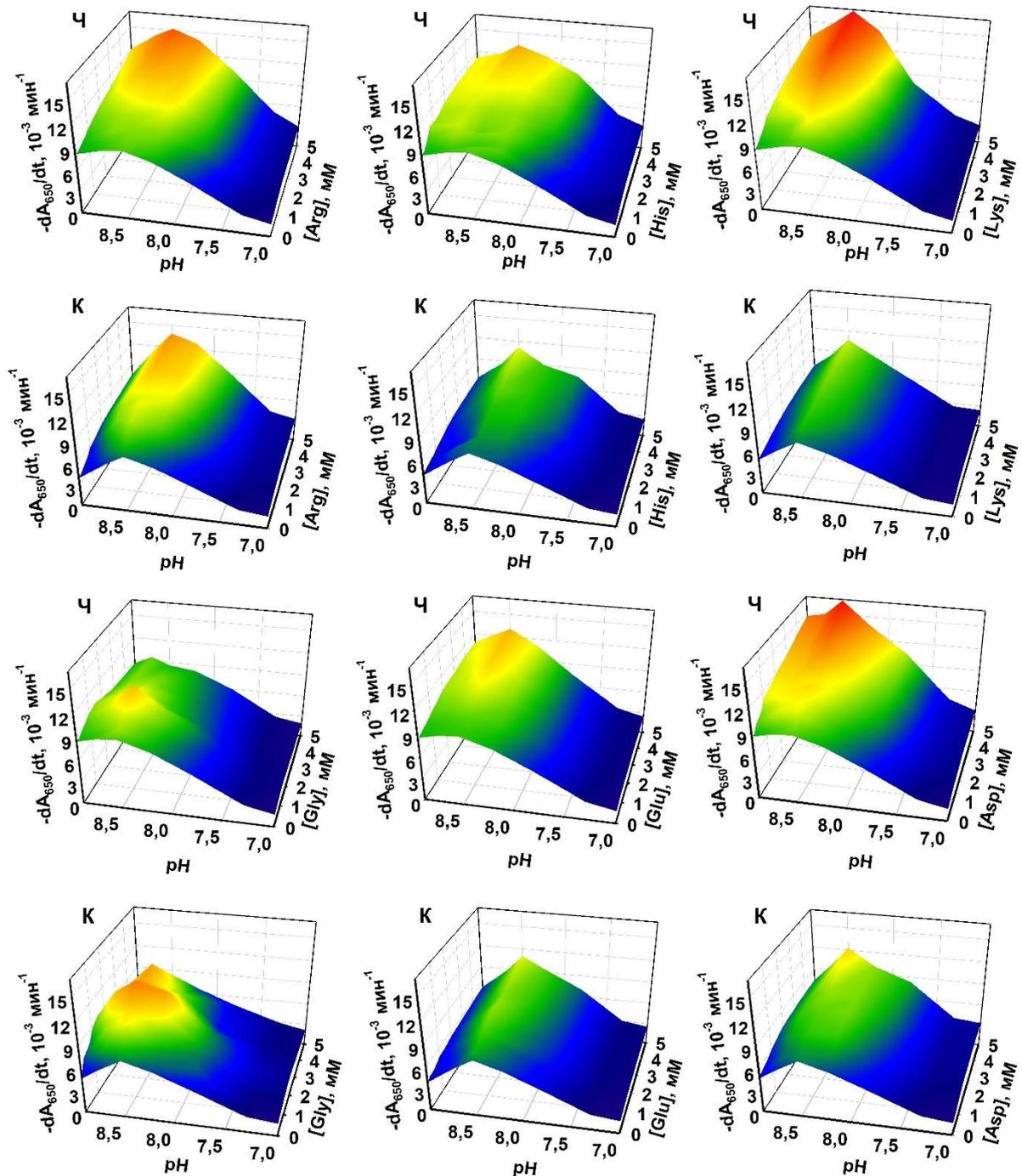


Рисунок 17. Зависимости скорости лизиса клеток *E. coli* человеческим и куриным лизоцимами от концентрации добавленных эффекторов. Буферная смесь 0,01 М Трис-MES-Na₂CO₃ с добавлением 25 мМ NaCl. Ч – человеческий лизоцим. К – куриный лизоцим.

В целом можно сказать, что характер ускорения лизиса клеток человеческим и куриным лизоцимами в присутствии разных эффекторов схожий. Положение оптимума pH сохраняется при добавлении всех аминокислот, что, вероятно, указывает на то, что значение pK_a ионогенных групп в активном центре фермента остаются неизменными. В большинстве случаев характер увеличения скорости лизиса клеток лизоцимом в присутствии аминокислоты при варьировании pH не изменяется кардинальным образом. Таким образом, значение pH 8,5 является оптимальным для дальнейших исследований.

Для большей наглядности на рис. 18 приведен детализированный «срез» трехмерного графика при фиксированном оптимальном значении pH.

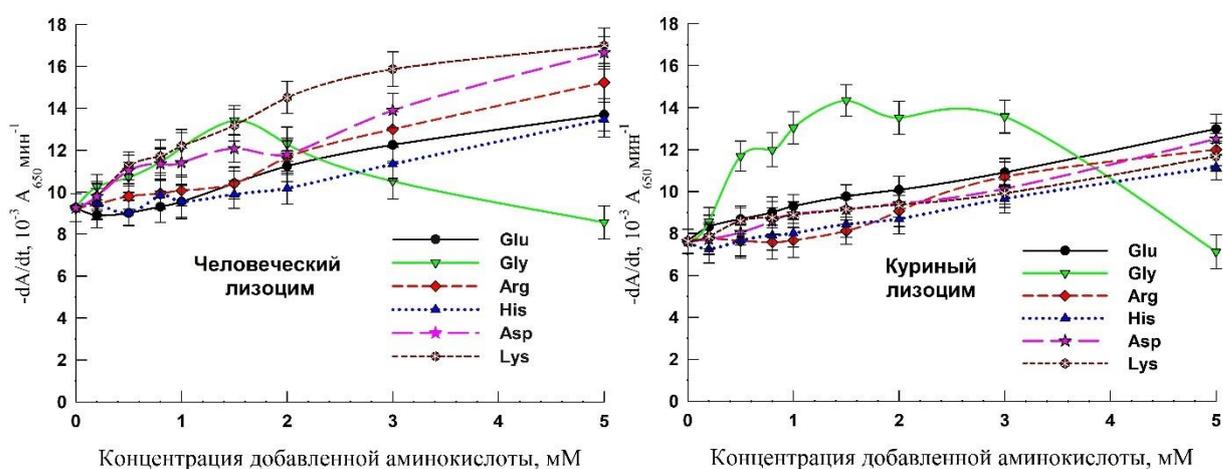


Рисунок 18. Зависимости скорости лизиса клеток *E. coli* человеческим и куриным лизоцимами от концентрации соответствующей свободной аминокислоты (согласно обозначениям на рисунке). Буферная смесь 0,01M Трис-MES- Na_2CO_3 с добавлением 25 мМ NaCl, pH 8,5.

Из рис. 17 и 18 видим, что для всех эффекторов, кроме глицина, скорость лизиса клеток лизоцимом монотонно увеличивается при возрастании концентрации аминокислоты до 5 мМ. Для глицина наблюдается более сложная куполообразная зависимость с оптимумом при концентрации эффектора 1,5 мМ. Кроме того, следует отметить, что влияние глицина на активность человеческого лизоцима менее выражено в сравнении с влиянием на активность куриного лизоцима. Существование определенной концентрации глицина, при которой наблюдается максимум бактериолитической активности фермента, возможно, связано с тем, что глицин является простейшей аминокислотой и имеет малый размер, ввиду чего теоретически он может связываться со многими участками полипептидной цепи фермента, а значит, способен образовывать сразу несколько комплексов лиганд-фермент-субстрат. Возможно, при концентрации 1,5 мМ свободного

глицина, образуется преимущественно комплекс с наибольшей бактериолитической активностью. При этом активирующее действие, оказываемое на лизис клеток в присутствии глицина, может объясняться совокупно как образованием различных комплексов аминокислот с белком, имеющих, вероятно более активную конформацию нежели интактный фермент, так и собственным антибактериальным действием глицина. Известно, что глицин ингибирует процесс синтеза муреина. Его молекулы способны встраиваться в пептидный мостик между цепями муреина, что приводит к структурным изменениям в строении клеточной стенки бактерии и ее гибели [229].

Здесь стоит также обратить внимание на некоторые различия между величиной эффектов, оказываемых на ферментативный лизис разными типами лизоцима. У куриного лизоцима эффект ускорения ферментативного лизиса клеток глицином сильнее выражен, нежели у человеческого, однако у последнего скорость лизиса клеток в присутствии лизина, аспартата и аргинина, выше, чем у куриного. Вероятно, тот факт, что одинаковые аминокислоты сходным образом влияют на активность обоих типов лизоцима, говорит в пользу существования единого механизма увеличения скорости ферментативного лизиса клеток. Отметим, что кратность увеличения скорости лизиса клеток в присутствии различных аминокислот составляет 1,5–1,9 раз.

4.3. Совместное влияние заряженных аминокислот и глицина на скорость лизиса клеток *E. coli* лизоцимом

Мы предположили, что если заряженные аминокислоты и глицин ускоряют лизис клеток в отдельности друг от друга, то их совместное действие может оказаться еще более эффективным. На рис. 19 представлено сочетанное влияние на скорость лизиса клеток человеческим и куриным лизоцимами в присутствии двух аминокислот в различных комбинациях. Для оценки общей картины взаимного влияния добавок мы выбрали суммарно незаряженный глицин, отрицательно заряженный глутамат, положительно

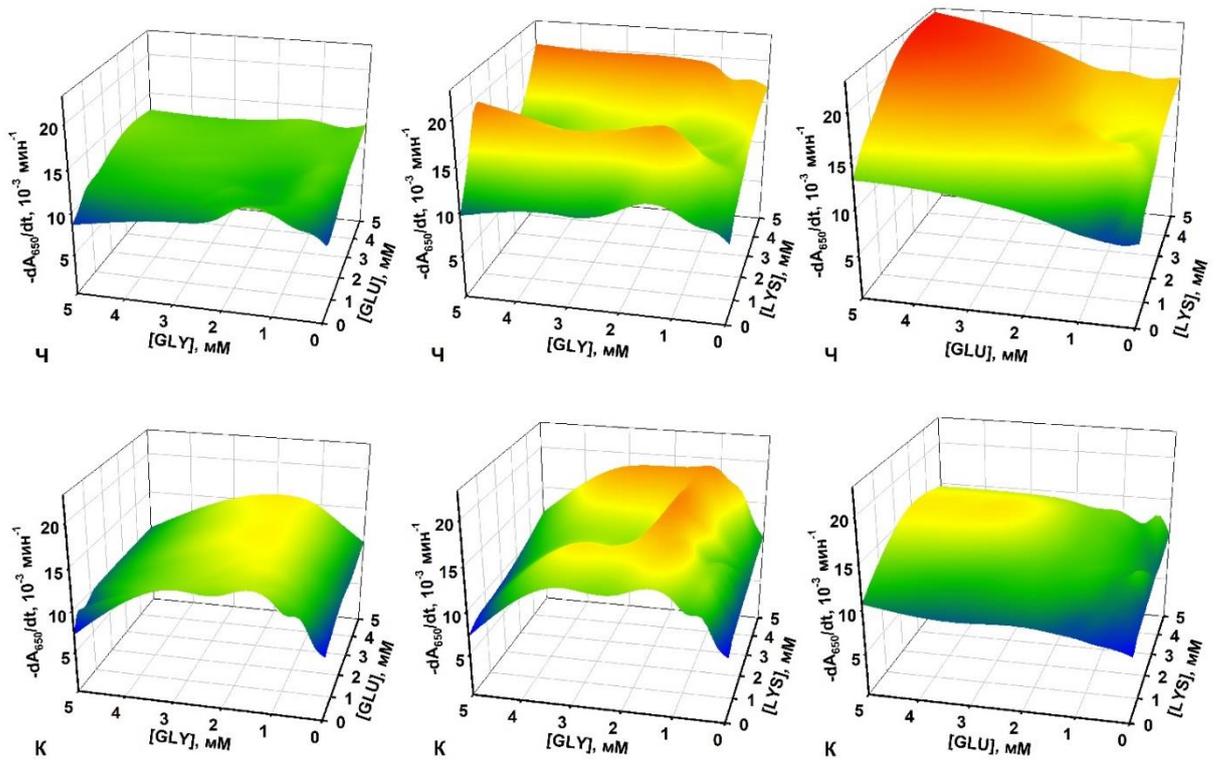


Рисунок 19. Зависимости скорости лизиса клеток *E. coli* человеческим и куриным лизоцимами от концентрации эффекторов при одновременном добавлении двух аминокислот. Буферная смесь 0,01 М Трис-MES- Na_2CO_3 с добавлением 25 мМ NaCl. Ч – человеческий лизоцим. К – куриный лизоцим.

Видим, что для обоих лизоцимов в случае лизина и глутамата сохраняется тенденция к повышению скорости лизиса клеток при увеличении концентрации этих добавок до 5 мМ в присутствии второй добавки. Для обоих лизоцимов выбор оптимальной концентрации 1,5 мМ для глицина остаётся справедливым при варьировании остальных добавок-эффекторов, хотя в случае совместного влияния лизина и глицина в целом имеет место более сложная картина сочетанного влияния. Наше предположение подтвердилось. Действительно, совместные активационные эффекты аминокислот в определенных сочетаниях оказались выше, чем в случае раздельного действия. Для дальнейших исследований мы, таким образом, фиксируем концентрацию глицина на уровне 1,5 мМ, а концентрации остальных аминокислот на уровне 5 мМ.

4.4. Сравнение бактериолитической активности лизоцима в присутствии одной аминокислоты, а также в сочетании двух и трех аминокислот

Интересным как с теоретической, так и с практической точки зрения является вопрос, какие сочетания аминокислот и в каких количествах, оказывают наибольшие активирующие эффекты на скорость ферментативного лизиса бактерий. На рис. 20 представлено сравнение влияния различных эффекторов на скорость лизиса клеток человеческим и куриным лизоцимами как по отдельности, так в двойных и тройных сочетаниях. На основании данных из рис. 20 условно считаем, что глутамат и аспарат влияют на скорость лизиса клеток схожим образом, поэтому для дальнейших сравнений сочетаний эффекторов оставим только глутамат, чтобы избежать перебора избыточно большого числа всевозможных комбинаций. Предпочтительное исследование влияния глутамата в сравнении с аспаратом оправдано также ввиду его популярности в составе пищевых добавок [233].

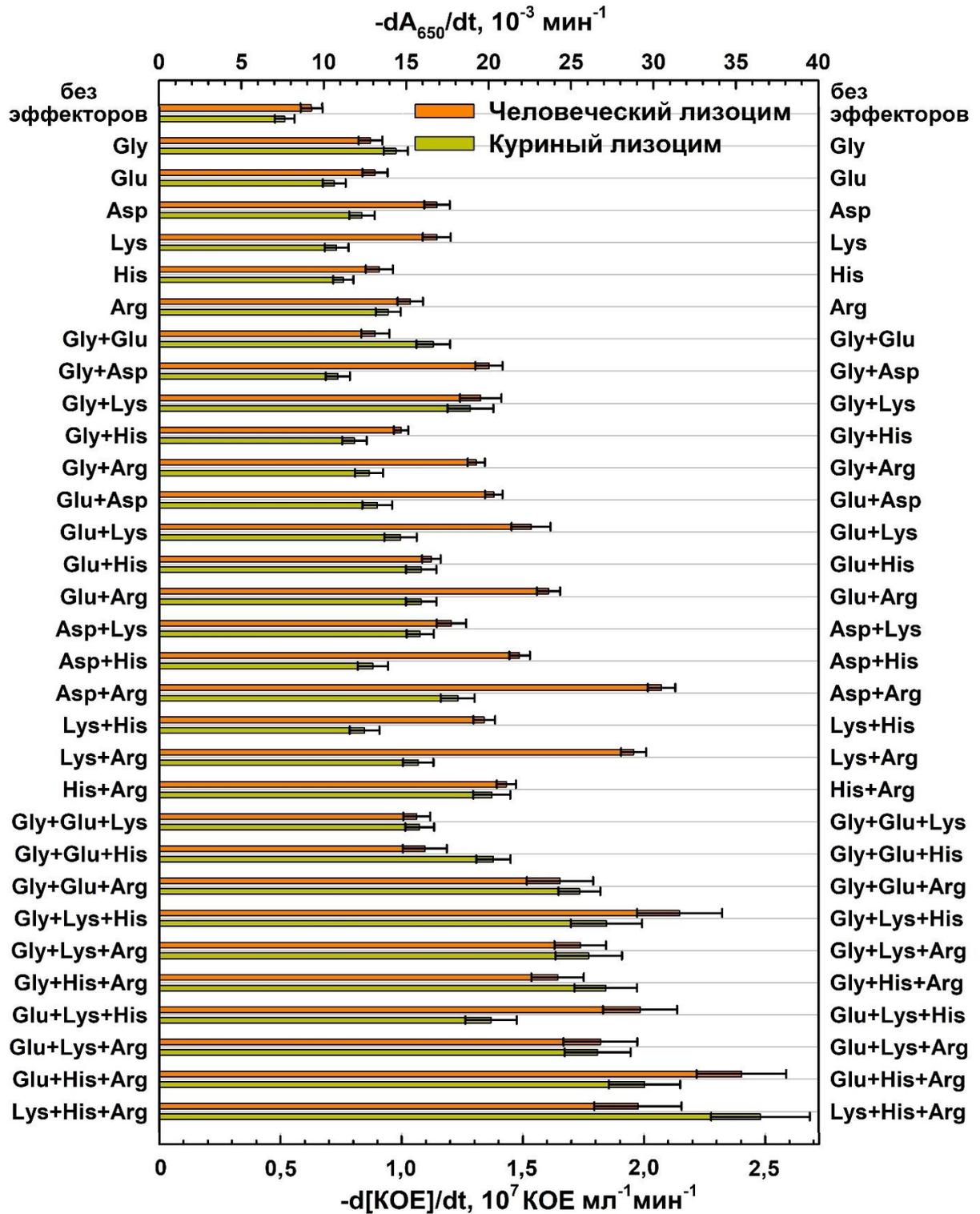


Рисунок 20. Сравнение скорости лизиса клеток *E. coli* человеческим и куриным лизоцимами в присутствии одной, двух и трех аминокислот (согласно обозначениям на рисунке). Концентрация глицина 1,5 мМ. Остальные аминокислоты добавлены в концентрациях 5 мМ. Буферная смесь 0,01 М Трис-MES- Na_2CO_3 с добавлением 25 мМ NaCl, pH 8,5.

Как мы видим, двойные сочетания эффекторов дают ещё больший эффект увеличения скорости лизиса клеток лизоцимом в сравнении с одинарными добавками. Заметим, что согласно рис. 16 (см. с. 69) в присутствии одной аминокислоты в концентрациях 10 и 15 мМ, соответственно, скорость лизиса клеток лизоцимом не превышает таковую для 5 мМ этой аминокислоты в составе двойной или тройной смеси, т.е. наблюдаемые увеличения скоростей лизиса клеток лизоцимом в присутствии смесей аминокислот в сравнении со скоростями лизиса клеток лизоцимом в присутствии только одной аминокислоты мы можем связывать с совместным действием эффекторов. Особо отметим двойные сочетания глутамат + аспартат, глутамат + аргинин, аспартат + аргинин и лизин + гистидин, которые дают наибольший эффект усиления активности для человеческого лизоцима. Также стоит отметить двойные сочетания глицин + лизин и гистидин + аргинин, которые дают хороший эффект увеличения скорости лизиса клеток как для человеческого лизоцима, так и для куриного лизоцима. В присутствии тройных сочетаний аминокислот скорость лизиса клеток лизоцимом еще выше. Для человеческого лизоцима лучший результат демонстрирует сочетание глутамат + гистидин + аргинин, а для куриного лизоцима наилучший результат даёт сочетание лизин + гистидин + аргинин.

Напомним, что увеличение антибактериальной активности фермента в присутствии смеси аминокислот также было показано для миелопероксидазы [29]. В работе по большей части исследуются антибактериальные свойства миелопероксидазной системы по отношению к клеткам *Staphylococcus aureus*, тем не менее, некоторые примеры могут проиллюстрировать схожесть явлений, наблюдаемых у нас и авторов, исследующих миелопероксидазу. Так, количество выживших клеток в присутствии крови, миелопероксидазы, глюкозооксидазы и двойного сочетания 1,25 мМ глицина и 1,25 мМ аспарагиновой кислоты почти в 100 раз меньше, чем в отсутствие глицина. В тех же условиях, только в присутствии 1,25 мМ глицина и 1,25 мМ лизина, количество выживших клеток меньше в 25 раз, чем в отсутствие глицина. Подобные синергетические эффекты увеличения антибактериального действия миелопероксидазной системы наблюдаются в присутствии 1,25 мМ глицина и 1,25 мМ гистидина (уменьшение числа выживших клеток в 10 раз по сравнению с количеством выживших клеток в отсутствие глицина), а также в присутствии 1,25 мМ глицина и 1,25 мМ глутаминовой кислоты (уменьшение числа выживших клеток в 12 раз по сравнению с количеством выживших клеток в отсутствие глицина). То есть, сочетания аминокислот оказывают большее увеличение антибактериальной активности миелопероксидазы по сравнению с активирующим

действием только одной аминокислоты. Подобный синергизм действия смеси аминокислот наблюдается и в случае лизоцима.

Хотя мы предварительно убедились в отсутствии специфического влияния компонент нашей буферной смеси на скорость лизиса клеток, следует убедиться, что обнаруженные нами эффекты увеличения скорости лизиса клеток лизоцимом проявляются не только в выбранных нами условиях. Особый интерес представляют условия, наиболее близкие к физиологическим. Для этой цели мы измерили действия добавок в фосфатном буферном растворе с нейтральным значением кислотности. На рис. 21 приведены полученные значения скоростей лизиса клеток как для человеческого, так и для куриного лизоцима.

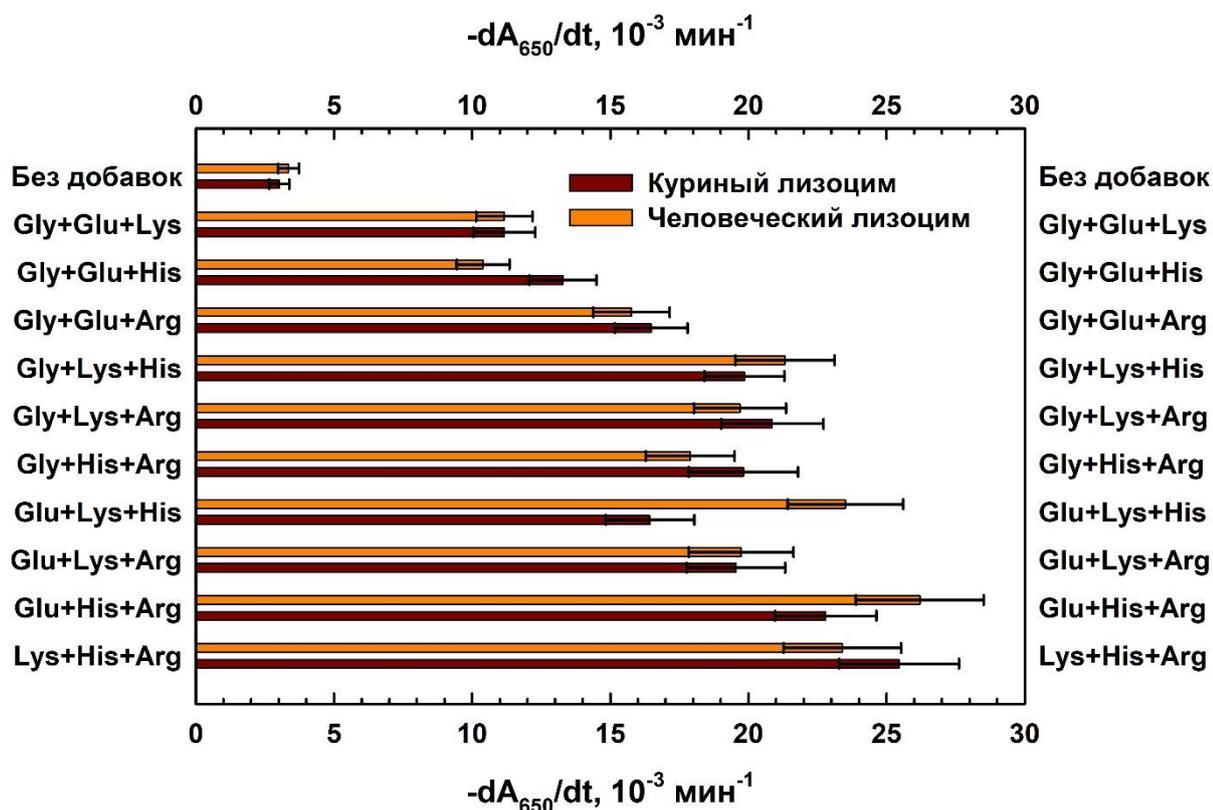


Рисунок 21. Сравнение скорости лизиса клеток *E. coli* человеческим и куриным лизоцимами в присутствии трех аминокислот (согласно обозначениям на рисунке). Концентрация глицина 1,5 мМ. Остальные аминокислоты добавлены в концентрациях 5 мМ. Буферная смесь 4 мМ Na_2HPO_4 , 5,4 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ NaCl , pH 7,0.

Различия в абсолютных значениях скоростей лизиса клеток на рис. 21 и рис. 20 вызваны существенным отклонением свойств фосфатного буфера от найденных нами оптимальных для данного вида клеток. В остальном же картина схожая. Таким образом, мы

можем сделать вывод, что заряженные аминокислоты и глицин увеличивают эффективность лизиса клеток *E. coli* в широком диапазоне условий.

4.5. Влияние ионной силы на величину эффектов тройных сочетаний аминокислот

Как ранее уже было отмечено, добавки эффекторов дают некоторое увеличение ионной силы, и система несколько смещается от «оптимального значения» ионной силы, при котором можно наблюдать максимальную бактериолитическую активность лизоцима. Для уточнения сочетанного влияния активирующих добавок и ионной силы мы провели дополнительное исследование в буфере с низкой ионной силой, варьируя концентрацию NaCl. Для данного эксперимента мы взяли сочетания эффекторов, которые оказывают наибольшее влияние на лизоцим, а именно глутамат + гистидин + аргинин и лизин + гистидин + аргинин. На рис. 22 представлены полученные результаты.

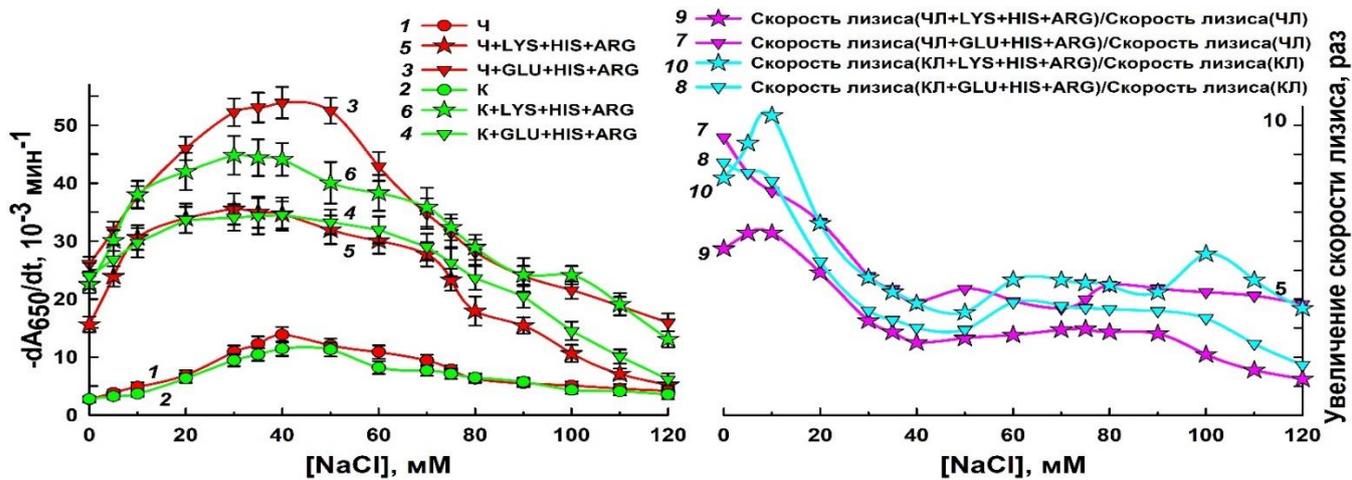


Рисунок 22. Зависимости скорости лизиса клеток *E. coli* лизоцимом от концентрации NaCl при одновременном присутствии трех свободных аминокислот. Буферная смесь 0,01 М Трис-HCl, pH 8,5. Каждый эффектор добавлен в концентрации 5 мМ. 1, 2 – скорость лизиса клеток человеческим лизоцимом (Ч) и куриным лизоцимом (К) без эффектора; 3, 4 – скорость лизиса клеток Ч и К в присутствии Glu+His+Arg; 5, 6 – скорость лизиса клеток Ч и К в присутствии Lys+His+Arg; 7, 8 – кратность увеличения скорости лизиса клеток Ч и К при добавлении Glu+His+Arg; 9, 10 – кратность увеличения скорости лизиса клеток Ч и К при добавлении Lys+His+Arg.

Как видим, активирующие добавки несколько изменяют характер зависимости от ионной силы, расширяя оптимум активности в область низких значений ионной силы, что сложно отнести только лишь на добавленную ионную силу (трёх эффекторов по 5 мМ). При этом область оптимума активности практически не сужается при повышении ионной силы, что можно было бы ожидать в случае существенного вклада добавленных эффекторов в рост ионной силы. На правой части рис. 22 приведён коэффициент усиления активности (кратность увеличения скорости лизиса) в присутствии добавок. Как видим, в области низкой ионной силы скорость лизиса клеток человеческим лизоцимом увеличивается до 9,6 раз в присутствии глутамата + гистидина + аргинина и до 10,3 раз куриным лизоцимом в присутствии лизина + гистидина + аргинина соответственно. Возможно, что добавки оказывают существенное влияние на непродуктивную сорбцию в условиях низкой ионной силы [27], высвобождая активный фермент. Для приготовления наиболее эффективного антибактериального средства на основе лизоцима с активирующими добавками фермент и аминокислоты необходимо растворить в буферном растворе с низкой ионной силой. Как мы можем видеть, при более высокой ионной силе, близкой к силе физиологического раствора (120 мМ добавленного NaCl), эффект увеличения скорости лизиса клеток в присутствии трех аминокислот несколько ниже (до 4 раз), но также значителен.

4.6. Сочетанное антибактериальное действие четырех и пяти заряженных аминокислот и лизоцима

Различие в составе тройных смесей, наиболее существенно повышающих скорость лизиса клеток куриным и человеческим лизоцимами, поставил вопрос о нахождении комбинации аминокислот, одинаково эффективной для лизиса клеток обеими разновидностями фермента. Логично было опробовать влияние смеси из четырех аминокислот, показавших наилучший результат в тройных комбинациях, и сравнить с действием смеси из пяти аминокислот. Поскольку наивысшую скорость лизиса клеток куриный лизоцим продемонстрировал в присутствии 5 мМ лизина + гистидина + аргинина, а человеческий – в присутствии 5 мМ глутамата + гистидина + аргинина, то следовало бы проверить влияние сочетания всех четырех аминокислот: лизина, глутамата, гистидина и аргинина в концентрациях 5 мМ каждой аминокислоты. Смесь из пяти аминокислот, помимо упомянутых заряженных аминокислот в концентрациях 5 мМ, содержит также 1,5 мМ глицина. Мы уже видели, что активирующие эффекты аминокислот наблюдаются в разных условиях, поэтому в настоящем эксперименте мы использовали боратно-

карбонатный буферный раствор с рН близким к оптимальному для лизоцима. Такой буфер абсолютно безвреден для человека и может применяться даже в медицинских целях, например, для полоскания рта растворенным в нем лизоцимом в комбинации с соответствующими эффекторами. В качестве буфера сравнения мы использовали физиологический раствор, который удовлетворительно моделирует процесс лизиса бактерий *in vivo*. Одновременно с тем, в качестве второго субстрата лизоцима мы выбрали стандартный и в тоже время принципиально иной микроорганизм – грамположительные бактерии *Micrococcus luteus*. В табл. 2 приведены результаты эксперимента по измерению скорости лизиса клеток человеческим и куриными лизоцимами в присутствии упомянутых эффекторов.

Таблица 2. Сравнение эффектов увеличения скорости лизиса разных клеток куриным и человеческим лизоцимами в присутствии четырех аминокислот (5 мМ Lys + 5 мМ His + 5 мМ Arg + 5 мМ Glu) и пяти аминокислот (5 мМ Lys + 5 мМ His + 5 мМ Arg + 5 мМ Glu + 1,5 мМ Gly). Состав боратно-карбонатного буфера: 25 мМ H_3BO_3 , 10 мМ $Na_2B_4O_7$, 10 мМ $NaHCO_3$, рН 8,73; состав физиологического раствора: 150 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 2,3 мМ $NaHCO_3$, рН 7,40.

Клетки	Лизоцим	Отношение скорости лизиса клеток в присутствии 4-х (слева) и 5-ти (справа) аминокислот к скорости лизиса клеток в отсутствие эффекторов в БК буфере		Отношение скорости лизиса клеток в присутствии 4-х (слева) и 5-ти (справа) аминокислот к скорости лизиса клеток в отсутствие эффекторов в физиологических условиях		Отношение скорости лизиса в БК буфере в присутствии 4-х (слева) и 5-ти (справа) аминокислот к скорости лизиса клеток в физиологических условиях в отсутствие эффекторов	
		4-х (слева)	5-ти (справа)	4-х (слева)	5-ти (справа)	4-х (слева)	5-ти (справа)
<i>E. coli</i>	куриный	2,3±0,2	2,2±0,2	2,0±0,2	2,1±0,2	6,0±0,4	6,1±0,4
<i>E. coli</i>	человеческий	2,2±0,2	2,3±0,2	2,3±0,2	2,2±0,2	5,8±0,4	5,8±0,4
<i>M. luteus</i>	куриный	1,1±0,1	1,1±0,1	1,1±0,2	1,0±0,1	2,5±0,3	2,3±0,3
<i>M. luteus</i>	человеческий	1,1±0,1	1,0±0,1	1,2±0,2	1,1±0,1	2,6±0,3	2,3±0,3

БК – боратно-карбонатный (буферный раствор).

Мы видим, что в случае *E. coli* увеличение скорости лизиса клеток в присутствии аминокислот в боратно-карбонатном буфере и в физиологическом растворе происходит в одинаковой степени как человеческим, так и куриным лизоцимами, чего мы и стремились достичь. Однако результат с бактерией *M. luteus* оказался менее впечатляющим. Выбранные нами смеси не оказали активирующего действия на бактериолитическую активность ни

одного из двух видов лизоцима по отношению к этому виду бактерий. Однако если сравнить достигнутые нами скорости лизиса клеток со скоростями лизиса, полученных в физиологическом растворе в отсутствие эффекторов, то мы можем убедиться, что выбранные нами комбинации аминокислот в боратно-карбонатном буферном растворе позволяют осуществить процесс лизиса бактерий *M. luteus* значительно эффективнее, чем в условиях высокой осмимольности в отсутствие эффекторов. Заметим также, что увеличение скорости лизиса клеток лизоцимом в присутствии пяти аминокислот практически не отличается от таковой для смеси из четырех аминокислот. Таким образом, мы можем заключить, что обе эти смеси одинаково эффективно увеличивают скорость лизиса клеток *E. coli* лизоцимом. Тем не менее, мы решили более подробно изучить антибактериальные свойства лизоцима в присутствии смеси из пяти аминокислот, поскольку, как мы говорили ранее, глицин, обладая собственным бактериостатическим действием в высоких концентрациях, демонстрирует синергизм с другими аминокислотами в низких концентрациях (на примере увеличения активности миелопероксидазы в присутствии комбинаций глицина с другими аминокислотами [29]) и, к тому же, восстанавливает чувствительность к антибиотикам у бактерий с множественной лекарственной устойчивостью [232].

Усиление антибактериальных свойств лизоцима в присутствии смеси пяти аминокислот дополнительно демонстрирует изменение динамики роста клеток *E. coli* (см. рис. 23).

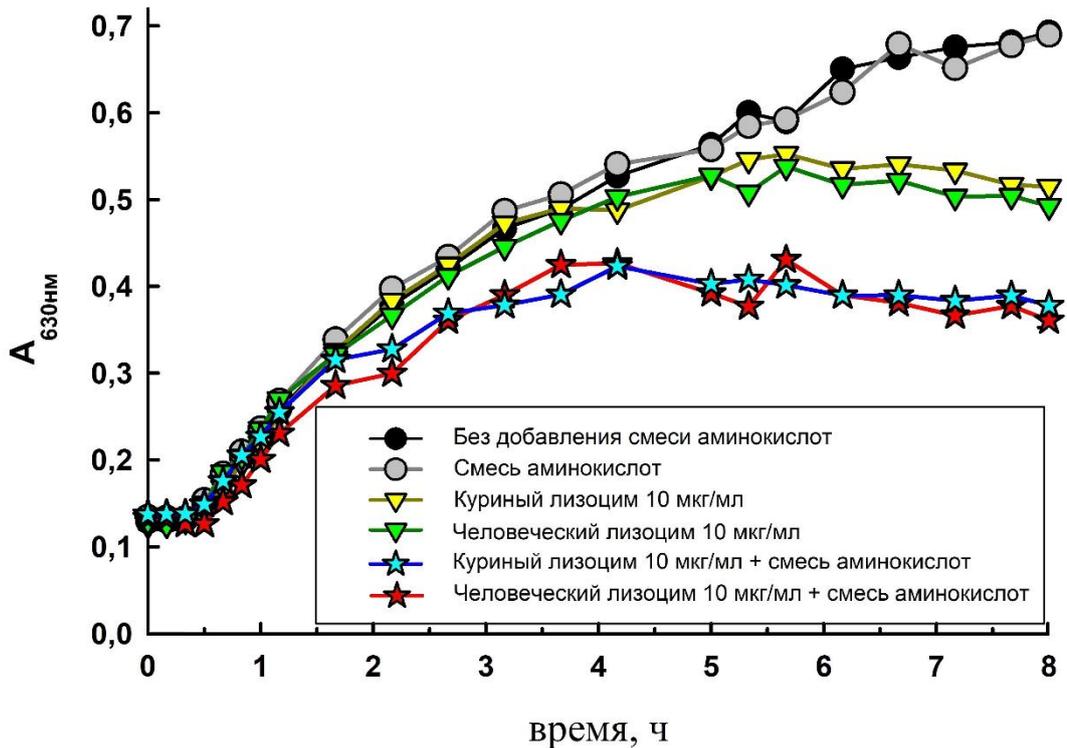


Рисунок 23. Рост бактерий *E. coli* в присутствии лизоцима и смеси аминокислот (согласно обозначениям на рисунке). Состав смеси аминокислот: Gly + Glu + Lys + His + Arg (1,5 мМ Gly и по 5 мМ остальных аминокислот). LB питательная среда (бактотриптон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, NaCl 5 г/л), pH 7,2. Скорость перемешивания 180 об/мин, 37°C.

Видим, что динамика роста клеток в присутствии аминокислот и в их отсутствие не изменяется, т.е. сочетания аминокислот в подобранных нами концентрациях сами по себе не оказывают бактериостатического действия. Это подтверждается литературными данными, где показано, что природные аминокислоты в концентрациях как минимум до 5 мМ не оказывают собственного антибактериального действия [29]. Интересно, что также имеются сведения о том, что комбинации аминокислот, а именно 1,1 мкг/мл Ser, 1,5 мкг/мл Met, 0,9 мкг/мл Ala 0,8 мкг/мл Gly в сочетании с лактатом, формиатом и ацетатом натрия в 10 раз замедляет рост клеток *E. coli* O75 №5557. При этом данная смесь не оказывает никакого влияния на рост штаммов других энтеробактерий [333]. В нашем эксперименте в присутствии 10 мкг/мл лизоцима и смеси аминокислот рост клеток замедляется по сравнению с ростом клеток в присутствии лизоцима, но в отсутствие эффекторов. Мы связываем это с усилением бактериолитического действия лизоцима в присутствии подобранных нами смесей аминокислот. Отдельно отметим, что концентрация 10 мкг/мл лизоцима находится вне диапазона линейной зависимости скорости лизиса клеток

лизоцимом от его концентрации и непригодна для турбидиметрического метода исследования активности фермента. Тем не менее, настоящий эксперимент демонстрирует наличие эффектов аминокислот и при таких высоких концентрациях фермента.

С практической точки зрения важно было определить, способна ли подобранная нами смесь аминокислот уменьшать минимальную бактерицидную концентрацию лизоцима, вызывающую полную гибель бактерий. В эксперименте по определению минимальной бактерицидной концентрации лизоцима мы задействовали две смеси: смесь 1 состава 1,5 мМ Gly, 5 мМ Lys, 5 мМ Glu, 5 мМ His, 5 мМ Arg и смесь 2 состава 15 мМ Gly, 50 мМ Lys, 50 мМ Glu, 50 мМ His, 50 мМ Arg. Методика определения эксперимента описана в главе «Материалы и методы». В табл. 3 приведены полученные результаты.

Таблица 3. Определение минимальной бактерицидной концентрации человеческого и куриного лизоцимов в присутствии и в отсутствие смесей аминокислот по отношению к клеткам E. coli.

Тип лизоцима	Эффектор	Концентрация лизоцима, мкг/мл				
		175	150	125	100	0
Куриный	нет	-	++	++	++	++
Человеческий	нет	-	++	++	++	++
Куриный	смесь 1*	-	-	-	++	++
Человеческий	смесь 1*	-	-	-	++	++
Куриный	смесь 2*	-	-	-	++	++
Человеческий	смесь 2*	-	-	-	++	++

Смесь 1 - 1,5 мМ Gly, 5 мМ Lys, 5 мМ Glu, 5 мМ His, 5 мМ Arg; смесь 2* - 15 мМ Gly, 50 мМ Lys, 50 мМ Glu, 50 мМ His, 50 мМ Arg.*

Минусами в таблице обозначено отсутствие роста бактерий, двумя плюсами – наличие колоний на чашках Петри. За минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) мы приняли минимальную концентрацию лизоцима, при которой не наблюдался рост бактерий на чашках. Видим, что МБК как куриного, так и человеческого лизоцимов в отсутствие эффекторов составляет 175 мкг/мл. Обе смеси показали одинаковое уменьшение МБК, а следовательно, увеличение концентраций аминокислот в смеси выше таковых для смеси 1 (5 мМ), по-видимому, не имеет практического смысла. Заметим, что полученное в

эксперименте значение минимальной ингибирующей/бактерицидной концентрации противомикробного вещества зависит как от методики проведения эксперимента (например, времени воздействия противомикробного вещества, начальной концентраций клеточной суспензии), так и самого бактериального штамма, на котором проверяется антибактериальное действие. В литературе минимальные ингибирующие (т.е. останавливающие видимый рост клеток) и бактерицидные концентрации лизоцима варьируются в довольно широком диапазоне значений. Так, одни исследователи сообщают, что минимальной ингибирующей рост *E. coli* концентрацией лизоцима является 1,5 мг/мл [334], другие называют величину 3,2 мг/мл [335]. Наш результат наиболее близок к полученному в 2018 году российскими исследователями А.В. Сгибневым и Е.А. Кремлевой [336]. Авторы сообщают о МБК лизоцима составляет 110 мкг/мл. Согласно данным табл. 3 как в присутствии смеси 1, так и в присутствии смесей 2 МБК куриного и человеческого лизоцимов снижается с 175 мкг/мл до 125 мкг/мл, т.е. на 30%. Интересно, что обработка лизоцима метаболитами лактобацилл, вырабатывающих перекись водорода, одновременно понижает бактериолитическую активность лизоцима примерно в 3,4 раза, но при этом уменьшает МБК лизоцима на 50% [336]. Модификация лизоцима кофейной кислотой и *n*-кумаровой кислотой также приводит к падению бактериолитической активности лизоцима на 35 и 30%, соответственно, и вместе с тем к уменьшению минимальной ингибирующей концентрации лизоцима в 3 и 2 раза, соответственно [334]. В нашем же случае понижение МБК сопровождается увеличением скорости лизиса клеток лизоцимом.

Для количественной оценки антибактериальных свойств лизоцима в присутствии смеси 1 (1,5 мМ Gly, 5 мМ Lys, 5 мМ Glu, 5 мМ His, 5 мМ Arg) мы посчитали КОЕ на чашках Петри с концентрацией лизоцима, близкой к МБК, как в присутствии эффекторов, так и в их отсутствии. Результаты подсчета представлены в табл. 4.

Таблица 4. Сравнение антибактериального действия человеческого и куриного лизоцимов по отношению к клеткам *E. coli* в присутствии смеси аминокислот и лизоцима и в их отсутствие.

Тип лизоцима, мкг/мл	Эффектор	среднее КОЕ/мл, 10 ⁶	$\frac{\text{КОЕ без лизоцима}}{\text{КОЕ с лизоцимом}}$ через 3 часа роста, %
нет	нет	53	100
нет	смесь 1*	54	100
Человеческий, 100 мкг/мл	смесь 1*	1,2	2
Куриный, 100 мкг/мл	смесь 1*	1,5	3
Человеческий, 150 мкг/мл	нет	1,8	3
Человеческий, 150 мкг/мл	нет	1,8	3

Смесь 1* - 1,5 мМ Gly, 5 мМ Lys, 5 мМ Glu, 5 мМ His, 5 мМ Arg.

Видим, что человеческий и куриный лизоцимы проявляют одинаковую антибактериальную активность по отношению к клеткам *E. coli*. Примерно одинаковое количество жизнеспособных клеток (~2-3% от количества клеток, выросших в отсутствие лизоцима) остается в присутствии 100 мкг/мл лизоцима и смеси аминокислот и 150 мкг/мл лизоцима в отсутствие аминокислот, т.е. антибактериальная активность лизоцима в присутствии смеси аминокислот возрастает примерно на треть по сравнению с антибактериальной активностью лизоцима в отсутствие эффекторов.

Таким образом, лизоцим в комбинации с подобранной нами смесью аминокислот (в том числе в боратно-карбонатном буферном растворе) может рассматриваться в качестве перспективного антисептического средства. При этом наличие активирующих эффектов в физиологических условиях свидетельствуют о потенциальной возможности регуляции бактериолитической активности лизоцима аминокислотами *in vivo*.

4.7. Влияние заряженных аминокислот и глицина на скорость лизиса различных бактерий в присутствии лизоцима

Активирующее действие глицина и заряженных аминокислот на ферментативный лизис клеток *E. coli*, как мы выяснили, осуществляется в широком диапазоне условий как для куриного, так и для человеческого лизоцима. В случае же с *M. luteus* увеличение бактериолитической активности лизоцима в присутствии аминокислот практически не наблюдалось. Этот факт подчеркивал необходимость выяснить, скорость ферментативного лизиса каких бактерий увеличивается в присутствии подобранных нами композиций аминокислот. Для этого мы сравнили скорости лизиса различных бактериальных клеток человеческим и куриным лизоцимом в присутствии смеси пяти аминокислот (5 мМ Lys + 5 мМ His + 5 мМ Arg + 5 мМ Glu + 1,5 мМ Gly) и в их отсутствие. Мы выбрали буферный раствор 15 мМ Na₂HPO₄, 15 мМ KH₂PO₄, pH 7,4 (значение pH плазмы крови человека) с ионной силой (70 мМ) заведомо выше оптимальной для *E. coli* (40 мМ) и *P. megaterium* (55 мМ), чтобы ожидаемые нами эффекты увеличения скорости лизиса клеток лизоцимом однозначно говорили о специфическом эффекте активирующих добавок, противоположном влиянию ионной силы. В работе с каждым штаммом мы использовали концентрации лизоцима, при которых наблюдались соизмеримые скорости лизиса клеток. Результаты эксперимента приведены в табл. 5.

Таблица 5. Сравнение скоростей лизиса разных бактерий куриным и человеческим лизоцимами в присутствии пяти аминокислот: Lys + His + Arg + Glu + Gly.

Клетки	Тип лизоцима/ концентрация, мкг/мл	Скорость лизиса клеток без эффекторов, 10 ⁻³ ·мин ⁻¹	Скорость лизиса клеток в присутствии эффекторов, 10 ⁻³ ·мин ⁻¹	Увеличение скорости лизиса в присутствии эффекторов, раз
<i>Priestia megaterium</i> КМ МГУ 17	Человеческий/ 0,5	3,6	6,9	1,9
	Куриный/ 0,5	3,7	7,8	2,1
<i>Priestia megaterium</i> ATCC 14581 (B-9869)	Человеческий/ 0,5	5,2	10,4	2,0
	Куриный/ 0,5	4,7	8,5	1,8
<i>Pseudomonas fluorescens</i> КМ МГУ 71	Человеческий/ 0,01	11,4	22,0	1,9
	Куриный/ 0,01	7,9	16,5	2,1
<i>Alcaligenes faecalis</i> КМ МГУ 82	Человеческий/ 0,05	5,2	5,3	нет
	Куриный/ 0,05	5,1	4,9	нет
<i>Escherichia coli</i> КМ МГУ 85	Человеческий/ 0,1	9,1	19,7	2,2
	Куриный/ 0,1	7,5	16,7	2,2
<i>Escherichia coli</i> KS-507 (B-3254)	Человеческий/ 0,1	8,2	36,3	4,4
	Куриный/ 0,1	6,8	28,4	4,2

<i>Aeromonas liquefaciens</i> КМ МГУ 89	Человеческий/ 0,1	4,6	4,9	нет
	Куриный/ 0,1	6,1	6,2	нет
<i>Citrobacter freundii</i> КМ МГУ 115	Человеческий/ 0,1	5,1	4,9	нет
	Куриный/ 0,1	4,9	4,7	нет
<i>Erwinia cerotovora</i> КМ МГУ 173	Человеческий/ 0,5	8,7	8,9	нет
	Куриный/ 0,5	6,8	6,4	нет
<i>Proteus vulgaris</i> КМ МГУ 206	Человеческий/ 0,1	8,9	9,2	нет
	Куриный/ 0,1	9,3	9,0	нет

Как видим, для пяти из десяти выбранных для эксперимента штаммов наблюдаются увеличение скорости лизиса клеток в присутствии смеси аминокислот. В данных условиях скорость ферментативного лизиса клеток увеличивается примерно в 2 раза для *E. coli* КМ МГУ 85, *P. megaterium* КМ МГУ 17, *P. megaterium* ATCC 14581 (В-9869) и *P. fluorescens* КМ МГУ 71. Наибольший эффект увеличения скорости лизиса клеток лизоцимом в присутствии смеси аминокислот наблюдается для клеток *E. coli* KS-507 (В-3254) и составляет 4,2-4,4 раза. Скорость лизиса остальных бактерий, а именно *A. faecalis* КМ МГУ 82, *A. liquefaciens* КМ МГУ 89, *C. freundii* КМ МГУ 115, *E. cerotovora* КМ МГУ 173, *P. vulgaris* КМ МГУ 206 в присутствии аминокислот не изменилась. Заметим, что величины ускорения лизиса клеток лизоцимом в присутствии аминокислот примерно одинаковы для куриного и человеческого лизоцимов.

Чтобы ответить на вопрос, почему скорость ферментативного лизиса одних бактерий увеличивается в присутствии аминокислот, а других нет, требуются дополнительные исследования. Можно предположить, что это связано с одновременным увеличением продуктивной сорбции лизоцима и блокировкой действия белковых ингибиторов лизоцима С-типа (куриного типа), которые известны для семейств Bacillaceae (к которому относят *P. megaterium*), Escherichia и Pseudomonas. Бактерии семейств Enterobacteriaceae и Pseudomonadaceae экспрессируют мембрано-связанный белковый ингибитор лизоцима С-типа MliC и периплазматические ингибиторы лизоцима С-типа PliC [337,338]. Для семейства Bacillaceae известен ингибитор куриного яичного лизоцима Hewli, предположительно липопротеин [339,340]. Бактерии рода Aeromonas экспрессируют периплазматический белковый ингибитор лизоцима PliI, который специфично ингибирует действие лизоцима I-типа (беспозвоночного типа) [341,342]. Из *A. hydrophila* был выделен периплазматический ингибитор лизоцима G-типа (гусиного типа) PliG, который имеет крайне низкую (<20%) гомологию последовательности с белковыми ингибиторами лизоцима С и I-типа и не ингибирует лизоцим С-типа [343,344]. У некоторых бактерий рода Erwinia обнаружен ингибитор лизоцима V-типа (вирусного типа), который также не способен ингибировать лизоцимы С-типа [345]. Для *C. freundii* белковые ингибиторы

лизоцима неизвестны. Мы предполагаем, что лизоцим в присутствии заряженных аминокислот и глицина в меньшей степени связываются с белковыми ингибиторами лизоцима С-типа у бактерий родов *Escherichia*, *Pseudomonas* и *Bacillus*, нежели в отсутствие эффекторов. Это приводит к тому, что бактериолитическая активность лизоцима по отношению к этим бактериям в присутствии смеси аминокислот выше, нежели в отсутствие эффекторов. У прочих штаммов бактерий, представленных в данном исследовании, белковые ингибиторы лизоцима С-типа отсутствуют. И хотя наше предположение о влиянии аминокислот на ингибирование фермента белковыми ингибиторами лизоцима является только нашей гипотезой, тем не менее, установленные нами экспериментальные факты говорят о сложности механизма действия аминокислот и важности природы субстрата (клеток). Отметим, что некоторые представители рода *Pseudomonas*, в частности *P. aeruginosa*, способны вызывать различные заболевания человека, в том числе пневмонию, желудочно-кишечные инфекции, дерматит, инфекции костей, суставов и мягких тканей [346]. Как уже упоминалась ранее, *E. coli* вызывают тяжелые пищевые отравления [121], а также близкородственны к таким патогенным бактериям из того же семейства, как *Salmonella spp*, *Klebsiella spp* [347], *Shigella spp* [118] и *Yersinia spp* [123], в то время как *P. megaterium* близкородственна различным патогенным бактериям из того же семейства *Bacillaceae* [151]. Сам факт того, что, по меньшей мере, три семейства патогенных и условно патогенных бактерий в условиях, приближенных к физиологическим, способны более эффективно подвергаться лизису в присутствии аминокислот служит хорошим подспорьем для будущего внедрения подобранной нами композиции эффекторов в состав лекарственных средств на основе лизоцима.

Теперь отдельно остановиться на ферментативном лизисе грамположительных штаммов. Их клеточная стенка существенно отличается от клеточной стенки грамотрицательных бактерий, в том числе и *E. coli*, поэтому различия в величине эффектов увеличения скорости лизиса клеток лизоцимом в присутствии аминокислот может говорить в пользу существования взаимодействия аминокислот с молекулярными структурами, окружающими ПГ и различающимися у разных видов бактерий. В нашей работе в качестве второго модельного микроорганизма мы использовали бактерию *Priestia megaterium* ATCC 14581 (В-9869), ферментативный лизис которого, как и лизис *Priestia megaterium* (KM 17), чувствителен к действию аминокислот. Далее штамм *P. megaterium* ATCC 14581 для краткости именуется просто *P. megaterium*. На рис. 24 (см. с. 90) представлены зависимости скорости лизиса клеток *P. megaterium* и клеток *E. coli* человеческим и куриным лизоцимами в присутствии трех избранных аминокислот: незаряженного глицина в его оптимальной

концентрации 1,5 мМ, отрицательного заряженного глутамата концентрации 5 мМ и положительно заряженного аргинина также концентрации 5 мМ. В целом, можно сказать, что характер зависимостей для куриного и человеческого лизоцимов схож. В присутствии глутамата и аргинина увеличение скорости лизиса клеток лизоцимом происходит как для *E. coli*, так и для *P. megaterium*, причем чем больше концентрация аминокислоты, тем выше скорость лизиса клеток. При этом относительные величины увеличения скорости лизиса клеток лизоцимом в присутствии одного и того же эффектора близки между собой для обоих видов бактерий. В случае глицина картина несколько различается. В пределах погрешности можно сказать, что глицин практически не оказывает влияния на лизис клеток *P. megaterium* ни куриным, ни человеческим лизоцимами, чего нельзя сказать для клеток *E. coli*, для которых наблюдается эффект увеличения скорости лизиса клеток при 1,5 мМ аминокислоты. Эти сведения снова говорят в пользу схожего механизма влияния заряженных аминокислот, в то время как активирующее действие глицина по всей видимости специфично для клеток *E. coli*.

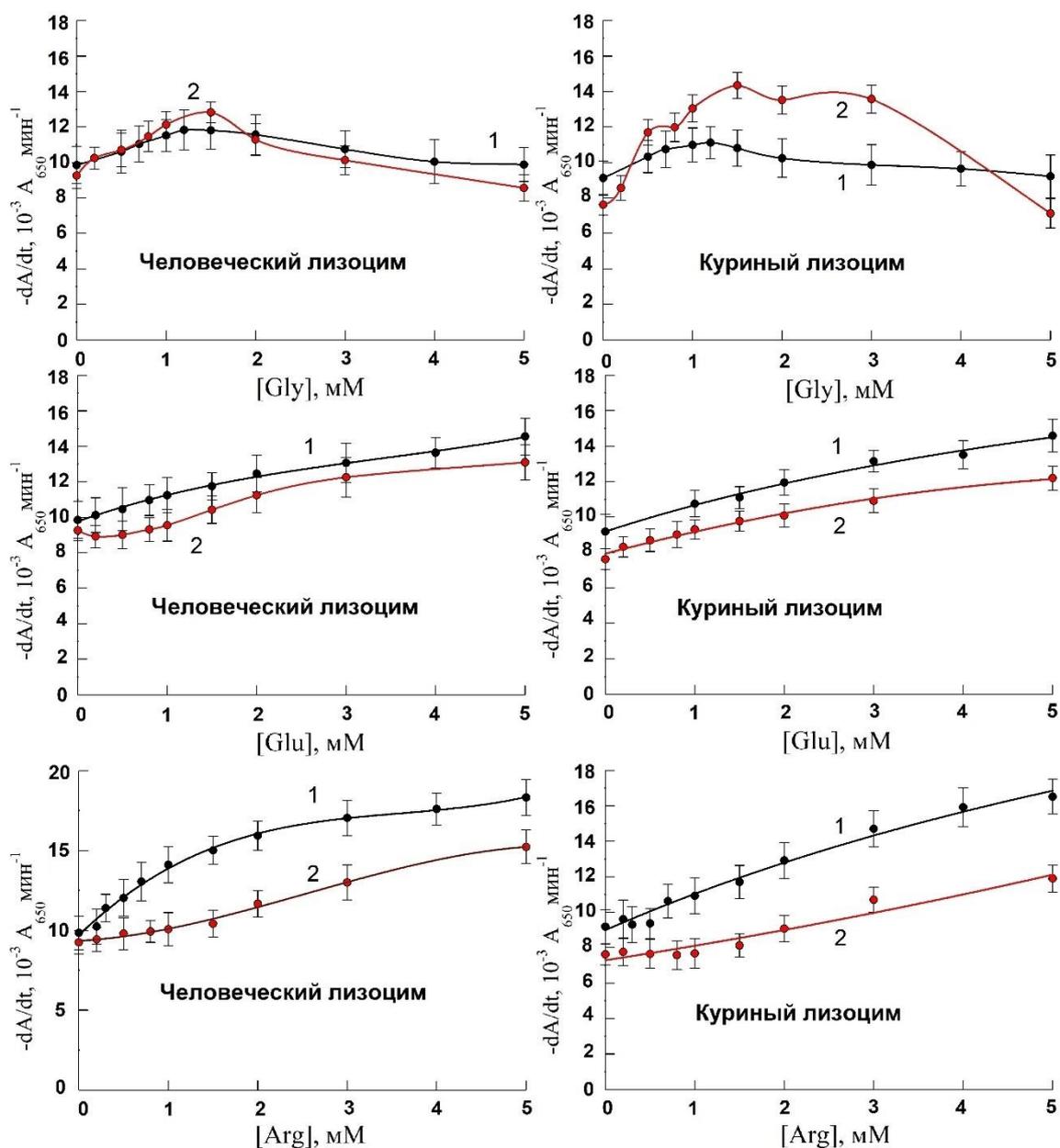


Рисунок 24. Зависимости скорости лизиса клеток *P. megaterium* (1) и *E. coli* (2) куриным и человеческим лизоцимами от концентрации аминокислот (согласно обозначениям на рисунке). Буферная смесь для *E. coli*: 0,01 М Трис-MES- Na_2CO_3 с добавлением 25 мМ NaCl, рН 8,5, концентрация лизоцима 0,1 мкг/мл. Буферная смесь для *P. megaterium*: 0,02 М Трис-HCl с добавлением 55 мМ NaCl, рН 8,0, концентрация лизоцима 0,5 мкг/мл.

Заметим также, что ранее в литературе было показано, что аргинин и глутамат, в отличие от глицина, ускоряют лизис клеток в том числе и иными бактериолитическими факторами, например, белком интерлейкином-2 [18]. Кроме того, известно, что аргинин препятствует агрегации лизоцима [348]. При этом наибольший эффект ускорения лизиса

клеток, обеспеченный присутствием аминокислот, наблюдается именно для нативной, а не иммобилизованной формы лизоцима [21]. Эти экспериментальные факты демонстрируют, что влияние аминокислот на лизис клеток определяется целой совокупностью факторов: строением эффектора (активирующее действие аргинина и глутамата более универсально, чем, например, глицина), строением бактериолитического фактора, которым осуществляется лизис, а также окружением субстрата (муреина), т.е. видом лизируемых клеток.

4.8. Молекулярный докинг и выводы о молекулярных причинах изменения ферментативной активности в присутствии эффекторов

Неизбежно возникает вопрос о сайтах связывания на поверхности фермента, подходящих для взаимодействия с исследуемыми эффекторами. Строго говоря, на сложный процесс лизиса живой клетки может влиять как взаимодействие эффектора с ферментом, так и воздействие эффектора на субстрат – живую клетку с её сложной пространственной организацией поверхности сополимера клеточной стенки. Тем не менее, рассмотрение вопроса изолированного взаимодействия фермента с эффектором может приблизить нас к пониманию картины в целом. Мы рассмотрели возможное взаимодействие лизоцима с аминокислотами, способными увеличивать скорость лизиса клеток лизоцимом, а именно, положительно заряженными Arg, Lys, His; отрицательно заряженными Asp и Glu, а также нейтральным Gly. Поскольку характер влияния изучаемых эффекторов (аминокислот), как экспериментально показано выше, сохраняется в широком диапазоне значений pH (7,0-8,5), то при выборе условий протонирования мы сделали допущения, приняв суммарный заряд Asp и Glu равным -1, Arg, Lys, His равным +1, Gly равным нулю. Тем не менее, следует помнить, что локальные значения pH в активном центре, а также в полостях и углублениях на поверхности белковой глобулы, могут существенно отличаться от значений pH регистрируемых в растворе. Многоточечные взаимодействия по одним и тем же аминокислотным остаткам у разных (хотя и сходных) лизоцимов не обязательно должны характеризоваться одинаковой энергией взаимодействия. Выравнивание аминокислотных последовательностей человеческого и куриного лизоцимов показало, что участки связывания белка с одной и той же аминокислотой-лигандом в ряде случаев представлены идентичными или почти идентичными группами аминокислотных остатков, образующих карман или пространственную структуру топологически и/или энергетически выгодную

для докинга. В табл. 6 приведены расчётные величины энергии взаимодействия аминокислот-лигандов с участками поверхности лизоцима. Сайты связывания лизоцима с лигандами, энергии взаимодействия которых была ниже 5 ккал/моль, не приведены в таблице ввиду малости соответствующих теоретически вычисленных констант равновесия образования комплекса белок-лиганд. Из табл. 6 видим, что потенциальные сайты связывания лизоцима с лигандами, имеющие энергию взаимодействия, превышающую 5 ккал/моль, найдены для глицина, аспартата, лизина, аргинина и глутамата, но не найдены для гистидина (энергии взаимодействия потенциальных сайтов связывания с гистидином оказались ниже 5 ккал/моль, поэтому не приведены в таблице). При этом для аспартата и глутамата найдено по два потенциальных сайта связывания как с куриным, так и с человеческим лизоцимом. Два сайта связывания с человеческим лизоцимом найдены также и для глицина. Для остальных аминокислот найдено по одному сайту связывания с лизоцимом.

Потенциальные сайты связывания глицина с лизоцимом представлены как в табл. 6, так и на рис. 25.

Таблица 6. Рассчитанные энергии взаимодействия лигандов с потенциальными сайтами связывания на поверхности лизоцима, находящимися вне и вблизи активного центра фермента.

Комбинация фермент-лиганд	Аминокислотные остатки лизоцима	Расчетная ΔG, ккал/моль
Ч, Arg	Asp-102, Trp-63	-6.0
К, Arg	Asp-101, Trp-63	-6,3
Ч, Lys	Asp-102, Ala-108	-6.4
К, Lys	Asp-101, Ala-107	-5.8
Ч, Asp	Gln-58, Asn-60, Ala-108	-5.4
	Asn27, Arg119	-5,9
К, Asp	Gln-57, Asn-59, Ala-107	-5.3
	Asn27, Gly117	-6,2
Ч, Glu	Gln-58, Asn-60, Trp-64	-5.4

	Asp-101, Arg-21	-6,1
K, Glu	Gln-57, Asn-59, Trp-63	-5.8
	Arg-112	-5,7
Ч, Gly	Trp-64, Gln-104, Ala-108	-5.3
	Asp-18	-5.4
K, Gly	Asp-18, Asn-19	-5.8

Ч – человеческий лизоцим, К – куриный лизоцим.

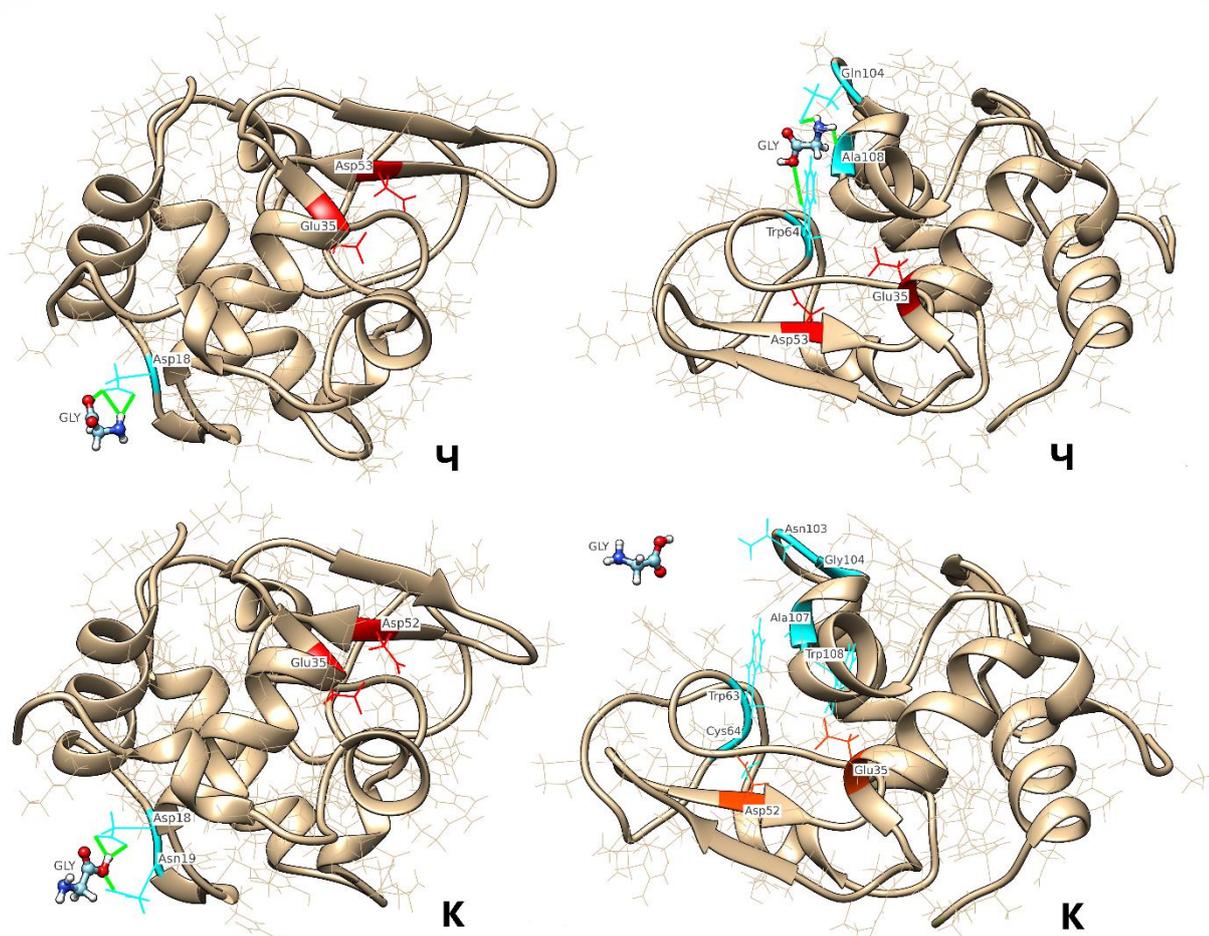


Рисунок 25. Потенциальные сайты связывания глицина за пределами активного центра лизоцима. Красным цветом выделены аминокислотные остатки активного центра. Голубым цветом выделены аминокислотные остатки, участвующие в связывании лиганда. Зеленым цветом обозначена область межмолекулярного взаимодействия. Ч – молекула человеческого лизоцима. К – молекула куриного лизоцима.

Примеры возможного взаимодействия глицина с человеческим лизоцимом вне активного центра – это два найденных нами потенциальных сайта, один с участием одного аминокислотного остатка Asp-18 и второй с участием трёх аминокислотных остатков Trp-64, Gln-104 и Ala-108. Тройной контакт, несмотря на меньшую энергию взаимодействия, может быть использован для обеспечения большей специфичности действия глицина в качестве лиганда. Таким образом, мы предполагаем, что этот вариант предпочтительнее с точки зрения регуляции ферментативной активности, что, впрочем, не исключает участие Asp-18 лизоцима в связывании глицина. У куриного лизоцима также имеется участок связывания глицина в области остатка Asp-18, но при этом в связывании глицина участвует также и другой остаток, а именно Asn-19. У куриного лизоцима есть область, аналогичная таковой для человеческого лизоцима с сайтом связывания глицина с тремя аминокислотными остатками фермента. Однако, в отличие от человеческого лизоцима, методами молекулярного докинга потенциальных сайтов связывания глицина в этой области не найдено. Рис 26 наглядно демонстрирует различие в возможностях докинга в зависимости от взаимного расположения боковых цепей относительно друг друга.

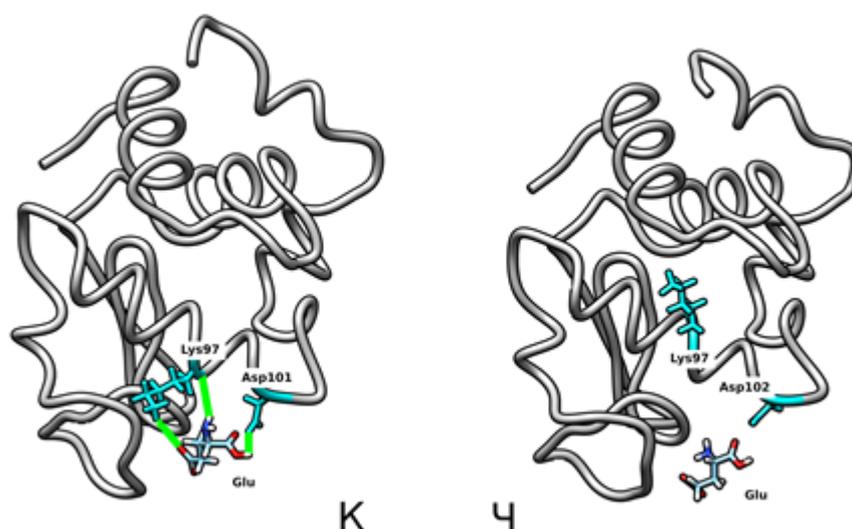


Рисунок 26. Сайты связывания с глутаматом у куриного (К) и человеческого (Ч) лизоцима с энергией взаимодействия ниже 5 ккал/моль.

Так, смещение остатка аспарагиновой кислоты у человеческого лизоцима на одно положение по сравнению с куриным лизоцимом (Asp-101 -> Asp-102) приводит к тому, что боковые цепи остатков лизина и аспарагиновой кислоты оказываются разделены в пространстве, вследствие чего образование двух- и трёхточечных контактов глутамата с человеческим лизоцимом по этим двум остаткам становится невозможным.

Связывание эффекторов вне активного центра фермента указывает на потенциальную возможность их участия в аллостерической регуляции. Очень интересное различие между ферментами заключается в том, что для человеческого лизоцима наибольшая скорость ферментативного лизиса клеток наблюдается в присутствии тройной комбинации Glu+His+Arg, а для куриного лизоцима – в присутствии Lys+His+Arg. Используя методы молекулярного докинга, мы не смогли дать однозначное объяснение таким различиям. Тем не менее, мы предполагаем, что причина этих различий кроется в том, что у человеческого лизоцима есть один дополнительный Asp (Asp-109, 7 против 6) и один дополнительный Glu (Glu-22, 3 против 2). Совместное действие положительно заряженных аминокислот может проявляться в том, что положительно заряженные свободные аминокислотные радикалы могут связываться с отрицательно заряженными боковыми группами Glu и Asp на поверхности фермента, образуя отрицательно заряженный стерический выступ (их свободной карбоксильной группой). Это, в свою очередь, ухудшает связывание фермента с отрицательно заряженной поверхностью бактериальной клетки. Наиболее вероятно, что мы имеем дело со сложной ситуацией, включающей изменение как свойств самого специфического фермента, так и фактической природы связывания фермента с субстратом, в данном случае с бактериальными клетками.

4.9. Спектры флуоресценции лизоцима в присутствии аминокислот

Методом молекулярного докинга мы показали принципиальную возможность существования сайтов связывания лизоцима со свободными аминокислотами. Дабы фактически подтвердить наличие взаимодействия фермента с аминокислотами, мы получили спектры флуоресценции лизоцима в их присутствии. Мы выбрали пять аминокислот (компонент подобранной нами смеси), а именно аргинин, гистидин, глутамат, лизин и глицин. Полученные спектры флуоресценции приведены на рис. 27.

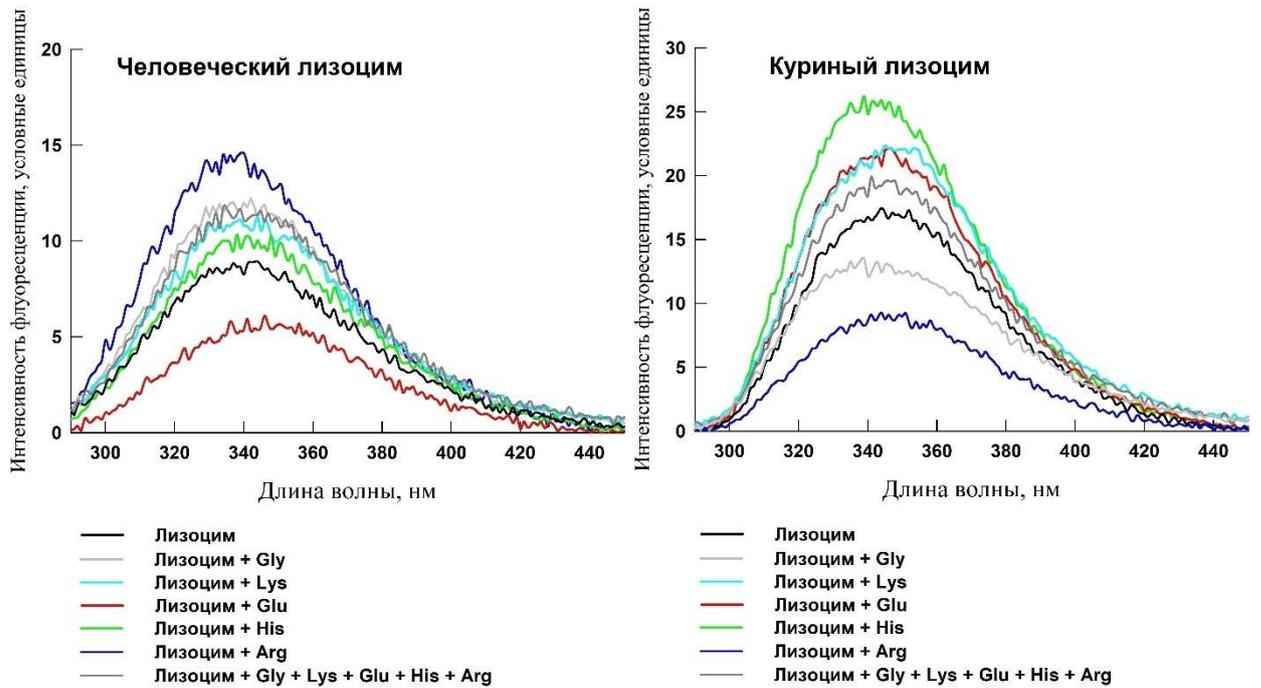


Рисунок 27. Спектры флуоресценции при длине возбуждающего света 280 нм человеческого и куриного лизоцимов в присутствии аминокислот (согласно обозначениям на рисунке). Концентрация лизоцима 0,1 мг/мл. Концентрация глицина 1,5 мМ, заряженных аминокислот 5 мМ. 0,01 М Трис-MES с добавлением 25 мМ NaCl, pH 8,5, 37°C.

Используемые в эксперименте аминокислоты не обладали автофлуоресценцией. Пики флуоресценции куриного и человеческого лизоцима при длине волны возбуждения 280 нм, на которой поглощают ароматические аминокислотные остатки белка (в первую очередь, триптофан), совпадают и составляют 343 нм. Присутствие 5 мМ гистидина приводит к небольшому (на 10% процентов) увеличению флуоресценции человеческого лизоцима без сдвига пика флуоресценции. В случае куриного лизоцима интенсивность флуоресценции в присутствии 5 мМ гистидина увеличивается в 1,5 раза. Возможно, гистидин взаимодействует с поверхностным триптофаном молекулы белка, и это взаимодействие у куриного лизоцима вносит больший вклад в флуоресценцию фермента, нежели у человеческого. Интересно, что влияние отрицательно заряженного глутамата и положительно заряженного аргинина на флуоресценцию у куриного и человеческого лизоцимов диаметрально противоположны. Если глутамат увеличивает интенсивность флуоресценции куриного лизоцима на 25% и уменьшает флуоресценцию человеческого лизоцима в 1,5 раза, то аргинин, наоборот, снижает интенсивность флуоресценции куриного лизоцима в 2 раза и в 1,5 раза увеличивает флуоресценцию человеческого. Различие в направлениях изменения интенсивности флуоресценции для одной аминокислоты у разных типов фермента, вероятно, свидетельствует о разных сайтах

связывания, с которыми взаимодействуют аминокислота. Напомним, что для человеческого лизоцима скорость ферментативного лизиса клеток имеет наибольшую величину в присутствии тройной комбинации аминокислот Glu+His+Arg, а для куриного лизоцима – в присутствии Lys+His+Arg. Различие в сайтах связывания человеческого и куриного лизоцимов с глутаматом могло бы объяснить разницу в эффектах увеличения скорости лизиса клеток разными типами лизоцима в присутствии соответствующих тройных смесей аминокислот. Противоположные изменения интенсивности флуоресценции куриного и человеческого лизоцимов наблюдаются также в присутствии глицина. Для куриного лизоцима интенсивность флуоресценции в максимуме интенсивности падает на 20%, а для человеческого повышается на 30%. Вероятно, это также связано с различиями в сайтах связывания глицина у куриного и человеческого лизоцимов. Это согласуется с тем, что методом молекулярного докинга нами было найдено разное число потенциальных сайтов связывания глицина: два для человеческого лизоцима и один для куриного. Что касается лизина, спектр флуоресценции лизоцима в его присутствии также претерпевает изменения. В присутствии 5 мМ лизина наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции как человеческого, так и куриного лизоцимов. Вероятно, здесь также происходит взаимодействие лизина с ароматическими аминокислотными остатками как куриного, так и человеческого лизоцима. При одновременном присутствии пяти аминокислот интенсивности флуоресценции куриного и человеческого лизоцима также изменяются, возрастая в максимуме флуоресценции на 10 и 25%, соответственно.

Отметим, что в молекуле куриного лизоцима в полипептидной цепи из 129 аминокислотных остатков имеется шесть остатков триптофана: Trp-28, Trp-62, Trp-63, Trp-108, Trp-111, Trp-123, а в человеческом (из 130 аминокислотных остатков) пять: Trp-28, Trp-34, Trp-64, Trp-109, Trp-112 [349]. Из них на внешней поверхности белковой молекулы у куриного лизоцима находятся остатки Trp-123 и Trp-63, а у человеческого – Trp-34 и Trp-64. Поверхностному остатку Trp-123 в курином лизоциме соответствует Trp-124 в человеческом, а поверхностному остатку Trp-34 в человеческом лизоциме соответствует Phe-34 в курином. Заметим, что согласно результатам расчета, выполненного компьютерным методом исследования межмолекулярных взаимодействий (методом молекулярного докинга) остатки Trp-63 (у куриного лизоцима) и Trp-64 (у человеческого лизоцима) образуют потенциальные сайты связывания лизоцима с глутаматом и аргинином. Поскольку поверхностные аминокислотные остатки наиболее стерически доступны для связывания с эффекторами, мы считаем, что именно они участвуют в связывании фермента с аминокислотами (т.е. в связывании с эффекторами, наиболее

вероятно, задействованы остатки Trp-123 и Trp-63 у куриного лизоцима и Trp-34 и Trp-64 у человеческого). Изменение микроокружения остатков триптофана в результате взаимодействия с аминокислотой вполне может привести к изменению интенсивности флуоресценции лизоцима. Поскольку триптофан, как правило, участвует в гидрофобных и стекинг-взаимодействиях, мы предполагаем, что изменение флуоресценции лизоцима было вызвано не прямым взаимодействием остатков триптофана со свободными аминокислотами, а опосредованно посредством нековалентных взаимодействий аминокислот с пространственно-сближенными с триптофаном полярными аминокислотными остатками белка, например, с Lys-33 и Glu-35, соседними с Trp-34 аминокислотными остатками человеческого лизоцима, и с Asp-101, Gln-57, пространственно сближенными к Trp-63 аминокислотными остатками куриного лизоцима. Заметим также, что связывание аминокислот с поверхностным Phe-34 у куриного лизоцима и поверхностного Tyr-124 у человеческого тоже возможно. Остатки фенилаланина и тирозина, хотя и в значительно меньшей степени, чем остатки триптофана, тем не менее, вносят свой вклад в флуоресценцию белковой молекулы [350].

Таким образом, глутамат, аргинин, гистидин, лизин и глицин, по-видимому, способны связываться с поверхностью лизоцима, затрагивая при этом остатки ароматических аминокислот так, что происходит изменение интенсивности флуоресценции. Подчеркну, что полученные сведения никоим образом не опровергают возможность взаимодействия аминокислот как с компонентами живой клетки (включая ингибиторы лизоцима), так и с комплексом фермент-субстрат (лизоцим-клетка).

4.10. Связь адсорбции лизоцима на бактериях с бактериолитической активностью

Мы уже отмечали ранее, что механизм действия бактериолитического фермента включает две стадии: первую – адсорбцию фермента на субстрате, и вторую – непосредственно сам каталитический акт. Отсюда следует, что изменение скорости лизиса клеток может быть вызвано влиянием эффектора как на первый (сорбционный), так и на второй (каталитический) этап ферментативной реакции. В случае, когда высокие значения адсорбции фермента на поверхности клетки сочетаются с малой активностью фермента, мы можем говорить о так называемой непродуктивной сорбции [24,25]. Это означает, что хоть фермент и находится в связанном (сорбированном) виде, он в силу тех или иных причин не способен осуществить каталитический акт. Строго говоря, непродуктивная сорбция может

объясняться не только дезактивацией фермента специально имеющимися у некоторых видов бактерий молекулярными ловушками (периплазматическими ингибиторами лизоцима, о них мы говорили ранее [170]), но и способностью фермента адсорбироваться на молекулярных структурах поверхности клетки (например, липополисахаридах). И в том, и в другом случае пептидогликан оказывается недоступен для лизоцима, а следовательно протекание ферментативной реакции становится невозможным. Кроме того, нельзя исключать и возможность многослойной адсорбции фермента, где муреин клеточной стенки, очевидно, оказывается недоступен для верхних слоев адсорбированного фермента. Продуктивная сорбция отличается от непродуктивной тем, что она необходимо предшествует самому каталитическому акту. Проще говоря, продуктивная сорбция представляет собой «посадку» фермента в такой позиции, что гексасахаридный фрагмент пептидогликана оказывается доступен для дальнейшего гидролиза ферментом. Повышение продуктивной сорбции наблюдается в том случае, если при возрастании доли сорбированного фермента на поверхности клеток возрастает и скорость ферментативного лизиса бактерий. Даже при неизменной скорости самого каталитического акта, само по себе увеличение количества сорбируемого фермента на поверхности бактерии (в случае, если это адсорбция продуктивна, конечно) скорость лизиса бактерий возрастает. Поскольку адсорбция существенно зависит от внешних условий, повышать и понижать непродуктивную сорбцию можно путем варьирования рН среды, солености буфера и температуры. Мы предполагаем, что рассматриваемые в настоящей работе эффекторы тоже могут оказывать влияние на параметры адсорбции лизоцима, и это может быть одним из механизмов их влияния на эффективность ферментативного лизиса клеток.

4.11. Влияние ионной силы и рН на адсорбцию лизоцима на клетках *E. coli*

Как было упомянуто выше, на параметры адсорбции могут влиять внешние условия. Для того чтобы правильно интерпретировать результаты эксперимента по измерению сорбционных параметров лизоцима в присутствии аминокислот, мы должны сначала выяснить, какие именно параметры и в какую сторону изменяются при изменении тех или иных факторов. Для нас особый интерес представляла зависимость сорбционных параметров от ионной силы и рН, поскольку взаимодействие лизоцима с клетками может происходить в совершенно разных условиях, начиная от деструкции бактерии в кислой среде лизосом эукариот, заканчивая лизисом галофильных бактерий слабощелочной

слиюной морской млекопитающего. На рис. 28 представлены изотермы адсорбции человеческого и куриного лизоцима при разных pH среды в буферном растворе с оптимальным значением ионной силы (без добавления Na_2CO_3).

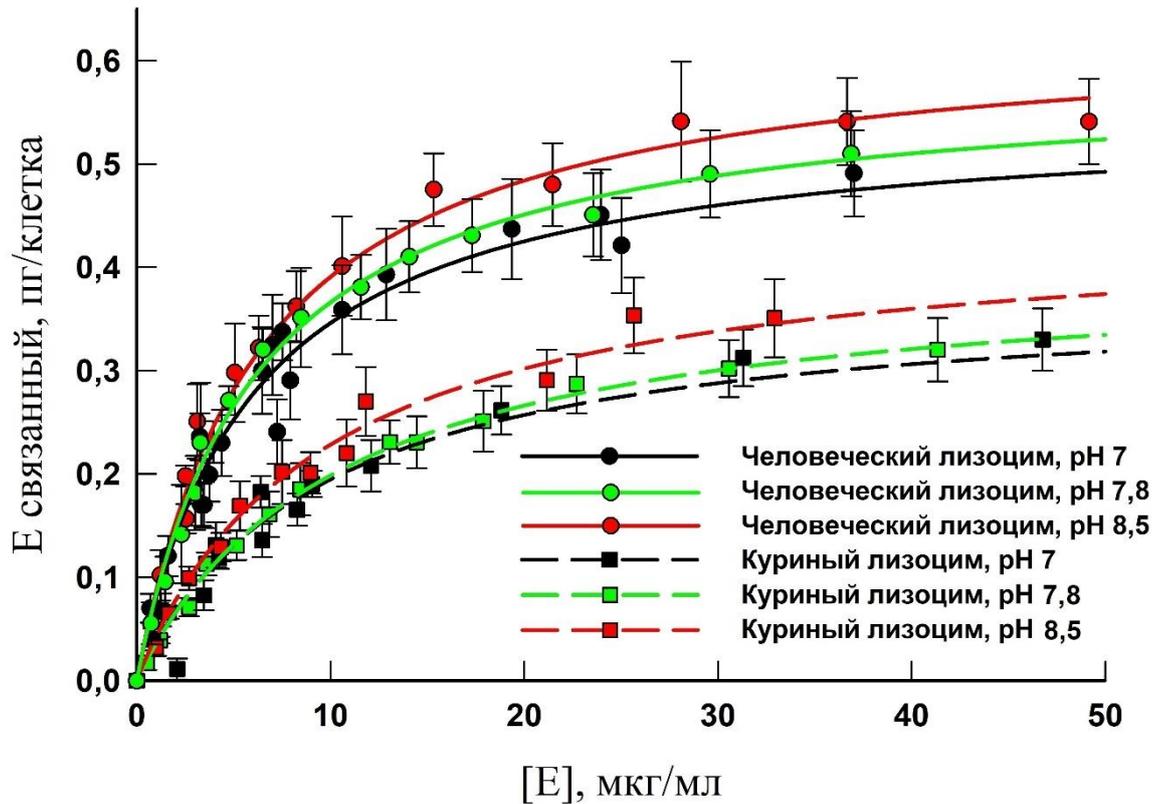


Рисунок 28. Изотермы адсорбции человеческого и куриного лизоцимов на клетках *E. coli* при разных значениях pH (согласно обозначениям на рисунке). Буферная смесь 0,01M Трис-MES с добавлением 25 мМ NaCl.

Мы выбрали именно такой диапазон кислотности, поскольку в этих условиях клетки *E. coli* наиболее стабильны, а при более высоких значениях pH показывают высокие значения фонового лизиса, что негативно влияет на воспроизводимость результатов эксперимента. Заметим, что полученные экспериментальные данные удовлетворительно описываются уравнением сорбции Ленгмюра. Небольшие отклонения экспериментальных данных от уравнения Ленгмюра объясняются неоднородностью центров связывания с лизоцимом на поверхности бактерий. Ввиду этого, рассчитанные по уравнению Ленгмюра сорбционные параметры правильнее считать усредненными эффективными величинами. Речь идет о таких параметрах адсорбции, как константа десорбции фермента с поверхности бактериальной клетки и максимальная сорбционная емкость бактериальной клетки по

отношению к ферменту (то есть максимальное количество лизоцима, способное адсорбироваться на поверхности одной клетки). Их значения приведены в табл. 7.

Таблица 7. Адсорбция человеческого и куриного лизоцимов на клетках *E. coli* при разных рН. Сорбционные параметры, рассчитанные по уравнению Ленгмюра.

рН	лизоцим	7	7,8	8,5
Константа десорбции фермента на поверхности клеток $K_d, 10^{-7} \text{ M}$	Ч	$3,6 \pm 0,6$	$3,6 \pm 0,9$	$3,8 \pm 0,7$
	К	$6,6 \pm 1,3$	$7,2 \pm 1,1$	$6,6 \pm 1,2$
Максимальная сорбционная емкость клеток по лизоциму V_{max} , пг/клетка (сверху); <u>аттомоль/клетка</u> (снизу)	Ч	$0,55 \pm 0,04$	$0,59 \pm 0,06$	$0,63 \pm 0,04$
		<u>33 ± 2</u>	<u>36 ± 4</u>	<u>38 ± 2</u>
	К	$0,38 \pm 0,03$	$0,40 \pm 0,02$	$0,44 \pm 0,02$
		<u>27 ± 2</u>	<u>28 ± 1</u>	<u>31 ± 1</u>
Скорость лизиса клеток, $-dA/dt, 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$	Ч	$6,8 \pm 0,6$	$11,3 \pm 1,3$	$13,9 \pm 1,4$
	К	$4,0 \pm 0,5$	$7,7 \pm 0,8$	$11,4 \pm 1,3$

Ч – человеческий лизоцим, К – куриный лизоцим.

Видим, что максимальная сорбционная емкость клеток по отношению к человеческому лизоциму в одних и тех же условиях выше на 20-30% максимальной сорбционной емкости клеток по отношению к куриному лизоциму, но ввиду относительной малости этого различия и структурного сходства двух типов лизоцима мы можем предположить, что оба лизоцима связываются с аналогичными сайтами связывания на поверхности бактериальных клеток, хотя и с разной эффективностью. Поскольку константы десорбции для человеческого лизоцима в среднем на 80% меньше таковых для куриного лизоцима, мы делаем вывод, что человеческий лизоцим лучше связывается с поверхностью клеток, нежели куриный.

Что касается эффекта кислотности среды, видим, что с увеличением рН постепенно возрастает максимальная сорбционная емкость клеток (это так же подтверждают данные табл. 9 (с. 107)), при этом константа десорбции в пределах погрешности эксперимента остается неизменной. Согласно литературным данным, аналогичный эксперимент,

проведенный на грамположительных клетках *Lactobacillus plantarum* показал, что наибольшее значение максимальной сорбционной емкости находится в области оптимума активности фермента [314]. Однако там речь шла о области рН близкой к нейтральной (рН 6,7), где бактериальные клетки ведут себя стабильно. В нашем же случае мы не можем существенно уйти в более щелочную область, поскольку результаты эксперимента ввиду нестабильности клеток плохо воспроизводимы. Поэтому мы не можем зафиксировать наблюдаемый с *L. plantarum* феномен и в работе с *E. coli*, но можем утверждать, что при увеличении рН в сторону оптимума активности фермента (то есть по мере уменьшения кислотности среды) максимальные сорбционные емкости клеток увеличиваются. Возможно, при оптимальном значении рН для каждого конкретного вида бактерии поддерживается оптимальное соотношение заряженных и незаряженных аминокислотных остатков лизоцима и молекулярных структур поверхности бактерии для связывания максимального числа молекул фермента.

Перейдем теперь к обсуждению влияния ионной силы на сорбционные параметры лизоцима. Проверить влияние фактора ионной силы на адсорбцию было крайне важно, поскольку используемые нами в работе эффекторы являются электролитами и сами по себе изменяют ионную силу раствора. На рис. 29 приведены изотермы адсорбции, полученные при разном содержании NaCl в буферном растворе с рН 8,5.

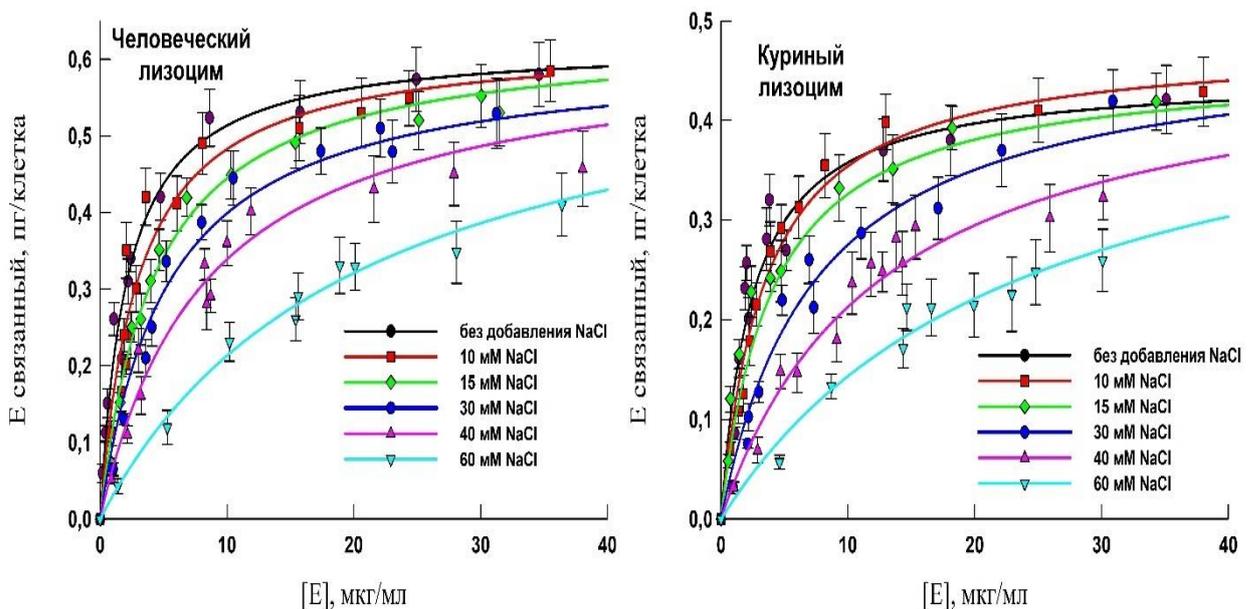


Рисунок 29. Изотермы адсорбции человеческого и куриного лизоцимов на клетках *E. coli* при разных концентрациях NaCl (согласно обозначениям на рисунке). Буферная смесь 0,01M Трис-HCl, рН 8,5.

Ниже представлена табл. 8 с сорбционными параметрами, вычисленными по уравнению сорбции Ленгмюра.

Таблица 8. Значения активности и адсорбция человеческого и куриного лизоцимов на клетках *E. coli* при разных концентрациях NaCl, pH 8,5. Сорбционные параметры, рассчитанные по уравнению Ленгмюра.

[NaCl], mM	лизоцим	0	10	15	30	40	60
$K_d, 10^{-7} \text{ M}$	Ч	1,3±0,3	1,8±0,3	2,6±0,5	3,2±0,7	5,0±1,2	12,4±2,4
	К	1,7±0,3	2,4±0,5	2,8±0,7	5,2±1,1	8,7±1,7	16,6±2,9
$V_{\max}, \text{ пг/клетка (сверху); аттомоль/клетка (снизу)}$	Ч	0,62 ±0,06	0,62 ±0,05	0,63 ±0,06	0,61 ±0,05	0,62 ±0,07	0,65 ±0,07
		<u>38±4</u>	<u>38±3</u>	<u>38±4</u>	<u>37±3</u>	<u>38±4</u>	<u>39±4</u>
	К	0,45 ±0,02	0,48 ±0,04	0,46 ±0,04	0,48 ±0,03	0,48 ±0,03	0,48 ±0,04
		<u>31±1</u>	<u>34±3</u>	<u>32±3</u>	<u>34±2</u>	<u>34±2</u>	<u>34±3</u>
Скорость лизиса клеток, $-dA/dt, 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$	Ч	2,7±0,5	4,9±0,7	5,5±0,7	10,9±1,1	13,9±1,4	10,1±1,1
	К	2,7±0,4	3,7±0,5	5,0±0,6	9,4±1,0	11,4±1,3	8,2±1,1

Ч – человеческий лизоцим, К – куриный лизоцим.

Результаты нашего эксперимента хорошо соответствуют литературным данным, где было показано, что в случае адсорбции куриного лизоцима на поверхности бактерий *E. coli* понижение ионной силы раствора на 30–40 mM от оптимального значения приводит к увеличению адсорбции фермента [27]. Однако, как мы видели из рис. 15 (см. с. 67) и рис. 22 (см. с. 78), это сопровождается резким падением скорости лизиса клеток, т.е. происходит возрастание вклада непродуктивной сорбции. Изменение скорости лизиса клеток продемонстрированы в нижней строке таблицы. Мы видим также, что схожая картина наблюдается при замене куриного лизоцима на человеческий. Отличие только в том, что максимальные сорбционные емкости клеток по отношению к человеческому лизоциму оказываются выше таковых по отношению к куриному, а константы десорбции в среднем в 1,4 раза меньше.

Увеличение константы десорбции при неизменной максимальной сорбционной емкости клеток, по-видимому, свидетельствует о том, что при увеличении ионной силы общее число мест посадки фермента на поверхность клетки остается постоянным, но при этом адсорбция фермента ухудшается. По-видимому, это связано с тем, что рост ионной

силы ослабляет силу притяжения между отрицательно заряженной поверхностью бактериальной клетки и положительно заряженной молекулой белка.

4.12. Влияние свободных аминокислот на адсорбцию лизоцима на клетках *E. coli* при разных рН

Теперь, когда мы выяснили, как влияют на параметры адсорбции лизоцима на клетках *E. coli* изменение таких внешних факторов как рН и осмимольности среды, мы можем перейти к более детальному изучению влияния аминокислот, а именно определению их вклада в изменение адсорбции фермента на клетках.

На рис. 30 представлены изотермы адсорбции человеческого и куриного лизоцимов в оптимуме активности фермента и при нейтральном значении рН.

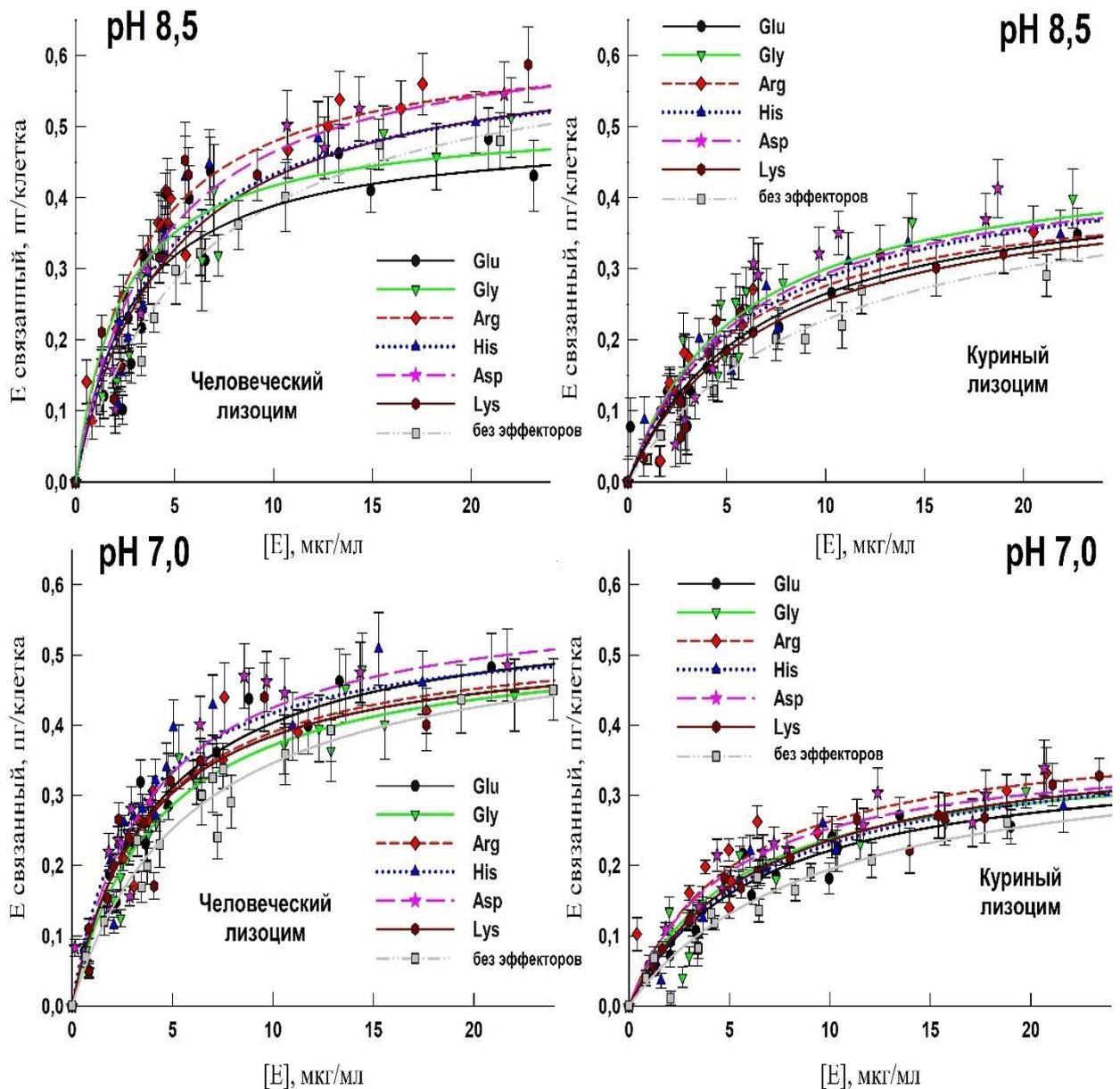


Рисунок 30. Изотермы адсорбции человеческого и куриного лизоцимов на клетках *E. coli* при pH 7(снизу) и 8,5 (сверху) в присутствии свободных аминокислот (согласно обозначениям на рисунке). Концентрация глицина 1,5 мМ, концентрация остальных аминокислот 5 мМ. Буферная смесь 0,01М Трис-MES с добавлением 25 мМ NaCl.

Значения сорбционных параметров представлены в табл. 9. Как в случае куриного, так и человеческого лизоцима мы можем видеть, что аминокислоты в пределах погрешности эксперимента не оказывают влияния на величину сорбционной емкости клеток по отношению к лизоциму, однако уменьшают значение его константы десорбции. Следовательно, заряженные аминокислоты и глицин не меняют число сайтов связывания лизоцима на бактериальной поверхности, при этом улучшая параметры связывания белка с поверхностью клеток. Заметим, что как в присутствии эффикторов, так и в их отсутствие

константы десорбции куриного лизоцима в 1,5–2,0 раза выше, чем у человеческого в аналогичных условиях, что говорит о том, что человеческий лизоцим прочнее связывается с поверхностью бактерий вне зависимости от присутствия эффекторов. Сходное влияние аминокислот на лизис клеток человеческим и куриным лизоцимами может объясняться как близостью химических структур лизоцимов, так и важной ролью субстрата в механизме действия эффекторов. Заметим, что уменьшение константы десорбции происходит одновременно с увеличением скорости ферментативного лизиса клеток. Это означает, что в присутствии аминокислот наблюдается улучшение продуктивной сорбции. Вспоминая ранее приведенный пример непродуктивной сорбции лизоцима в растворе с низкой осмимольностью, делаем вывод, что в зависимости от условий для клеток *E. coli* могут наблюдаться оба вида сорбции – продуктивная и непродуктивная. Заметим также, что значения максимальных сорбционных емкостей клеток, полученных при рН 7, ниже, чем для таковых, полученных при рН оптимуме активности. Кратность уменьшения константы десорбции в присутствии эффектора практически не различается для разных рН среды. Это справедливо для всех активирующих лизис клеток аминокислот, в том числе и для гистидина с pI 7,64, который имеет разный заряд при рН 7 и рН 8,5.

Таблица 9. Относительные увеличения скорости ферментативного лизиса клеток *E. coli* и параметры сорбции человеческого и куриного лизоцимов в присутствии глицина и заряженных аминокислот при pH 7 и 8,5.

Эффектор		нет	Gly	Glu	Asp	Arg	Lys	His	нет	Gly	Glu	Asp	Arg	Lys	His
pH		8,5							7,0						
Отношение скорости лизиса клеток в присутствии эффектора к скорости лизиса клеток в отсутствие эффектора	Ч	1	1,5 ±0,2	1,5 ±0,2	1,8 ±0,2	1,6 ±0,2	1,8 ±0,2	1,5 ±0,2	1	1,4 ±0,2	1,4 ±0,2	1,8 ±0,2	1,7 ±0,2	1,5 ±0,2	1,9 ±0,2
	К	1	1,9 ±0,2	1,6 ±0,2	1,6 ±0,2	1,6 ±0,2	1,5 ±0,2	1,5 ±0,2	1	1,8 ±0,2	1,5 ±0,2	1,9 ±0,3	1,9 ±0,2	1,4 ±0,2	1,5 ±0,2
Константа десорбции фермента на поверхности клеток $K_d, 10^{-7} \text{ M}$	Ч	3,8 ±0,7	2,7 ±0,6	2,8 ±0,5	2,4 ±0,6	1,9 ±0,2	2,2 ±0,4	2,5 ±0,3	3,6 ±0,6	2,5 ±0,4	2,5 ±0,4	2,4 ±0,5	2,2 ±0,5	2,2 ±0,5	1,9 ±0,5
	К	6,6 ±1,2	3,8 ±0,6	4,8 ±0,9	4,0 ±0,7	3,8 ±0,7	4,6 ±0,6	4,3 ±0,5	6,6 ±1,3	3,8 ±0,9	4,8 ±0,8	3,6 ±0,8	3,3 ±0,8	4,5 ±1,0	4,5 ±0,8
Максимальная сорбционная емкость клеток по лизоциму V_{max} , пг/клетка (сверху); аттомоль/клетка (снизу)	Ч	0,63 ±0,04	0,62 ±0,05	0,62 ±0,04	0,65 ±0,05	0,63 ±0,02	0,65 ±0,03	0,61 ±0,06	0,55 ±0,04	0,53 ±0,02	0,57 ±0,02	0,59 ±0,05	0,53 ±0,03	0,53 ±0,03	0,55 ±0,04
		<u>38±2</u>	<u>38±3</u>	<u>38±2</u>	<u>39±3</u>	<u>38±1</u>	<u>39±2</u>	<u>37±4</u>	<u>33±2</u>	<u>32±1</u>	<u>35±1</u>	<u>36±3</u>	<u>32±2</u>	<u>32±2</u>	<u>33±2</u>
	К	0,44 ±0,02	0,46 ±0,03	0,43 ±0,02	0,46 ±0,02	0,43 ±0,02	0,43 ±0,02	0,46 ±0,02	0,38 ±0,03	0,36 ±0,03	0,37 ±0,02	0,37 ±0,02	0,39 ±0,02	0,39 ±0,02	0,38 ±0,03
		<u>31±1</u>	<u>32±2</u>	<u>30±1</u>	<u>32±1</u>	<u>30±1</u>	<u>30±1</u>	<u>32±1</u>	<u>27±2</u>	<u>25±2</u>	<u>26±1</u>	<u>27±1</u>	<u>27±1</u>	<u>27±1</u>	<u>27±2</u>
Кратность уменьшения константы десорбции в присутствии данного эффектора	Ч	1	1,4 ±0,6	1,4 ±0,5	1,6 ±0,7	2,0 ±0,5	1,7 ±0,6	1,5 ±0,5	1	1,4 ±0,5	1,4 ±0,5	1,5 ±0,6	1,6 ±0,7	1,6 ±0,7	1,9 ±0,8
	К	1	1,7 ±0,6	1,4 ±0,5	1,7 ±0,6	1,7 ±0,6	1,4 ±0,5	1,5 ±0,4	1	1,8 ±0,8	1,5 ±0,8	2,0 ±0,9	1,9 ±0,8	1,5 ±0,6	1,5 ±0,8

Ч – человеческий лизоцим, К – куриный лизоцим. Концентрация глицина в таблице 1,5 мМ, концентрация остальных аминокислот 5 мМ

Чтобы определить вклад ионной силы в изменение сорбционных параметров лизоцима, мы провели лизис клеток лизоцимом в присутствии аминокислот в буферных растворах с разным содержанием соли. Предполагая схожий результат с человеческим лизоцимом, мы ограничились проведением эксперимента с куриным лизоцимом. Полученные изотермы адсорбции представлены на рис. 31.

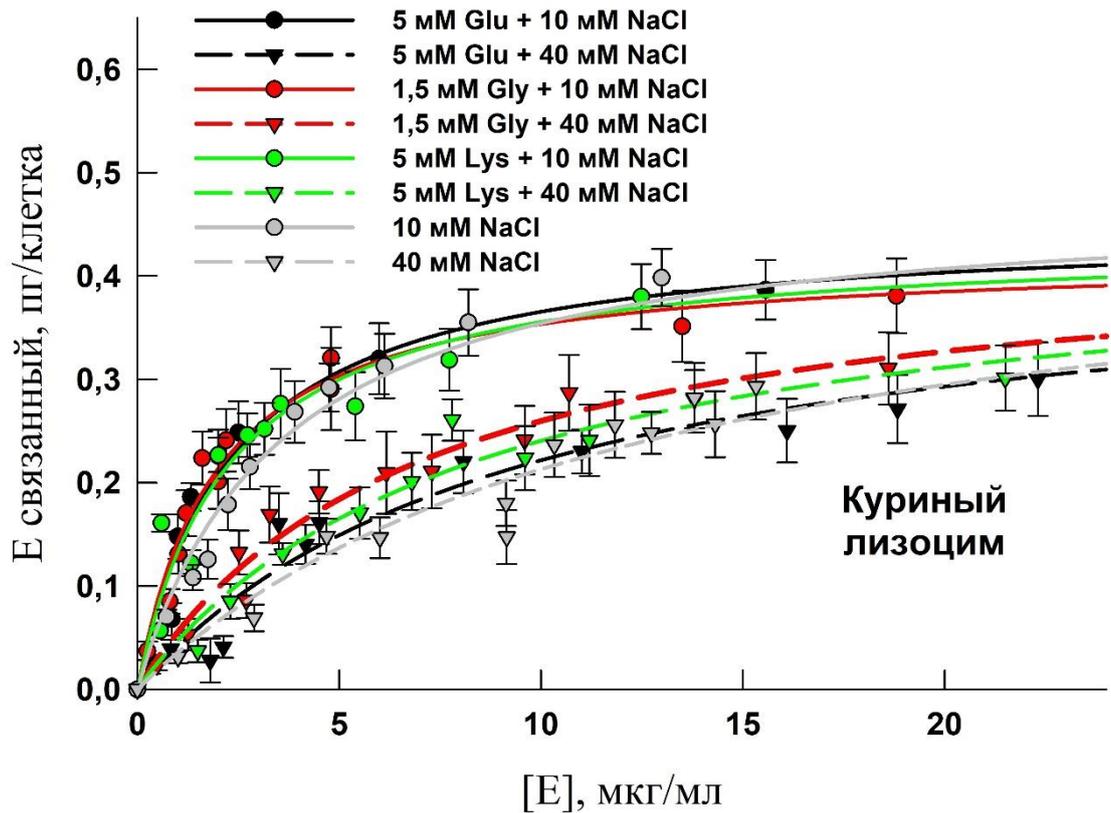


Рисунок 31. Изотермы адсорбции куриного лизоцима на клетках *E. coli* в присутствии свободных аминокислот и соли (согласно обозначениям на рисунке). Буферная смесь 0,01M Трис-НСl, рН 8,5.

Рассчитанные сорбционные параметры приведены в табл. 10.

Таблица 10. Адсорбция куриного лизоцима на клетках *E. coli* в присутствии свободных аминокислот и соли, рН 8,5. Сорбционные параметры, рассчитанные по уравнению Ленгмюра.

Эффектор	10 мМ NaCl	40 мМ NaCl	5 мМ Glu + 10 мМ NaCl	5 мМ Glu + 40 мМ NaCl	5 мМ Gly + 10 мМ NaCl	5 мМ Gly + 40 мМ NaCl	5 мМ Lys + 10 мМ NaCl	5 мМ Lys + 40 мМ NaCl
Константа десорбции фермента на поверхности клеток $K_d, 10^{-7} \text{ M}$	2,4 $\pm 0,5$	8,8 $\pm 1,7$	1,6 $\pm 0,4$	6,6 $\pm 1,3$	1,4 $\pm 0,4$	4,9 $\pm 0,8$	1,6 $\pm 0,4$	5,8 $\pm 1,0$
Максимальная сорбционная емкость клеток по лизоциму V_{max} , пг/клетка (сверху); аттомоль/клетка (снизу)	0,48 $\pm 0,04$	0,48 $\pm 0,03$	0,45 $\pm 0,03$	0,43 $\pm 0,03$	0,42 $\pm 0,04$	0,44 $\pm 0,04$	0,44 $\pm 0,03$	0,44 $\pm 0,03$
	<u>34\pm3</u>	<u>34\pm2</u>	<u>31\pm2</u>	<u>30\pm2</u>	<u>29\pm3</u>	<u>31\pm3</u>	<u>31\pm2</u>	<u>31\pm2</u>

Видим, что значения констант десорбции при 40 мМ NaCl всегда выше таковых для 10 мМ NaCl вне зависимости от наличия эффекторов. Полученные данные демонстрируют, что влияние ионной силы противоположно влиянию аминокислот. Заряженные аминокислоты, тем не менее, оказывают специфичное действие на адсорбцию лизоцима, уменьшая константу десорбции несмотря на то, что увеличение ионной силы вследствие растворения 5 мМ электролита должно было, наоборот, увеличить ее на 5 мМ. Это свидетельствует о принципиальном различии в действии общей осмимольности раствора на лизис клеток и аминокислот как специфичных активаторов лизиса бактерий. Отсюда же делаем вывод, что аминокислоты уменьшают константу десорбции в растворах с различной ионной силой, т.е., по-видимому, осмимольность раствора не определяет способность аминокислот усиливать взаимодействие между лизоцимом и поверхностью клетки.

4.13. Совместное влияние заряженных аминокислот и глицина на адсорбцию лизоцима на клетках *E. coli*

В разделе 4.4. были представлены активирующие эффекты смесей аминокислот, которые значительно превосходили действия аминокислот по отдельности. В предыдущем разделе мы выяснили, что активирующие действия аминокислот сопровождаются

уменьшением констант десорбции лизоцима, то есть повышением продуктивной сорбции. Мы предположили, что более высокие скорости лизиса клеток в присутствии нескольких аминокислот могут коррелировать с еще большим улучшением сорбционных параметров. Дабы проверить нашу гипотезу, мы измерили параметры адсорбции человеческого и куриного лизоцимов в присутствии комбинаций двух и трех аминокислот в буферном растворе с оптимальным значением pH и ионной силы. Во избежание перебора чрезмерно большого числа вариантов сочетаний трех аминокислот, как это было сделано ранее, мы исключили аспарат, предположив, что его действие сходно с действием глутамата (что, кстати, демонстрирует и величина активирующих эффектов в его присутствии, и параметры адсорбции лизоцима (см. табл. 9 (с. 107))). На рис. 32 представлены данные для смесей из двух эффекторов. Соответствующие сорбционные параметры приведены в табл. 11.

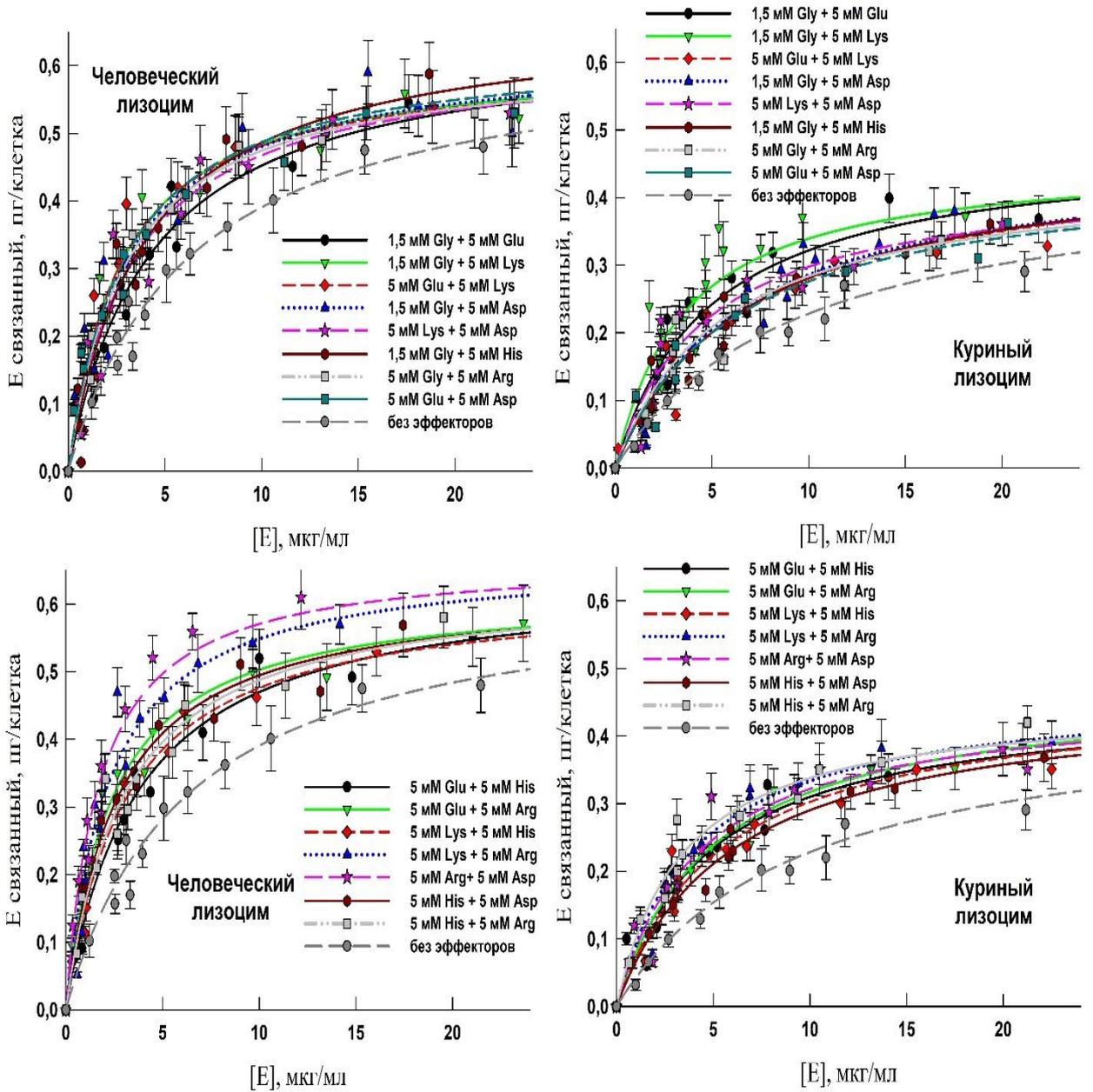


Рисунок 32. Изотермы адсорбции человеческого и куриного лизоцимов на клетках *E. coli* в присутствии сочетаний двух аминокислот (согласно обозначениям на рисунке). Буферная смесь 0,01M Трис-MES с добавлением 25 mM NaCl, pH 8,5.

Таблица 11. Сравнение относительных увеличений скорости ферментативного лизиса клеток *E. coli* и параметров сорбции человеческого и куриного лизоцимов в присутствии сочетаний двух аминокислот при pH 8,5.

Эффектор	Отношение скорости лизиса клеток в присутствии эффектора к скорости лизиса клеток в отсутствие эффектора		Константа десорбции $K_d, 10^{-7} M$		Максимальная сорбционная емкость клеток по лизоциму $V_{max}, \text{пг/клетка (слева); аттомоль/клетка (справа)}$				Кратность уменьшения константы десорбции в присутствии данного эффектора	
	Тип лизоцима									
	Ч	К	Ч	К	Ч		К		Ч	К
нет	1	1	$3,8 \pm 0,7$	$6,6 \pm 1,2$	$0,63 \pm 0,04$	38 ± 2	$0,44 \pm 0,02$	31 ± 1	1	1
Gly+Glu	$1,4 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,3$	$2,6 \pm 0,4$	$3,5 \pm 0,6$	$0,64 \pm 0,05$	39 ± 3	$0,48 \pm 0,03$	34 ± 2	$1,5 \pm 0,4$	$1,9 \pm 0,5$
Gly+Lys	$2,1 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,3$	$1,6 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,5$	$0,61 \pm 0,05$	37 ± 3	$0,46 \pm 0,03$	32 ± 2	$2,3 \pm 0,6$	$2,6 \pm 0,7$
Glu+Lys	$2,4 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,4$	$4,7 \pm 0,7$	$0,61 \pm 0,06$	37 ± 4	$0,47 \pm 0,03$	33 ± 2	$2,3 \pm 0,8$	$1,4 \pm 0,4$
Gly+Asp	$2,2 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,5$	$4,4 \pm 0,7$	$0,63 \pm 0,07$	38 ± 4	$0,47 \pm 0,04$	33 ± 3	$2,1 \pm 0,7$	$1,5 \pm 0,4$
Lys+Asp	$1,9 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,5$	$3,3 \pm 0,7$	$0,62 \pm 0,07$	38 ± 4	$0,44 \pm 0,05$	31 ± 3	$1,9 \pm 0,6$	$2,0 \pm 0,6$
Gly+His	$1,6 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,5$	$4,7 \pm 0,6$	$0,67 \pm 0,08$	41 ± 5	$0,47 \pm 0,03$	33 ± 2	$1,6 \pm 0,5$	$1,4 \pm 0,3$
Glu + Asp	$2,2 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,3$	$4,3 \pm 0,7$	$0,63 \pm 0,04$	38 ± 2	$0,44 \pm 0,03$	31 ± 2	$2,2 \pm 0,6$	$1,6 \pm 0,4$
Glu+ His	$1,8 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,3$	$2,2 \pm 0,3$	$3,4 \pm 0,5$	$0,64 \pm 0,03$	39 ± 2	$0,46 \pm 0,03$	32 ± 2	$1,7 \pm 0,4$	$2,0 \pm 0,5$
Gly + Arg	$2,1 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,2$	$3,9 \pm 0,7$	$0,62 \pm 0,03$	38 ± 2	$0,44 \pm 0,03$	31 ± 2	$2,1 \pm 0,5$	$1,7 \pm 0,5$
Glu + Arg	$2,6 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,2$	$3,5 \pm 0,4$	$0,62 \pm 0,04$	38 ± 2	$0,47 \pm 0,02$	33 ± 1	$2,6 \pm 0,6$	$1,9 \pm 0,4$
Lys +His	$2,1 \pm 0,3$	$1,6 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,2$	$3,8 \pm 0,6$	$0,62 \pm 0,04$	38 ± 2	$0,47 \pm 0,03$	33 ± 2	$2,0 \pm 0,5$	$1,7 \pm 0,4$
Lys + Arg	$3,1 \pm 0,4$	$2,1 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,3$	$2,9 \pm 0,4$	$0,67 \pm 0,08$	41 ± 5	$0,47 \pm 0,02$	33 ± 1	$2,9 \pm 0,8$	$2,3 \pm 0,5$
Arg + Asp	$3,3 \pm 0,4$	$2,4 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,2$	$3,0 \pm 0,6$	$0,67 \pm 0,04$	41 ± 2	$0,46 \pm 0,03$	32 ± 2	$3,7 \pm 0,9$	$2,2 \pm 0,6$
His + Asp	$2,4 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,5$	$0,63 \pm 0,05$	38 ± 3	$0,46 \pm 0,02$	32 ± 1	$2,3 \pm 0,7$	$1,6 \pm 0,3$
His + Arg	$2,3 \pm 0,3$	$2,6 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,3$	$0,63 \pm 0,05$	38 ± 2	$0,45 \pm 0,02$	31 ± 1	$2,1 \pm 0,6$	$2,7 \pm 0,6$

Ч – человеческий лизоцим, К – куриный лизоцим. Концентрация глицина в таблице 1,5 мМ, концентрация остальных аминокислот 5 мМ.

Вместе с тем на рис. 33 приведены данные для смесей из трех аминокислот, а вычисленные параметры адсорбции представлены в табл. 12.

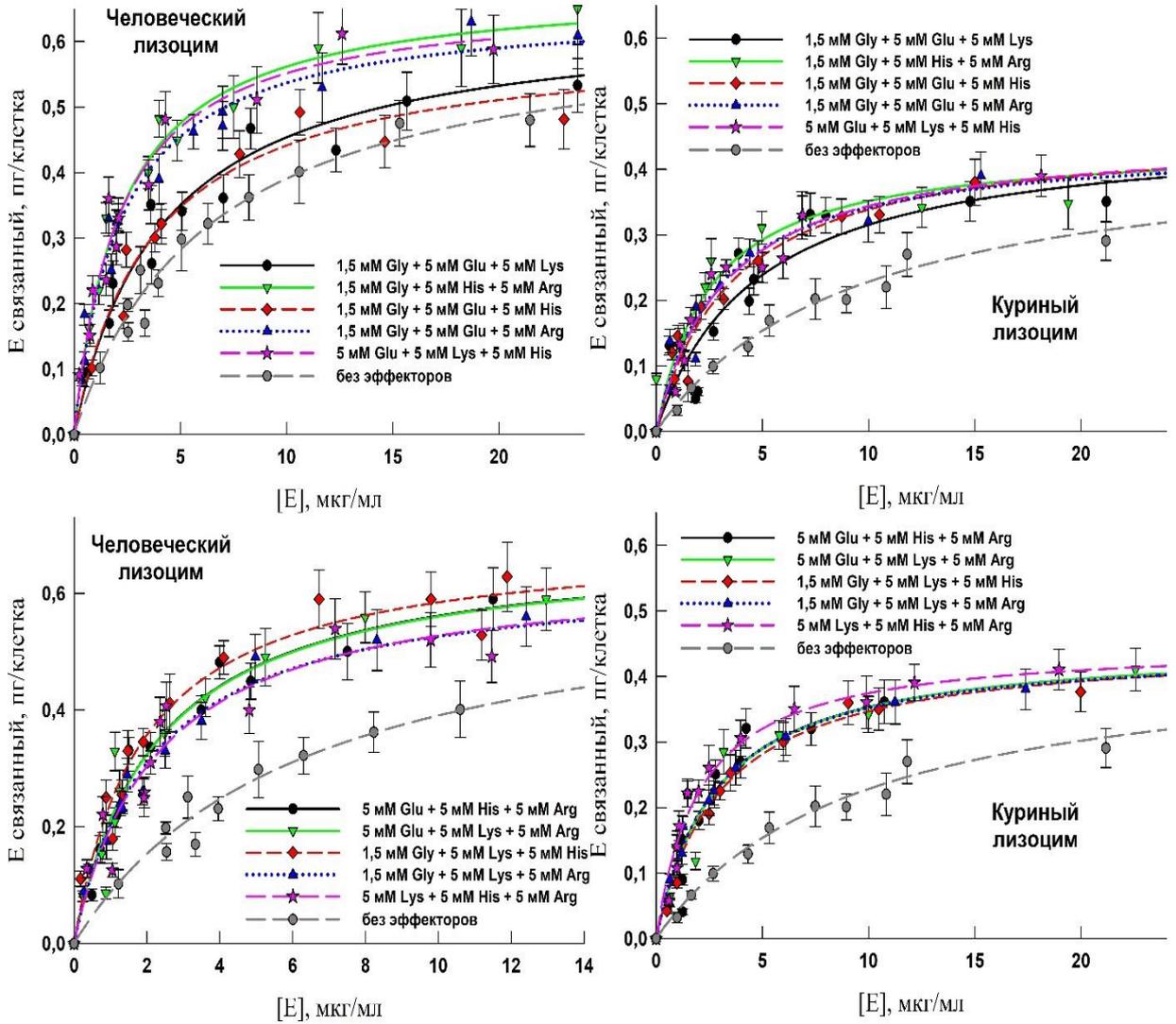


Рисунок 33. Изотермы адсорбции человеческого и куриного лизоцимов на клетках *E. coli* в присутствии сочетаний трех аминокислот (согласно обозначениям на рисунке). Буферная смесь 0,01M Трис-MES с добавлением 25 mM NaCl, pH 8,5.

Таблица 12. Сравнение относительных увеличений скорости ферментативного лизиса клеток *E. coli* и параметров сорбции человеческого и куриного лизоцимов в присутствии сочетаний трех аминокислот при pH 8,5.

Эффектор	Отношение скорости лизиса клеток в присутствии эффектора к скорости лизиса клеток в отсутствие эффектора		Константа десорбции $K_d, 10^{-7} \text{ M}$		Максимальная сорбционная емкость клеток по лизоциму V_{max} , пг/клетка (слева); аттомоль/клетка (справа)				Кратность уменьшения константы десорбции в присутствии данного эффектора	
	Тип лизоцима									
	Ч	К	Ч	К	Ч		К		Ч	К
нет	1	1	$3,8 \pm 0,7$	$6,6 \pm 1,2$	$0,63 \pm 0,04$	38 ± 2	$0,44 \pm 0,02$	31 ± 1	1	1
Lys+His+Arg	$3,1 \pm 0,4$	$4,8 \pm 0,6$	$1,4 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,2$	$0,65 \pm 0,08$	39 ± 5	$0,45 \pm 0,02$	31 ± 1	$2,7 \pm 0,9$	$4,8 \pm 1,1$
Gly+Lys+Arg	$2,8 \pm 0,4$	$3,4 \pm 0,4$	$1,3 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,2$	$0,64 \pm 0,05$	39 ± 3	$0,44 \pm 0,02$	31 ± 1	$3,0 \pm 0,7$	$3,5 \pm 0,6$
Gly +Lys+His	$3,4 \pm 0,5$	$3,6 \pm 0,5$	$1,2 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,2$	$0,69 \pm 0,06$	42 ± 4	$0,45 \pm 0,02$	31 ± 1	$3,3 \pm 1,0$	$3,2 \pm 0,6$
Glu+Lys+Arg	$2,9 \pm 0,3$	$3,5 \pm 0,5$	$1,3 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,4$	$0,68 \pm 0,08$	41 ± 5	$0,45 \pm 0,03$	31 ± 2	$3,4 \pm 1,0$	$3,4 \pm 1,0$
Glu+His+Arg	$3,8 \pm 0,5$	$3,9 \pm 0,5$	$0,9 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,4$	$0,68 \pm 0,04$	41 ± 2	$0,45 \pm 0,04$	31 ± 3	$3,4 \pm 1,0$	$3,0 \pm 0,8$
Glu+Lys+His	$3,2 \pm 0,4$	$2,6 \pm 0,4$	$1,3 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,4$	$0,67 \pm 0,06$	41 ± 4	$0,45 \pm 0,02$	31 ± 1	$3,0 \pm 0,8$	$3,3 \pm 0,9$
Gly+Glu+Arg	$2,6 \pm 0,3$	$3,3 \pm 0,4$	$1,3 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,4$	$0,65 \pm 0,04$	39 ± 2	$0,44 \pm 0,03$	31 ± 2	$3,3 \pm 0,9$	$2,6 \pm 0,6$
Gly+Glu+His	$1,7 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,4$	$2,2 \pm 0,5$	$2,5 \pm 0,4$	$0,60 \pm 0,06$	36 ± 4	$0,46 \pm 0,02$	32 ± 1	$2,6 \pm 0,6$	$3,8 \pm 1,2$
Gly+His+Arg	$2,6 \pm 0,3$	$3,6 \pm 0,5$	$1,3 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,4$	$0,69 \pm 0,05$	42 ± 3	$0,44 \pm 0,03$	31 ± 2	$3,8 \pm 1,2$	$2,0 \pm 0,8$
Gly+Glu+Lys	$1,7 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,5$	$3,3 \pm 0,9$	$0,64 \pm 0,06$	39 ± 4	$0,46 \pm 0,05$	32 ± 3	$2,0 \pm 0,8$	$2,0 \pm 0,8$

Ч – человеческий лизоцим, К – куриный лизоцим. Концентрация глицина в таблице 1,5 мМ, концентрация остальных аминокислот 5 мМ.

Как в присутствии парных, так и тройных сочетаний аминокислот мы видим, что константы десорбции уменьшаются сильнее, чем в случае присутствия аминокислот по отдельности. Для парных сочетаний константы десорбции в 1,5-3,7 меньше, чем в отсутствие эффекторов для человеческого лизоцима, и в 1,4-2,7 раз меньше для куриного лизоцима. Для тройных сочетаний – в 2,0-3,8 раз меньше для человеческого лизоцима и в 2,0-4,8 для куриного. Напомним, что в случае раздельного действия аминокислот в аналогичных условиях константы десорбции были меньше всего в 1,5-2,0 раза. Действительно, присутствие сразу нескольких аминокислот еще сильнее увеличивает скорость лизиса клеток и уменьшает константу десорбции лизоцима на клетках, чем присутствие только одной аминокислоты. Таким образом, наше предположение подтвердилось. Заметим так же, что сочетания аминокислот, в присутствии которых скорость лизиса клеток лизоцимом увеличилась наиболее существенно, кроме того, наиболее сильно уменьшили константу десорбции лизоцима. Так, в присутствии 5 мМ лизина + гистидина + аргинина скорость лизиса клеток *E. coli* возросла в 4,8 раз для куриного лизоцима, и вычисленная константа десорбции $(1,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$ М оказалась наименьшей из констант десорбции всех использованных тройных сочетаний аминокислот. Так же одно из наиболее существенных уменьшений константы десорбции (в 3,4 раза) в случае человеческого лизоцима наблюдалось для смеси 5 мМ глутамата + гистидина + аргинина, которая, как было показано ранее, оказывает наибольший активирующий эффект (увеличивает скорость лизиса клеток в 3,8 раз). Подобные корреляции наблюдаются и для двойных смесей. Например, смеси лизина и аргинина, и аргинина и аспартата, увеличивающие скорость лизиса клеток человеческим лизоцимом в 3,1 и 3,3 раз, соответственно, уменьшают константы десорбции также наиболее существенно (среди остальных двойных сочетаний): в 2,9 и даже в 3,7 раз, соответственно. И хотя турбидиметрический эксперимент дает ощутимую погрешность измеренных констант десорбции, многократное проведение однотипных экспериментов позволило утверждать, что, действительно, константы десорбции уменьшаются в присутствии аминокислот, причем, в целом, тем существеннее, чем сильнее аминокислоты активировали лизис клеток лизоцимом. Наличие корреляции между скоростью лизиса клеток и константой десорбции лизоцима иллюстрирует зависимость на рис. 34.

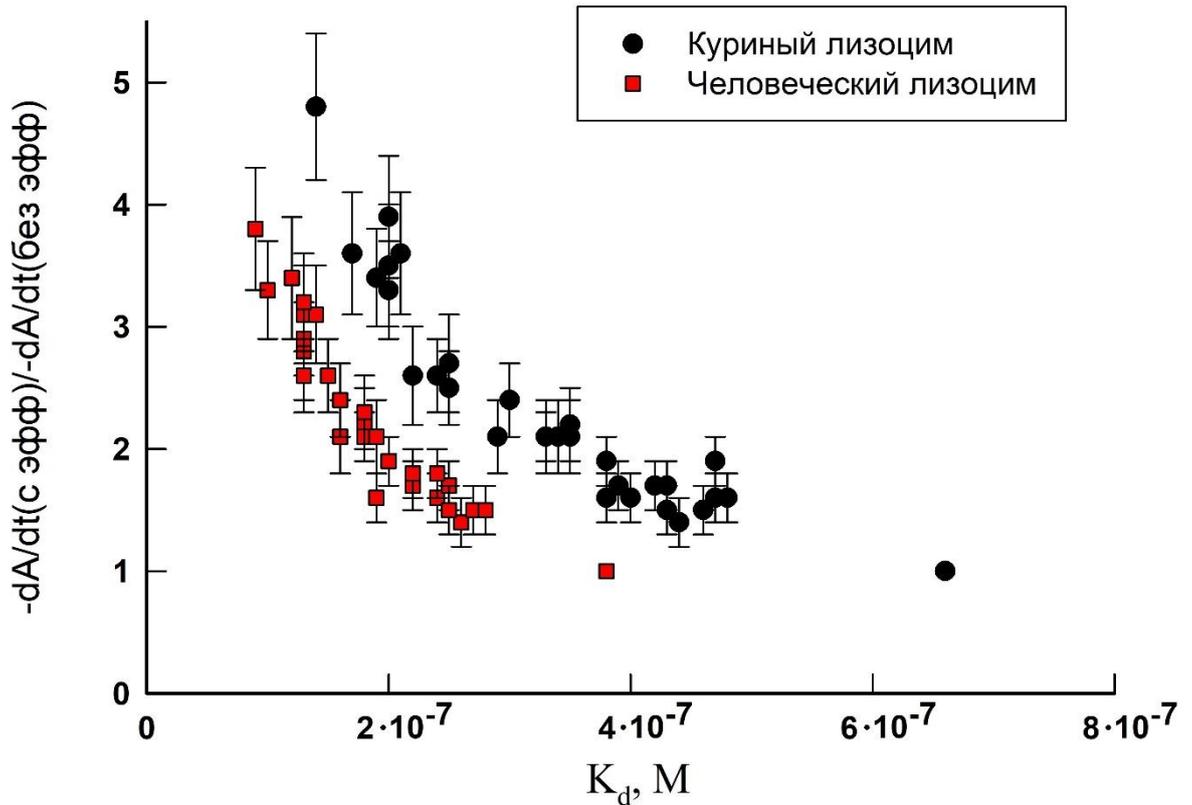


Рисунок 34. Зависимость отношения скорости лизиса клеток *E. coli* лизоцимом в присутствии эффекторов к скорости лизиса клеток в их отсутствие от константы десорбции лизоцима в присутствии эффектора (согласно обозначениям на рисунке). Буферная смесь 0,01M Трис-MES с добавлением 25 mM NaCl, pH 8,5.

Для построения зависимостей были использованы данные из табл. 9, 11 и 12 (pH 8,5). Вычисленное значение коэффициента ранговой корреляции Спирмена для человеческого лизоцима составило -0,966 с P-value $3,3 \cdot 10^{-19}$. Для куриного лизоцима коэффициент корреляции Спирмена оказался равен -0,934 с P-value $6,1 \cdot 10^{-15}$. Близкие к -1 значения коэффициентов корреляции вкупе с чрезвычайно низкими значениями P-value фактически гарантирует, что между величиной константы десорбции лизоцима и скоростью лизиса клеток лизоцимом существует математическая зависимость.

Таким образом, улучшение адсорбции фермента на клетках действительно вносит вклад в ускорение бактериального лизиса лизоцимом в присутствии аминокислот, являясь, таким образом, как минимум одним из механизмов увеличения эффективности работы лизоцима.

4.14. Влияние ионов кальция на бактериолитическую активность лизоцима

Помимо активаторов скорости лизиса клеток, существуют, наоборот, вещества, замедляющий этот процесс. В частности, к ним относятся ионы кальция, о которых было сказано в разделе 2.8.2. На рис. 35 наглядно представлено их влияние, оказываемое на скорость лизиса клеток *E. coli* человеческим и куриным лизоцимами при разных рН.

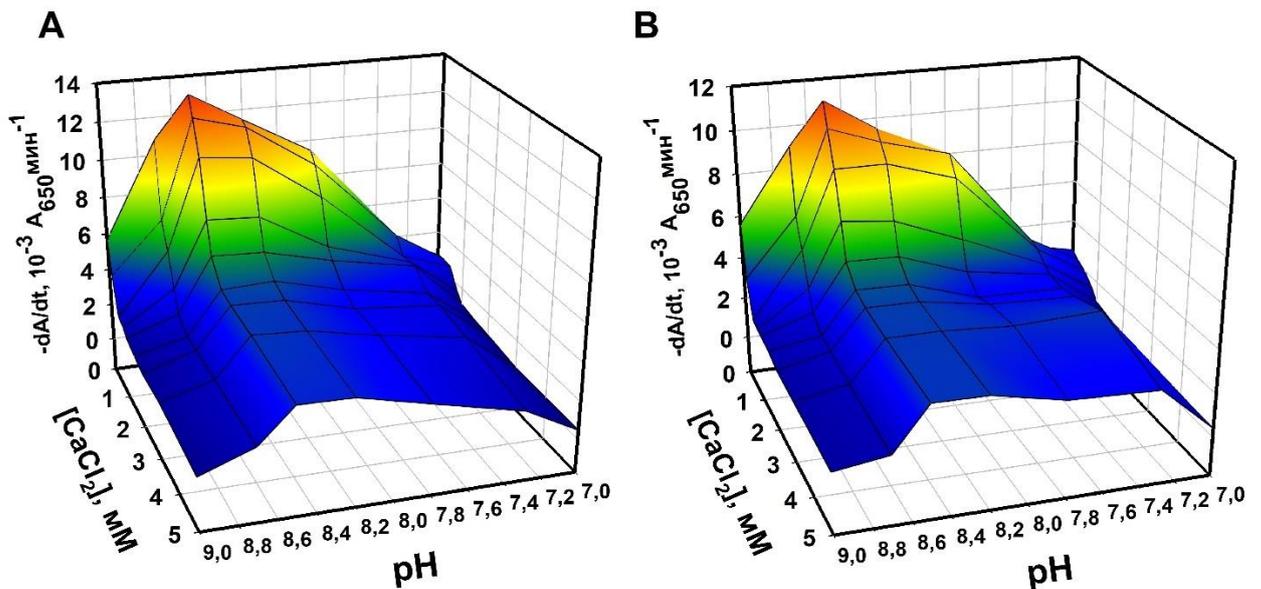


Рисунок 35. Зависимости скорости лизиса клеток *E. coli* в присутствии человеческого (А) и куриного (В) лизоцимов от рН и концентрации CaCl_2 . Буферная смесь 0,01 М Трис-MES с добавлением 25 мМ NaCl.

В настоящих экспериментах были использованы физиологические концентрации кальция (до 5 мМ) и диапазон рН (от 7 до 9), при которых бактерии *E. coli* наиболее стабильны. Видим, что для обоих лизоцимов наблюдается очень схожая картина. До 1 мМ концентрации ионов кальция наблюдается резкое падение скорости лизиса, после чего скорость лизиса клеток уменьшается незначительно. Вероятно, насыщение фермент-субстратного комплекса (системы фермент-клетка) ионами кальция достигается уже при 1 мМ CaCl_2 . Заметим, что рН оптимум активности фермента при добавлении эффектора не сдвигается, что, по всей видимости, свидетельствует о неизменности рКа ионогенных групп в активном центре лизоцима. При этом, крайне высокая степень сходства зависимостей полученных для обоих типов лизоцима говорит об идентичности механизма действия кальция.

Заметим, что полученные в настоящем эксперименте данные не могут объясняться простым изменением ионной силы. На рис. 15 (см. с. 67) продемонстрирована зависимость скорости лизиса клеток *E. coli* лизоцимом от концентрации NaCl и pH, а на рис. 22 (см. с. 78) приведена зависимость скорости лизиса клеток *E. coli* лизоцимом от концентрации NaCl при фиксированном pH 8,5. Из обоих графиков видно, что максимум скорости лизиса клеток достигается при значении соли 40 мМ. Если бы ионы кальция не оказывали специфического ингибирующего действия (т.е. действовали бы как простой электролит), то добавление 5 мМ CaCl₂ к буферному раствору с оптимальным значением pH и ионной силы (используемому в данном эксперименте) не привело бы к изменению скорости лизиса клеток (в пределах погрешности эксперимента). В действительности же при добавлении 5 мМ CaCl₂ наблюдается резкое падение скорости лизиса клеток в 3 раза.

Дабы удостовериться в том, что ионы кальция оказывают влияние на скорость лизиса не только клеток *E. coli*, но и грамположительных бактерий, мы измерили скорости лизиса клеток *P. megaterium* лизоцимом в присутствии разных концентраций ионов кальция в оптимальных для данного вида клеток значениях pH и осмимольности среды (см. рис. 36). Для наглядного сравнения на графиках также приведены зависимости скорости лизиса клеток *E. coli* от концентрации CaCl₂ в оптимальных для лизиса клеток *E. coli* условиях.

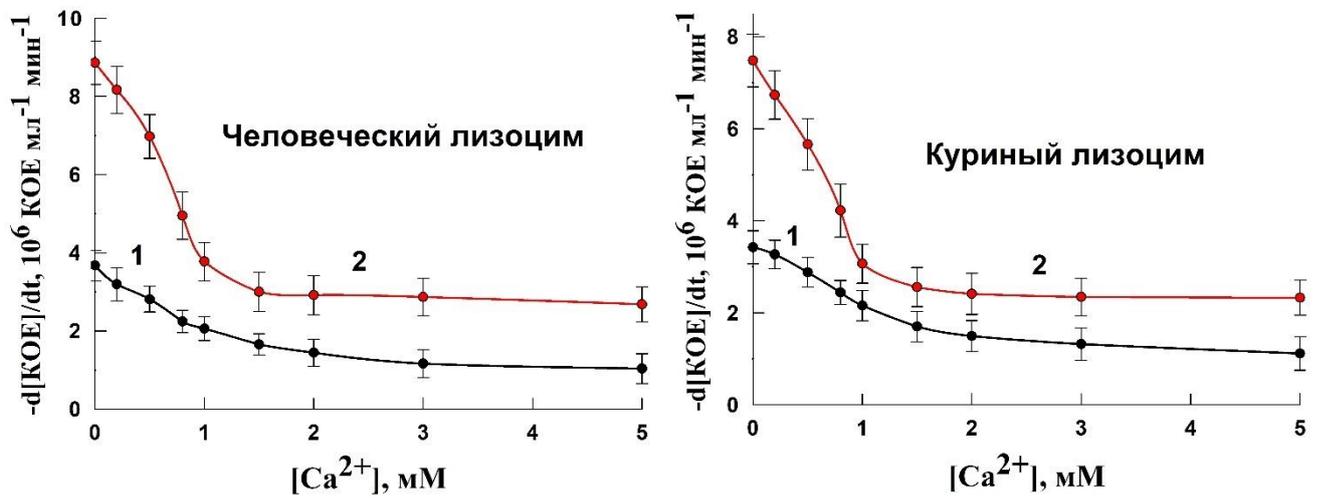


Рисунок 36. Зависимости скорости лизиса клеток *P. megaterium* ATCC 14581 (1) и *E. coli* KS-507 (2) куриным и человеческим лизоцимами от концентрации CaCl₂. Буферная смесь для *E. coli*: 0,01 М Трис-MES с добавлением 25 мМ NaCl, pH 8,5, концентрация лизоцима 0,1 мкг/мл. Буферная смесь для *P. megaterium*: 0,02 М Трис-HCl с добавлением 55 мМ NaCl, pH 8,0, концентрация лизоцима 0,5 мкг/мл.

И для человеческого, и для куриного лизоцима наблюдаются схожие зависимости скорости лизиса клеток от концентрации ионов кальция. В отличие от *E. coli* зависимости для *P. megaterium* не имеют участка с выраженным резким падением скорости лизиса клеток при малых концентрациях CaCl_2 . Тем не менее, ионы кальция также уменьшают скорость лизиса клеток *P. megaterium*. При этом изменение скорости лизиса клеток на участке малых концентраций ионов кальция (0-2 мМ) больше, чем при более высоких концентрациях (2-5 мМ). Вероятно, различие в кривизне зависимостей объясняется тем, что в случае *E. coli* кальций взаимодействует преимущественно с фосфатными группами липополисахаридов, а также с отрицательно заряженными участками белков и фосфолипидов на внешней мембране, а в случае с *P. megaterium* – с тейхоевыми кислотами на клеточной стенке. Однако наблюдающаяся в обоих случаях стабилизация клеточной стенки бактерии вкуче со связыванием ионов кальция с молекулой лизоцима приводит к общему замедлению скорости лизиса клеток. Таким образом, мы можем утверждать, что ингибирующий эффект ионов кальция не ограничивается клетками *E. coli* и имеет более общий характер.

4.15. Влияние ионов кальция на адсорбцию лизоцима на клетках *E. coli*

Мы предположили, что ионы кальция, как это было ранее показано на примере аминокислот, также оказывают влияние на адсорбцию лизоцима на поверхности бактерий. На рис. 37 показаны изотермы адсорбции человеческого и куриного лизоцимов при разных концентрациях ионов кальция.

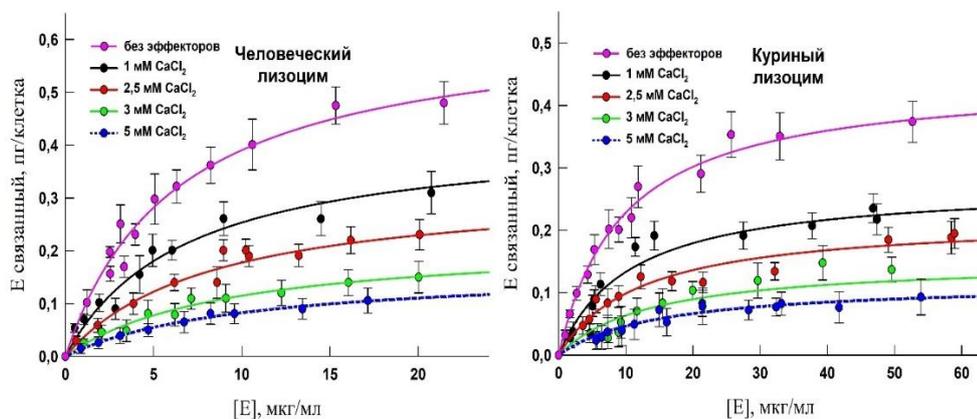


Рисунок 37. Изотермы адсорбции человеческого и куриного лизоцимов на клетках *E. coli* в присутствии ионов кальция (согласно обозначениям на рисунке). Буферная смесь 0,01М Трис-MES с добавлением 25 мМ NaCl, pH 8,5.

В табл. 13 представлены вычисленные по уравнению сорбции Ленгмюра соответствующие сорбционные параметры и относительные уменьшения скорости лизиса клеток *E. coli*, наблюдающиеся в присутствии CaCl_2 .

Таблица 13. Сравнение относительных уменьшений скорости ферментативного лизиса клеток *E. coli* и параметров сорбции человеческого и куриного лизоцимов в присутствии разных концентраций CaCl_2 при pH 8,5.

[CaCl ₂], mM		0	1	2,5	3	5
Отношение скорости лизиса клеток в отсутствие эффектора к скорости лизиса клеток в присутствии эффектора	Ч	1	2,3 ±0,2	3,1 ±0,4	3,1 ±0,5	3,3 ±0,4
	К	1	2,4 ±0,3	3,2 ±0,4	3,2 ±0,5	3,2 ±0,4
Константа десорбции фермента на поверхности клеток K _d , 10 ⁻⁷ M	Ч	3,8 ±0,7	4,1 ±0,7	4,9 ±0,8	5,5 ±1,0	6,1 ±1,1
	К	6,6 ±1,2	7,3 ±1,6	8,5 ±1,7	9,6 ±2,3	10,6 ±2,2
Максимальная сорбционная емкость клеток по лизоциму V _{max} , пг/клетка (сверху); <u>аттомоль/клетка (снизу)</u>	Ч	0,63 ±0,04	0,43 ±0,03	0,32 ±0,02	0,22 ±0,02	0,17 ±0,02
		<u>38±2</u>	<u>26±2</u>	<u>19±1</u>	<u>13±1</u>	<u>10±1</u>
	К	0,44 ±0,02	0,27 ±0,03	0,22 ±0,03	0,15 ±0,02	0,11 ±0,02
		<u>31±1</u>	<u>19±2</u>	<u>15±2</u>	<u>10±1</u>	<u>8±1</u>
Кратность уменьшения максимальной сорбционной емкости клеток в присутствии данного эффектора	Ч	1	1,5 ±0,4	2,0 ±0,5	2,9 ±0,8	3,7 ±1,0
	К	1	1,6 ±0,5	2,0 ±0,6	2,9 ±1,0	4,0 ±1,2

Ч – человеческий лизоцим, К – куриный лизоцим.

Видим, что как для человеческого, так и для куриного лизоцима максимальные сорбционные емкости клеток по отношению к лизоциму уменьшаются при увеличении концентрации ионов кальция. Этот эффект совершенно отличается от того, что мы наблюдали в присутствии аминокислот – в том случае, константы десорбции уменьшались при неизменной сорбционной емкости клеток. Максимальные сорбционные емкости клеток в присутствии 5 mM CaCl_2 уменьшаются до 3,7 раз по отношению к человеческому лизоциму и 4,0 по отношению к куриному. По-видимому, ионы кальция уменьшают количество мест посадки фермента на поверхности клеток, чего не наблюдалось ни в присутствии аминокислот, ни при изменении ионной силы. При этом уменьшение максимальной сорбционной емкости клеток сопровождается уменьшением скорости лизиса клеток, следовательно понижается доля продуктивной сорбции. Понижение максимальной сорбционной емкости клеток по отношению к лизоциму в присутствии ионов кальция нельзя объяснить простым изменением ионной силы буферного

раствора, так как по мере увеличения концентрации электролита максимальная сорбционная емкость остается неизменной (см. табл. 8 (с. 103)). При добавлении 5 мМ CaCl₂ константы десорбции увеличиваются в 1,5 раза. В отличие от уменьшения максимальной сорбционной емкости клеток, данный эффект вполне можно объяснить увеличением ионной силы буферного раствора, т.е. ионы кальция не оказывают какого-то специфического влияния на константу десорбции, а действуют ровно так же, как добавка NaCl. Так, ионная сила раствора при добавлении 5 мМ CaCl₂ изменяется с 35 мМ (в отсутствие ионов кальция) до 50 мМ (при 5 мМ CaCl₂). Это подтверждают данные табл. 8 (см. с. 103). Константы десорбции для ионной силы 50 мМ находятся между $(8,7 \pm 1,7) \cdot 10^{-7}$ М и $(16,6 \pm 2,9) \cdot 10^{-7}$ М для куриного лизоцима и между $(5,0 \pm 1,2) \cdot 10^{-7}$ М и $(12,4 \pm 2,4) \cdot 10^{-7}$ М для человеческого лизоцима. Полученные величины констант десорбции куриного и человеческого лизоцимов в присутствии 5 мМ CaCl₂ укладываются в упомянутые диапазоны (см. табл. 13). Заметим также, что, в то время как отношение скорости лизиса клеток в отсутствие ионов кальция к скорости лизиса клеток в их присутствии остаются практически неизменными начиная с концентраций CaCl₂, больших 1 мМ, максимальная сорбционная емкость клеток продолжает падение и при более высоких концентрациях ионов кальция. Это наводит на мысль, что ингибирующее действие кальция не ограничивается влиянием на максимальную сорбционную емкость клеток по отношению к лизоциму, однако не умаляет вклад этого фактора в наблюдаемую скорость лизиса.

4.16. Совместное влияние ионов кальция и свободных аминокислот на адсорбцию лизоцима на клетках *E. coli*

В предыдущих разделах мы показали, что заряженные аминокислоты и глицин увеличивают скорость лизиса клеток *E. coli*, а ионы кальция – уменьшают. Однако особый интерес как с практической, так и с теоретической точки зрения представляет совместное действие эффекторов, оказывающих противоположное влияние на бактериальный лизис. В первую очередь, это позволит выяснить, способны ли аминокислоты ускорять лизис клеток в присутствии стабилизирующих клетки веществ, что важно как для понимания возможностей регуляции работы фермента *in vivo*, так и для разработки лекарственных препаратов на основе лизоцима.

На рис. 38 (см. с. 123) представлены изотермы адсорбции лизоцима в присутствии парных сочетаний аминокислот и ионов кальция при оптимальных значениях кислотности и осмоллярности среды. Мы использовали концентрации эффекторов, при которых наблюдались наибольшие изменения скорости лизиса клеток. В табл. 14 (см. с. 124) приведены

соответствующие сорбционные параметры лизоцима и относительные изменения скоростей лизиса клеток. Видим, что в присутствии парных сочетаний аминокислот и ионов кальция как для человеческого, так и для куриного лизоцима происходит изменение обоих параметров сорбции: уменьшается константа десорбции лизоцима за счет действия аминокислот и уменьшается максимальная сорбционная емкость клеток за счет влияния ионов кальция. Как мы видим из табл. 14 изменение сорбционных параметров для парных сочетаний происходит также, как при раздельном действии эфффекторов, т.е. независимо друг от друга. Например, значение максимальной сорбционной емкости клеток в присутствии 5 мМ CaCl₂ составляет $0,11 \pm 0,02$ и $0,17 \pm 0,02$ пг/клетка для куриного и человеческого лизоцимов, соответственно, а значения максимальных сорбционных емкостей для парных сочетаний кальция и глицина составляют $0,13 \pm 0,02$ и $0,17 \pm 0,03$ пг/клетка, т.е. не изменяется при добавлении аминокислот в пределах погрешности эксперимента. Одновременно с тем константы десорбции для того же парного сочетания понижаются с $(10,6 \pm 2,2) \cdot 10^{-7}$ и $(6,1 \pm 1,1) \cdot 10^{-7}$ М (для 5 мМ CaCl₂) до $(8,0 \pm 2,0) \cdot 10^{-7}$ и $(4,2 \pm 0,6) \cdot 10^{-7}$ М, соответственно. При этом значения констант десорбции для парных сочетаний немногим выше по сравнению с эфффектом, оказываемым аминокислотами в отсутствие ионов кальция. Это происходит за счет добавления электролита (5 мМ CaCl₂). Таким образом, ионы кальция и аминокислот «не чувствуют» присутствие друг друга, что говорит о различии в мишенях для этих эфффекторов.

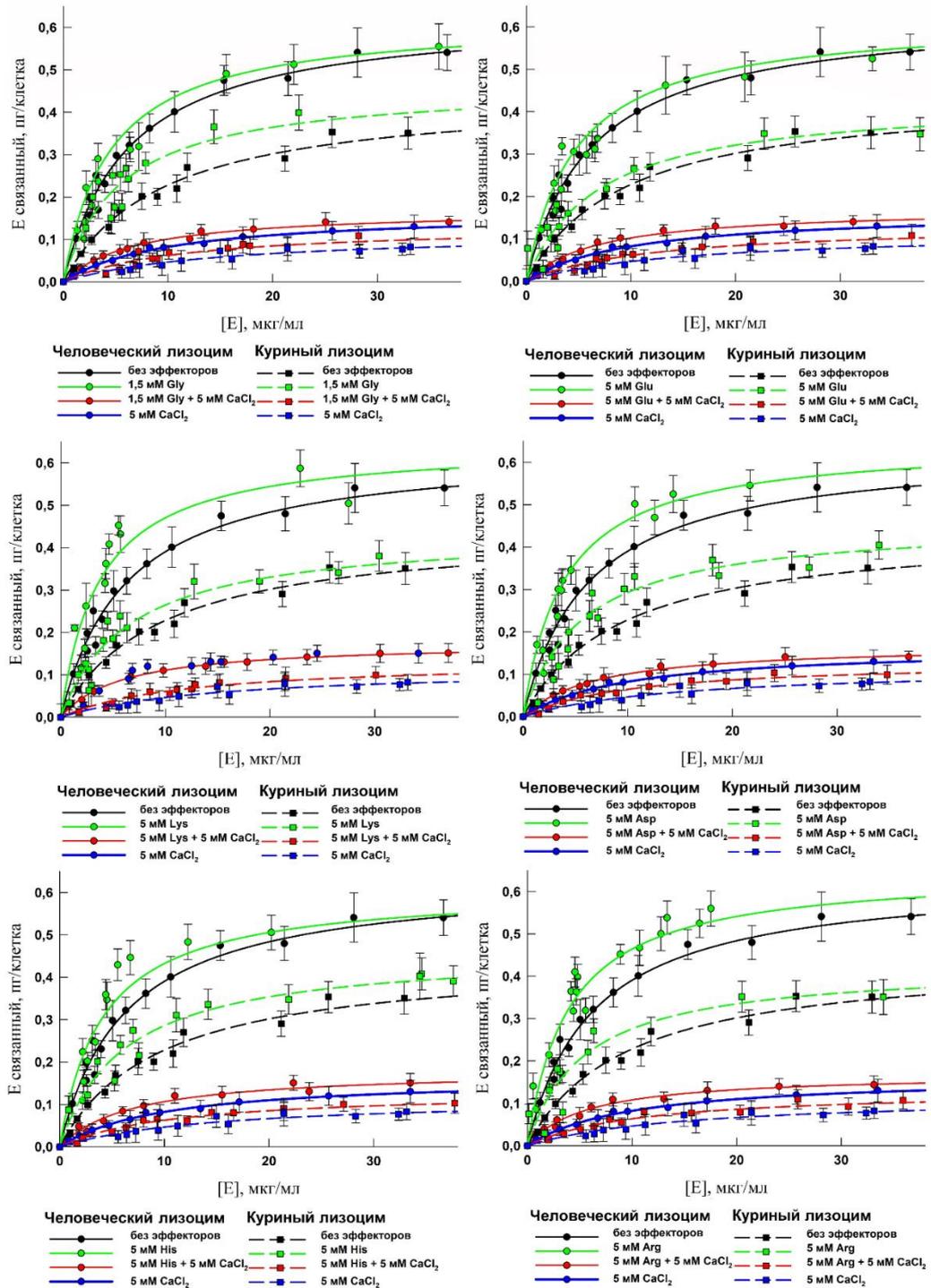


Рисунок 38. Изотермы адсорбции человеческого и куриного лизоцимов на клетках *E. coli* в присутствии ионов кальция и свободных аминокислот (согласно обозначениям на рисунке). Буферная смесь 0,01M Трис-MES с добавлением 25 mM NaCl, pH 8,5.

Таблица 14. Адсорбция человеческого и куриного лизоцимов на клетках *E. coli* в присутствии свободных аминокислот и CaCl_2 , pH 8,5. Отношения скоростей лизиса клеток и сорбционные параметры, рассчитанные по уравнению Ленгмюра.

Эффектор	A (без эффектора) / A (с эффектором)		$K_d, 10^{-7}$ M	V_{\max} , пг/клетка (слева); аттомоль/клетка (справа)		K_d (без эффектора) / K_d (с эффектором)	V_{\max} (без эффектора) / V_{\max} (с эффектором)
	К	Ч					
нет	К	1	$6,6 \pm 1,2$	$0,44 \pm 0,02$	31 ± 1	1	1
	Ч	1	$3,8 \pm 0,7$	$0,63 \pm 0,04$	38 ± 2	1	1
CaCl_2	К	$3,2 \pm 0,4$	$10,6 \pm 2,2$	$0,11 \pm 0,02$	8 ± 1	$0,6 \pm 0,2$	$4,0 \pm 1,2$
	Ч	$3,3 \pm 0,4$	$6,1 \pm 1,1$	$0,17 \pm 0,02$	10 ± 1	$0,6 \pm 0,2$	$3,7 \pm 1,0$
Gly	К	$0,5 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,6$	$0,46 \pm 0,03$	32 ± 2	$1,7 \pm 0,6$	≈ 1
	Ч	$0,7 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,6$	$0,62 \pm 0,05$	38 ± 3	$1,4 \pm 0,6$	≈ 1
Gly + CaCl_2	К	$1,7 \pm 0,3$	$8,0 \pm 2,0$	$0,13 \pm 0,02$	9 ± 1	$0,8 \pm 0,3$	$3,4 \pm 0,7$
	Ч	$2,4 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,6$	$0,17 \pm 0,03$	10 ± 2	$0,9 \pm 0,2$	$3,7 \pm 0,9$
Glu	К	$0,7 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,9$	$0,43 \pm 0,02$	30 ± 1	$1,4 \pm 0,5$	≈ 1
	Ч	$0,7 \pm 0,1$	$2,8 \pm 0,5$	$0,62 \pm 0,04$	38 ± 2	$1,4 \pm 0,5$	≈ 1
Glu + CaCl_2	К	$2,3 \pm 0,3$	$8,5 \pm 1,5$	$0,13 \pm 0,02$	9 ± 1	$0,8 \pm 0,2$	$3,4 \pm 0,7$
	Ч	$2,3 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,7$	$0,17 \pm 0,03$	10 ± 2	$0,9 \pm 0,2$	$3,7 \pm 0,9$
Lys	К	$0,6 \pm 0,1$	$4,6 \pm 0,6$	$0,43 \pm 0,02$	30 ± 1	$1,4 \pm 0,5$	≈ 1
	Ч	$0,5 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,4$	$0,65 \pm 0,03$	39 ± 2	$1,7 \pm 0,6$	≈ 1
Lys + CaCl_2	К	$2,1 \pm 0,3$	$8,5 \pm 1,6$	$0,13 \pm 0,02$	9 ± 1	$0,8 \pm 0,2$	$3,4 \pm 0,7$
	Ч	$1,8 \pm 0,3$	$3,6 \pm 0,5$	$0,18 \pm 0,03$	11 ± 2	$1,1 \pm 0,3$	$3,5 \pm 0,8$
Asp	К	$0,6 \pm 0,1$	$4,0 \pm 0,7$	$0,46 \pm 0,02$	32 ± 1	$1,7 \pm 0,6$	≈ 1
	Ч	$0,5 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,6$	$0,65 \pm 0,05$	39 ± 3	$1,6 \pm 0,7$	≈ 1
Asp + CaCl_2	К	$2,0 \pm 0,3$	$7,2 \pm 1,4$	$0,13 \pm 0,02$	9 ± 1	$0,9 \pm 0,3$	$3,4 \pm 0,7$
	Ч	$1,8 \pm 0,3$	$3,6 \pm 0,8$	$0,18 \pm 0,03$	11 ± 2	$1,1 \pm 0,3$	$3,5 \pm 0,8$
His	К	$0,7 \pm 0,1$	$4,3 \pm 0,5$	$0,46 \pm 0,02$	32 ± 1	$1,5 \pm 0,4$	≈ 1
	Ч	$0,7 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,3$	$0,61 \pm 0,06$	37 ± 4	$1,5 \pm 0,5$	≈ 1
His + CaCl_2	К	$2,2 \pm 0,3$	$7,7 \pm 1,5$	$0,13 \pm 0,02$	9 ± 1	$0,9 \pm 0,2$	$3,4 \pm 0,7$
	Ч	$2,3 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,6$	$0,18 \pm 0,03$	11 ± 2	$0,9 \pm 0,2$	$3,5 \pm 0,8$
Arg	К	$0,7 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,7$	$0,43 \pm 0,02$	30 ± 1	$1,7 \pm 0,6$	≈ 1
	Ч	$0,6 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,2$	$0,63 \pm 0,02$	38 ± 1	$2,0 \pm 0,5$	≈ 1
Arg + CaCl_2	К	$2,3 \pm 0,3$	$7,5 \pm 1,6$	$0,13 \pm 0,02$	9 ± 1	$0,9 \pm 0,3$	$3,4 \pm 0,7$
	Ч	$2,0 \pm 0,3$	$3,5 \pm 0,7$	$0,17 \pm 0,03$	10 ± 2	$1,1 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,9$

A – активность лизоцима (скорость лизиса клеток лизоцимом). Концентрация глицина в таблице 1,5 мМ, концентрация остальных аминокислот 5 мМ.

Обратим внимание теперь на изменение скорости лизиса клеток при одновременном присутствии аминокислоты и ионов кальция. Видим, что во всех случаях наблюдается примерно 2-х кратное уменьшение скорости лизиса клеток. Активирующего действия одной аминокислоты оказывается недостаточным, чтобы превзойти ингибирующее действие 5 мМ CaCl₂. Однако если сравнить эти значения со скоростью лизиса клеток в присутствии 5 мМ CaCl₂ в отсутствие аминокислот, то видим, что добавка аминокислот увеличивает скорость лизиса в среднем на 50%. Заметим, однако, что в организме концентрация ионов кальция обычно ниже 5 мМ и составляет в среднем 0,5-2 мМ, в зависимости от конкретной физиологической жидкости. Таким образом, аминокислоты способны оказывать ускорение скорости лизиса даже в присутствии таких сильных стабилизирующих клетки факторов, как ионы кальция.

Итак, мы выяснили, что присутствия одной аминокислоты недостаточно для того, чтобы скорость лизиса клеток лизоцимом увеличилась в присутствии 5 мМ ионов кальция. С практической точки зрения было важно проверить, способно ли добавление подобранных нами смесей аминокислот вызвать увеличение скорости лизиса клеток лизоцимом в присутствии ионов кальция. На рис. 39 приведены изотермы адсорбции лизоцима в присутствии 5 мМ CaCl₂ и тройных сочетаний аминокислот, продемонстрировавших наиболее высокие скорости лизиса клеток. В данной серии экспериментов мы использовали буферный раствор с оптимальным значением кислотности (рН 8,5) и низкой ионной силой, поскольку в таких условиях были обнаружены наибольшие относительные увеличения скорости лизиса клеток (см. рис. 22 (с. 78)).

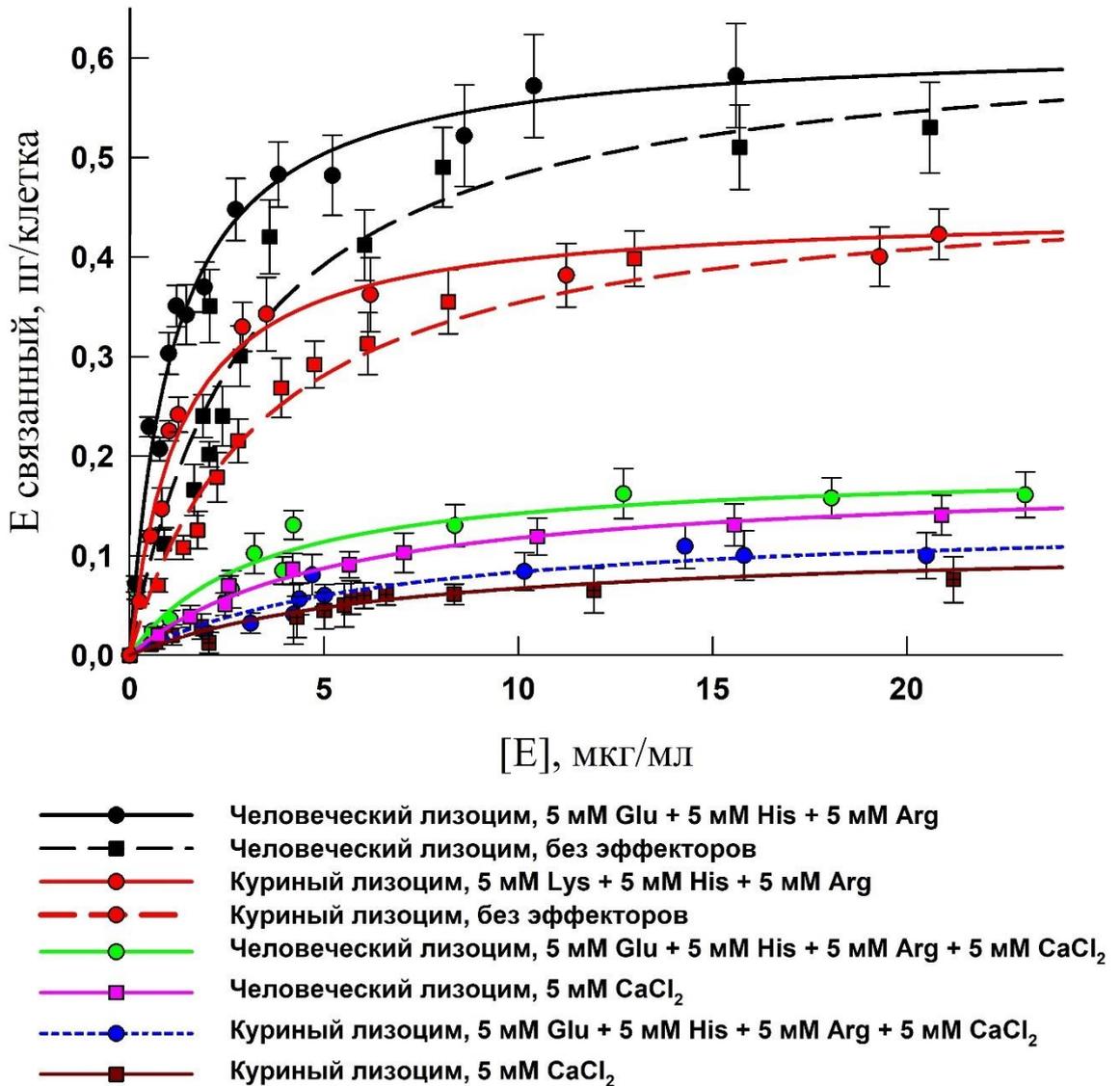


Рисунок 39. Изотермы адсорбции человеческого и куриного лизоцимов на клетках *E. coli* в присутствии сочетаний аминокислот и CaCl₂ (согласно обозначениям на рисунке). Буферная смесь 0,01М Трис-НСl с добавлением 10 мМ NaCl, pH 8,5.

В табл. 15 представлены вычисленные параметры адсорбции и измеренные относительные изменения скоростей лизиса клеток.

Таблица 15. Сравнение изменения скоростей ферментативного лизиса клеток *E. coli* и параметров сорбции человеческого и куриного лизоцимов при одновременном присутствии трех аминокислот и CaCl_2 при pH 8,5.

Эффектор	Тип лизоцима	Отношение скорости лизиса клеток в присутствии эффектора к скорости лизиса клеток в отсутствие эффектора	Константа десорбции фермента на поверхности клеток $K_d, 10^{-7} \text{ M}$	Максимальная сорбционная емкость клеток по лизоциму V_{max} , пг/клетка (слева); <u>аттомоль/клетка (справа)</u>		Отношение константы десорбции в отсутствие эффектора к константе десорбции в присутствии эффектора	Отношение максимальной сорбционной емкости в отсутствие эффектора к максимальной сорбционной емкости в присутствии эффектора
				\pm			
нет	Ч	1	$1,8 \pm 0,3$	$0,62 \pm 0,05$	<u>38 ± 3</u>	1	1
нет	К	1	$2,4 \pm 0,5$	$0,48 \pm 0,04$	<u>34 ± 3</u>	1	1
Glu, His, Arg, CaCl_2	Ч	$1,5 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,3$	$0,19 \pm 0,03$	<u>12 ± 2</u>	$0,9 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,8$
Lys, His, Arg, CaCl_2	К	$1,9 \pm 0,3$	$4,0 \pm 1,0$	$0,14 \pm 0,02$	<u>10 ± 1</u>	$0,5 \pm 0,2$	$3,4 \pm 0,8$
Glu, His, Arg	Ч	$7,7 \pm 1,0$	$0,7 \pm 0,3$	$0,62 \pm 0,06$	<u>38 ± 4</u>	$2,5 \pm 1,5$	$1,0 \pm 0,2$
Lys, His, Arg	К	$10,3 \pm 1,4$	$0,9 \pm 0,3$	$0,45 \pm 0,03$	<u>31 ± 2</u>	$2,7 \pm 1,7$	$1,1 \pm 0,2$
CaCl_2	Ч	$0,3 \pm 0,1$	$3,1 \pm 0,6$	$0,18 \pm 0,03$	<u>11 ± 2</u>	$0,6 \pm 0,2$	$3,4 \pm 1,1$
CaCl_2	К	$0,3 \pm 0,1$	$4,8 \pm 1,0$	$0,11 \pm 0,02$	<u>8 ± 1</u>	$0,5 \pm 0,2$	$4,4 \pm 1,5$

Ч – человеческий лизоцим, К – куриный лизоцим. Концентрация всех эффекторов 5 мМ.

Итак, из табл. 15 видим, что тройное сочетание аминокислот в присутствии ионов кальция уменьшает константы десорбции лизоцима, оставляя максимальную сорбционную емкость клеток такой же (в пределах погрешности), как в присутствии 5 мМ ионов кальция в отсутствие аминокислот. Уменьшение констант десорбции в присутствии тройных сочетаний аминокислот и кальция, ожидаемо, происходят в большей степени, чем для парных сочетаний аминокислоты и кальция (сравните значения из табл. 15 и 14). Наиболее значимым с практической точки зрения является экспериментальный факт, что смесь из трех аминокислот оказалась способна производить увеличение скорости лизиса клеток (в 1,5-1,9 раз) даже в присутствии высокой

концентрации CaCl_2 (5 мМ, выше физиологической в биологических жидкостях). Как показано в табл. 16, смеси из четырех и пяти аминокислот в подобранных нами концентрациях также увеличивает скорость лизиса клеток в присутствии 5 мМ CaCl_2 , как при низкой ионной силе, так и в оптимальных для лизиса клеток *E. coli* лизоцимом условиях.

Таблица 16. Сравнение изменения скоростей лизиса клеток *E. coli* человеческим и куриным лизоцимами в присутствии смесей аминокислот и CaCl_2 в разных условиях.

Тип лизоцима	Эффекторы	Отношение скорости лизиса клеток в присутствии эффектора к скорости лизиса клеток в отсутствие эффектора	
Человеческий	Glu, His, Arg, CaCl_2	1,4±0,2*	1,5±0,2**
Куриный	Lys, His, Arg, CaCl_2	1,7±0,2*	1,9±0,3**
Человеческий	Lys, Glu, His, Arg, CaCl_2	1,5±0,2*	1,7±0,2**
Куриный	Lys, Glu, His, Arg, CaCl_2	1,6±0,2*	1,7±0,2**
Человеческий	Gly, Lys, Glu, His, Arg, CaCl_2	1,6±0,2*	1,6±0,2**
Куриный	Gly, Lys, Glu, His, Arg, CaCl_2	1,5±0,2*	1,8±0,3**

Звездочкой помечены значения отношений скоростей лизиса, полученные в буферном растворе состава: 0,01 М Трис-MES с добавлением 25 мМ NaCl, pH 8,5. Двумя звездочками помечены значения отношений скоростей лизиса, полученные в буферном растворе состава: 0,01 М Трис-HCl с добавлением 10 NaCl, pH 8,5. Концентрация глицина 1,5 мМ, концентрация остальных эффекторов 5 мМ.

Таким образом, подобранные нами сочетания аминокислот могут ускорять ферментативный лизис клеток не только в среде с разным pH и осмимольностью, но и в присутствии компонент, которые сами по себе препятствуют протеканию лизиса клеток лизоцимом.

4.17. Лизис клеток с удаленным поверхностным кальцием

Существование зависимости скорости лизиса клеток лизоцимом от концентрации ионов кальция позволила нам оценить число ионов кальция, способных связаться с поверхностью одной клетки *E. coli*, что не было выполнено исследователями ранее. Для этого мы провели эксперименты с «декальцинированными» клетками, то есть с бактериями, у которых поверхностные ионы кальция и магния были удалены посредством предобработки раствором ЭДТА. О методике удаления поверхностного кальция у бактерий с помощью ЭДТА более

подробно сказано в разделе 2.8.2 и «Материалах и методах». Ранее было показано, что ЭДТА не только сам по себе лизирует клетки, но и ускоряет лизис клеток лизоцимом [18]. Чтобы подобрать оптимальную концентрацию ЭДТА для предобработки клеток и проверить наличие активации лизоцима для нашего штамма мы измерили скорость лизиса клеток *E. coli* как в присутствии ЭДТА, так и в присутствии сочетания ЭДТА и лизоцима. На рис. 40 представлены зависимости, полученные в оптимальных для лизиса *E. coli* условиях.

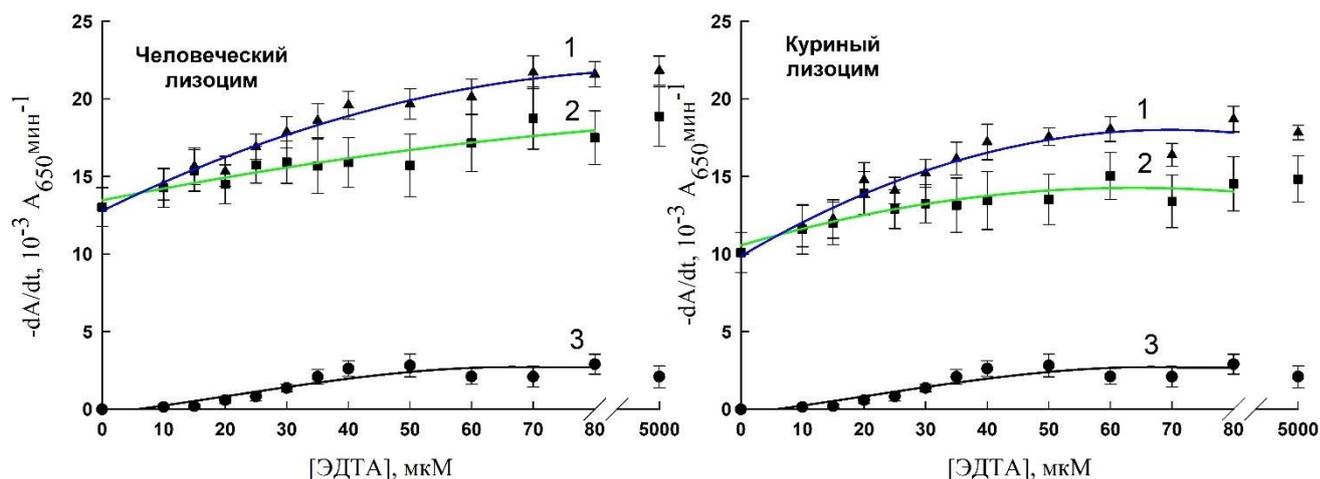


Рисунок 40. Зависимости скорости ферментативного лизиса клеток *E. coli* от концентрации ЭДТА. 1 – лизис ЭДТА, 2 – лизис лизоцимом в присутствии ЭДТА за вычетом лизиса ЭДТА, 3 – лизис лизоцимом в присутствии ЭДТА. Буферная смесь 0,01M Трис-MES с добавлением 25 мМ NaCl, pH 8,5.

Видим, что как для человеческого, так и для куриного лизоцима в присутствии ЭДТА происходит увеличение скорости лизиса клеток. При концентрациях ЭДТА больших 60 мкМ скорость лизиса клеток в присутствии лизоцима и ЭДТА выходит на плато. Скорость лизиса клеток лизоцимом в присутствии ЭДТА концентраций выше 60 мкМ оказывается в 1,4 раза больше, чем в отсутствие ЭДТА. Отметим, что начиная с 40 мкМ ЭДТА (в отсутствие фермента) скорость лизиса клеток выходит на плато и остается примерно постоянной для концентраций ЭДТА 5 мМ и ниже. При этом скорость лизиса клеток 5 мМ ЭДТА в 10 раз меньше скорости лизиса клеток 0,1 мкг/мл раствором лизоцима. Такая незначительная скорость лизиса клеток демонстрирует принципиальную возможность использовать ЭДТА в концентрациях 5 мМ и ниже для непродолжительной предобработки бактерий без их полного разрушения. На рис. 41 представлены зависимости скорости лизиса интактных и предобработанных (растворами ЭДТА разных концентраций) клеток от концентрации добавляемого CaCl₂.

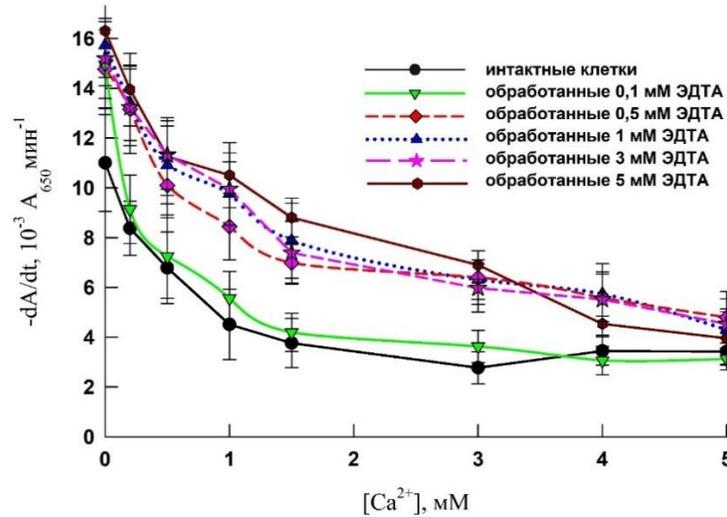


Рисунок 41. Зависимости скорости лизиса декальцинированных (обработанных раствором ЭДТА разных концентраций согласно обозначениям на рисунке) и интактных клеток *E. coli* куриным лизоцимом от концентрации ионов кальция. Буферная смесь 0,01М Трис-MES с добавлением 25 мМ NaCl, pH 8,5. Концентрация клеток в суспензии $3,2 \cdot 10^8$ КОЕ/мл.

Заметим, что кривые зависимостей, полученные для предобработанных клеток растворами с концентрацией ЭДТА выше 0,5 мМ практически накладываются друг на друга. Это свидетельствует, по-видимому, о том, что концентрации 0,5 мМ ЭДТА и выше достаточно для полного удаления ионов кальция с поверхности бактериальных клеток. При этом скорости лизиса предобработанных клеток оказывается в 1,3 раза выше, чем для интактных (нетронутых) клеток. Это наглядно демонстрирует важную роль поверхностного кальция в устойчивости бактериальных клеток к лизису.

Экспериментальные данные, представленные на рис. 41, позволяют нам грубо оценить максимальное количество ионов кальция, связанного с поверхностью одной клетки. Мы предполагаем, что количество кальция, которое нужно добавить к клеткам с удаленным поверхностным кальцием, чтобы их скорость лизиса сравнялась со скоростью лизиса нетронутых бактерий (без кальция), и есть то количество ионов кальция, которое адсорбируется на клеточной поверхности. Видим, что настоящее равенство достижимо, если проводить лизис клеток с удаленным поверхностным кальцием в присутствии 0,5 мМ CaCl₂. В эксперименте клеточная суспензия содержала $3,2 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Таким образом, наша оценка ионов кальция, адсорбированных на поверхности одной клетки *E. coli*, составила $1,6 \cdot 10^{-15}$ моль/клетка или $9,4 \cdot 10^8$ ионов/клетка. Такое количество адсорбированного кальция нельзя объяснить связыванием только с фосфатами липополисахаридов внешней мембраны клетки [172]. Согласно литературным данным типичная клетка *E. coli* содержит $\sim 2 \cdot 10^6$ молекул липополисахаридов,

покрывающих около трех четвертей ее поверхности [351]. Следовательно, на один липополисахарид в таком расчете должно приходиться около 500 ионов кальция. Липополисахарид *E. coli* содержит повторяющиеся фрагменты пентасахаридов, связанные фосфодиэфирными связями (так называемые О-единицы) в количестве, в среднем, от 7 до 25 единиц (но встречаются О-антигены из 40 и более звеньев) [352–354]. Это суммарно дает нам до 80 фосфатов на один О-антиген. Центральный олигосахарид и липид А *E. coli* также имеют фосфатные группы. В липиде А их две, а в центральном олигосахариде три [355,356]. Следовательно, один липополисахарид может содержать до 85 остатков фосфорной кислоты. Такое количество фосфатов явно недостаточно, чтобы связать 500 ионов кальция. Возможно, часть ионов захватывается иными молекулярными структурами, в том числе адсорбируется непосредственно на полярных головках фосфолипидов внешней мембраны. Мы полагаем, что предложенная нами оценка является верхней границей количества адсорбированного на поверхности клетки кальция, и истинное его значение должно быть ниже.

Теперь сравним максимальное количество молекул лизоцима, адсорбированных на поверхности одной клетки, которое мы определили экспериментально, с теоретически полученным значением. Молекула лизоцима имеет форму, близкую к форме эллипсоида с осями 3,0 и 4,5 нм [40]. Справедливо полагать, что взаимодействие фермента с клеточной стенкой происходит преимущественно с сохранением формы белковой глобулы. Вначале рассмотрим два крайних случая, когда контакт с клеточной стенкой происходит областью молекулы, расположенной перпендикулярно большой полуоси эллипсоида, и, наоборот, областью, перпендикулярной малой оси. В первом случае одна молекула лизоцима занимает поверхность клетки, равную по площади сечению эллипсоида вдоль малой оси (т.е. площади круга с радиусом 1,5 нм), а во втором случае занимает площадь овала с полуосями 2,25 и 1,5 нм. Данные площади равны 7,0 и 35,0 нм², а значит, с учетом того, что лизоцим мог связаться в некотором промежуточном положении, площадь его проекции на клетку должна укладываться в этот диапазон величин. Теперь рассчитаем площадь поверхности клетки, представляя ее также в виде эллипсоида, исходя из того, что размерные параметры среднестатистической бактериальной клетки *E. coli* составляют 1,1 x 1,1 x 2 мкм² [44]. Площадь поверхности эллипсоида приблизительно равна:

$$S = 4\pi \left(\frac{a^p b^p + a^p c^p + b^p c^p}{3} \right)^{\frac{1}{p}}$$

Здесь а, b, с – полуоси эллипсоида, p = 1,6.

Получим значение, приблизительно равное $12,6 \text{ мкм}^2$. Разумеется, это очень грубое приближение, поскольку настоящая морфология клетки очень сложна и площадь поверхности клетки значительно превышает таковую для вытянутого эллипсоида. Поскольку из экспериментальных данных известно, что максимальная сорбционная емкость клеток V_{\max} составляет $(3,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-17}$ моль/клетка, мы можем рассчитать количество молекул лизоцима, связавшихся с поверхностью клеточной стенки. Оно составляет около $18,6 \cdot 10^6$ молекул. Согласно же нашей оценке, в один слой на поверхности клетки может уложиться от $3,6 \cdot 10^5$ до $1,8 \cdot 10^6$ молекул. Такое более чем десятикратное превышение экспериментального значения связавшегося количества лизоцима над теоретическим можно объяснить несколькими предположениями. Во-первых, как уже говорилось ранее, действительная поверхность бактериальной клетки гораздо сложнее, чем поверхность эллипсоида, коим мы ее описали. Реальная поверхность бактериальной клетки неоднородна, имеет множество пор и неровностей, и скорее напоминает поверхность ватного шарика. Поэтому её площадь превосходит таковую у эллипсоида. Во-вторых, известно, что молекулы лизоцима способны олигомеризоваться, что, по-видимому, имеет место при их адсорбции на липополисахаридах поверхности бактерий [330]. И, в-третьих, мы не можем отметить возможность протекания многослойной адсорбции лизоцима.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проделанной работы была подобрана комбинация из пяти аминокислот (1,5 мМ глицина, а также глутамата, лизина, гистидина и аргинина в концентрациях по 5 мМ), которая в одинаковой степени усиливает антибактериальные свойства как человеческого, так и куриного лизоцимов и понижает минимальную бактерицидную концентрацию лизоцима по отношению к клеткам *E. coli* с 175 мМ до 125 мМ. Данная смесь увеличивает скорость ферментативного лизиса бактериальных клеток трех семейств: *Bacillaceae*, *Escherichia* и *Pseudomonas* и увеличивает скорость лизиса клеток *E. coli* даже в присутствии 5 мМ ионов кальция. Исследование влияния различных сочетаний аминокислот на лизис бактериальных клеток лизоцимом продемонстрировало существенное преимущество совместного активирующего действия аминокислот над эффектом ускорения лизиса клеток лизоцимом в присутствии только одной аминокислоты. Впервые было показано, что величины эффектов увеличения скорости лизиса клеток лизоцимом в присутствии аминокислот связаны с изменением константы десорбции лизоцима с поверхности бактериальных клеток. Полученные в работе сведения могут оказаться чрезвычайно полезными в разработке новых высокоэффективных антибактериальных препаратов и лекарственных средств на основе лизоцима.

Основные результаты и выводы

1) Заряженные аминокислоты и глицин увеличивают начальную скорость лизиса клеток *E. coli* как куриным, так и человеческим лизоцимом. Смеси из двух, трех, четырех и пяти аминокислот-эффекторов увеличивают начальную скорость лизиса клеток *E. coli* лизоцимом сильнее, нежели каждая из аминокислот по отдельности. Тройные смеси лизина, гистидина и аргинина, а также глутамата, гистидина и аргинина увеличивают начальную скорость лизиса клеток *E. coli* лизоцимом от 4 до 10 раз (все аминокислоты взяты в концентрациях 5 мМ). Эффект увеличения скорости лизиса клеток куриным и человеческим лизоцимами в присутствии аминокислот сохраняется в широком диапазоне ионной силы, рН и состава буферного раствора.

2) Ионы кальция в концентрации 1,5 мМ и выше ингибируют ферментативный лизис клеток, уменьшая начальную скорость лизиса клеток *E. coli* как человеческим, так и куриным лизоцимами. Тем не менее, эффект увеличения скорости лизиса клеток *E. coli* человеческим и куриным лизоцимами в присутствии сочетаний трех, четырех и пяти аминокислот наблюдается даже при добавлении 5 мМ ионов кальция.

3) Установлена корреляция между уменьшением константы десорбции лизоцима в присутствии аминокислот и увеличением скорости лизиса бактериальных клеток в присутствии данного эффектора/комбинации эффекторов. Константа десорбции лизоцима на клетках *E. coli* в присутствии аминокислот и их смесей уменьшается, а максимальная сорбционная емкость клеток *E. coli* по отношению к лизоциму остается неизменной в пределах погрешности эксперимента. В присутствии смесей нескольких аминокислот константа десорбции лизоцима понижается существенно, нежели в присутствии только одной аминокислоты-эффектора. Присутствие ионов кальция приводит к уменьшению максимальной сорбционной емкости клеток *E. coli* по отношению к лизоциму. Таким образом, аминокислоты-эффекторы улучшают параметры продуктивного (способствующего катализу) связывания лизоцима на поверхности клетки, а ионы кальция понижают число центров связывания лизоцима на поверхности клетки. Влияния ионов кальция и аминокислот-эффекторов на сорбционные параметры лизоцима независимы друг от друга.

4) Комбинация аминокислот (1,5 мМ глицина, по 5 мМ глутамата, лизина, аргинина и гистидина) понижает минимальную бактерицидную концентрацию куриного и человеческого лизоцимов по отношению к *E. coli* на 30% при физиологических значениях pH (7,2-7,4). Данная комбинация аминокислот при физиологических значениях pH увеличивает скорость лизиса лизоцимом бактерий в 1,8-4,4 раза для различных штаммов грамотрицательных бактерий *E. coli* и *P. fluorescens*, грамположительных спорообразующих бактерий *P. megaterium*, что может быть использовано в борьбе с антибиотико-резистентными патогенами.

5) Заряженные аминокислоты и глицин связываются с поверхностью молекул человеческого и куриного лизоцимов. В связывании с аминокислотами, предположительно, участвуют ароматические аминокислотные остатки белка. Наиболее вероятно, что в связывании куриного лизоцима с аминокислотами задействованы остатки Trp-123 и Trp-63, а у человеческого - Trp-34 и Trp-64.

6. БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает отдельную благодарность своему научному руководителю Левашову Павлу Андреевичу, а также:

Мирошникову Константину Анатольевичу, члену-корреспонденту РАН, главному научному сотруднику лаборатории молекулярной биоинженерии отдела молекулярной биологии и биотехнологии растений Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Азарновой Татьяне Олеговне, профессору кафедры химии им. профессоров С.И. Афонского кафедры А.Г. Малахова факультета биотехнологии и экологии Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина

Пометуну Евгению Владимировичу, доценту кафедры аналитической и физической химии и коллоидной химии Института фармации имени А.П. Нелюбова Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовского университета)

Чердынцевой Татьяне Андреевне, сотруднику кафедры микробиологии Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова;

Шнитко Алексею Валерьевичу, сотруднику кафедры радиохимии Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

сотрудникам кафедры химической энзимологии Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова:

профессору Ефременко Елене Николаевне

Евтушенко Евгению Геннадьевичу

доценту Белогуровой Наталье Георгиевне

профессору Еремееву Николаю Леонидовичу

Климову Дмитрию Анатольевичу

Сакодынской Инне Карловне

доценту Ле-Дейген Ирине Михайловне

Атрошенко Денису Леонидовичу

Смирнову Сергею Александровичу

Гасановой Дарье Алановне

Крейнину Александру Михайловичу

Южакову Сергею Васильевичу

Якимову Андрею Юрьевичу

выпускникам Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова:

Рождественской Анне Андреевне

Пахомовой Татьяне Евгеньевне

7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ИФА – иммуноферментный анализ

КОЕ – колониеобразующая единица

МБК – минимальная бактерицидная концентрация

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ПАВ – поверхностно активное вещество

ПГ – пептидогликан

АМР - аденозинмонофосфат

АТР – аденозинтрифосфат

СТР – цитидинтрифосфат

LB среда – (lysogeny broth) богатая пищевая среда для роста культур бактерий

NADH - никотинамидадениндинуклеотид

NAG – N-ацетилглюкозамин

NAM – N-ацетилмурамовая кислота

SDS – додецилсульфат натрия

Tween-21 - этоксилированный эфир сорбитана на основе лауриновой кислоты

Ala – аланин

Asn – аспарагин

Asp – аспарат

Gln – глутамин

Glu – глутамат

Ile – изолейцин

Leu – лейцин

Lys – лизин

Pro – пролин

Ser – серин

Thr – треонин

Trp – триптофан

Tyr – тирозин

V_{max} – максимальная сорбционная емкость

K_d – константа десорбции

8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sengupta S., Chattopadhyay M.K., Grossart H.-P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature // *Front Microbiol.* 2013. Vol. 4, № 47. P. 1–13.
2. Ventola C.L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. // *P T.* 2015. Vol. 40, № 4. P. 277–283.
3. Nakamura Y., Kano R., Watanabe S., Takahashi H., Hasegawa A. Enhanced activity of antifungal drugs by lysozyme against *Cryptococcus neoformans* // *Mycoses.* 1998. Vol. 41, № 5–6. P. 199–202.
4. Hemalatha K., Madhumitha G., Ravi L., Khanna V.G., Al-Dhabi N.A., Arasu M.V. Binding mode of dihydroquinazolinones with lysozyme and its antifungal activity against *Aspergillus species* // *J Photochem Photobiol B.* 2016. Vol. 161. P. 71–79.
5. Ellepola A.N.B., Dassanayake R.S., Khan Z. Impact of Brief Exposure to Drugs with Antifungal Properties on the Susceptibility of Oral *Candida dubliniensis* Isolates to Lysozyme and Lactoferrin // *Med Princ Pract.* 2018. Vol. 27, № 6. P. 523–530.
6. Singh I.P., Bodiwala H.S. Recent advances in anti-HIV natural products // *Nat Prod Rep.* 2010. Vol. 27, № 12. P. 1781–1800.
7. Mai W., Wang W. Protection of blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) against the White Spot Syndrome Virus (WSSV) when injected with shrimp lysozyme // *Fish Shellfish Immunol.* 2010. Vol. 28, № 4. P. 727–733.
8. Wei S., Huang Y., Cai J., Huang X., Fu J., Qin Q. Molecular cloning and characterization of c-type lysozyme gene in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* // *Fish Shellfish Immunol.* 2012. Vol. 33, № 2. P. 186–196.
9. Mann J.K., Ndung'u T. The Potential of lactoferrin, Ovotransferrin and Lysozyme As Antiviral and immune-modulating Agents in COVID-19 // *Future Virol.* 2020. Vol. 15, № 9. P. 609–624.

10. Sava G., Benetti A., Ceschia V., Pacor S. Lysozyme and cancer: role of exogenous lysozyme as anticancer agent (review) // *Anticancer Res.* 1989. Vol. 9, № 3. P. 583–591.
11. Osserman E.F., Lawlor D.P. Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia // *J Exp Med.* 1966. Vol. 124, № 5. P. 921–952.
12. Sava G., Benetti A., Ceschia V., Pacor S. Lysozyme and cancer: role of exogenous lysozyme as anticancer agent (review). // *Anticancer Res.* 1989. Vol. 9, № 3. P. 583–591.
13. Ferraboschi P., Ciceri S., Grisenti P. Applications of Lysozyme, an Innate Immune Defense Factor, as an Alternative Antibiotic // *Antibiotics.* 2021. Vol. 10, № 12. P. 1534–1570.
14. Davidson P.M., Taylor T.M., David J.R.D. *Antimicrobials in Food.* 4th ed. Boca Raton: CRC Press, 2020. 826 p.
15. Ragland S.A., Criss A.K. From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme // *PLoS Pathog.* 2017. Vol. 13, № 9. P. e1006512.
16. Liu J., Yi C., Ming W., Tang M., Tang X., Luo C., Lei B., Chen M., Xu H. Retinal Pigment Epithelial Cells Express Antimicrobial Peptide Lysozyme – A Novel Mechanism of Innate Immune Defense of the Blood-Retina Barrier // *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2021. Vol. 62, № 7. P. 21.
17. Ragland S.A., Schaub R.E., Hackett K.T., Dillard J.P., Criss A.K. Two lytic transglycosylases in *Neisseria gonorrhoeae* impart resistance to killing by lysozyme and human neutrophils // *Cell Microbiol.* 2017. Vol. 19, № 3. P. e12662.
18. Levashov P.A., Matolygina D.A., Ovchinnikova E.D., Atroshenko D.L., Savin S.S., Belogurova N.G., Smirnov S.A., Tishkov V.I., Levashov A. V. Bacteriolytic Activity Of Human Interleukin-2, Chicken Egg Lysozyme In The Presence Of Potential Effectors // *Acta Naturae.* 2017. Vol. 9, № 2. P. 82–87.
19. Lu W.-J., Smirnov S.A., Levashov P.A. General characteristics of the influence of surfactants on the bacteriolytic activity of lysozyme based on the example of enzymatic lysis of *Lactobacillus plantarum* cells in the presence of Tween 21 and SDS // *Biochem Biophys Res Commun.* 2021. Vol. 575. P. 73–77.

20. Ivanov R.A., Soboleva O.A., Smirnov S.A., Levashov P.A. Effect of surfactants of different types on the bacteriolytic activity of lysozyme // Russ J Bioorg Chem. 2015. Vol. 41, № 3. P. 260–265.
21. Levashov P.A., Matolygina D.A., Ovchinnikova E.D., Adamova I.Y., Gasanova D.A., Smirnov S.A., Nelyub V.A., Belogurova N.G., Tishkov V.I., Ereemeev N.L., Levashov A. V. The bacteriolytic activity of native and covalently immobilized lysozyme against Gram-positive and Gram-negative bacteria is differentially affected by charged amino acids and glycine // FEBS Open Bio. 2019. Vol. 9, № 3. P. 510–518.
22. Shnitko A. V., Chernysheva M.G., Smirnov S.A., Levashov P.A., Badun G.A. Pluronics and Brij-35 Reduce the Bacteriolytic Activity of Lysozyme // Mosc Univ Chem Bull. 2020. Vol. 75, № 2. P. 92–95.
23. Imoto T., Ono T., Yamada H. Binding of Calcium to Lysozyme and Its Derivatives // J Biochem. 1981. Vol. 90, № 2. P. 335–340.
24. Березин И.В., Клесов А.А., Рабинович М.Л. Кинетика ферментативных реакций в гетерогенных системах. I. Кинетические закономерности расщепления бактериальных клеток *Micrococcus lysodeikticus* под действием лизоцима // Биоорг. химия. 1976. Т. 2, № 5. С. 680–688.
25. Рабинович М.Л., Клесов А.А., Березин И.В. Кинетика ферментативных реакций в гетерогенных системах. II. Бактериолитическое действие лизоцима на клетки *Micrococcus lysodeikticus* // Биоорг. химия. 1976. Т. 2, № 5. С. 689–699.
26. Levashov P.A., Sedov S.A., Shipovskov S., Belogurova N.G., Levashov A. V. Quantitative Turbidimetric Assay of Enzymatic Gram-Negative Bacteria Lysis // Anal Chem. 2010. Vol. 82, № 5. P. 2161–2163.
27. Sedov S.A., Belogurova N.G., Shipovskov S., Levashov A. V., Levashov P.A. Lysis of *Escherichia coli* cells by lysozyme: Discrimination between adsorption and enzyme action // Colloids Surf B Biointerfaces. 2011. Vol. 88, № 1. P. 131–133.
28. Матолыгина Д.А., Осипова Е.Э., Смирнов С.А., Белогурова Н.Г., Еремеев Н.Л., Тишков В.И., Левашов А.В., Левашов П.А. Определение активности и измерение сорбции бактериолитического фермента в системе живых клеток *Lactobacillus plantarum* // Вестн. Моск. ун-та. Сер 2. Химия. 2015. Т. 56, № 6. С. 365–371.

29. Бекерелль С., Хааг У., Абрил-Хорпел О., Валвани Ш. Композиции для усиления антибактериальной активности миелопероксидазы и способы их применения: пат. RU2529799C2 USA. Россия, 2014. С. 68.
30. Vollmer W. Peptidoglycan // *Molecular Medical Microbiology*. Elsevier, 2015. Vol. 1. P. 105–124.
31. Alcorlo M., Martínez-Caballero S., Molina R., Hermoso J.A. Carbohydrate recognition and lysis by bacterial peptidoglycan hydrolases // *Curr Opin Struct Biol*. 2017. Vol. 44. P. 87–100.
32. Vollmer W., Joris B., Charlier P., Foster S. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases // *FEMS Microbiol Rev*. 2008. Vol. 32, № 2. P. 259–286.
33. Кулаев И.С., Северин А.И., Абрамонкин Г.В. Бактериолитические ферменты микробного происхождения в биологии и медицине // *Вестн. АМН СССР*. 1984. № 8. С. 64–69.
34. Скрыбин Г.К, Кулаев И.С. Лизоамидаза - вызов микробам // *Наука в СССР*. 1990. № 2. С. 52–53.
35. Wyckoff T.J., Taylor J.A., Salama N.R. Beyond growth: novel functions for bacterial cell wall hydrolases // *Trends Microbiol*. 2012. Vol. 20, № 11. P. 540–547.
36. Seki T. Lysozyme // *Japanese journal of clinical medicine. Nihon Rinsho*, 1995. Vol. 53, № 5. P. 1209–1212.
37. López R., García E. Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage // *FEMS Microbiol Rev*. 2004. Vol. 28, № 5. P. 553–580.
38. Uehara T., Bernhardt T.G. More than just lysins: peptidoglycan hydrolases tailor the cell wall // *Curr Opin Microbiol*. 2011. Vol. 14, № 6. P. 698–703.
39. Yang H., Hu J., Lu X., Wang F., Shen W., Hu W., Wang L., Chen X., Liu L. Improving extracellular protein production in *Escherichia coli* by overexpressing D,D-carboxypeptidase to perturb peptidoglycan network synthesis and structure // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019. Vol. 103, № 2. P. 793–806.
40. Callewaert L., Michiels C.W. Lysozymes in the animal kingdom // *J Biosci*. 2010. Vol. 35, № 1. P. 127–160.

41. Cong L., Yang X., Wang X., Tada M., Lu M., Liu H., Zhu B. Characterization of an i-type lysozyme gene from the sea cucumber *Stichopus japonicus*, and enzymatic and nonenzymatic antimicrobial activities of its recombinant protein // *J Biosci Bioeng*. 2009. Vol. 107, № 6. P. 583–588.
42. Grütter M.G., Weaver L.H., Matthews B.W. Goose lysozyme structure: an evolutionary link between hen and bacteriophage lysozymes? // *Nature*. 1983. Vol. 303, № 5920. P. 828–831.
43. Prager E.M., Jollès P. Animal lysozymes c and g: an overview // *EXS*. 1996. Vol. 75. P. 9–31.
44. Beckert A., Wiesner J., Schmidtberg H., Lehmann R., Baumann A., Vogel H., Vilcinskis A. Expression and characterization of a recombinant i-type lysozyme from the harlequin ladybird beetle *Harmonia axyridis* // *Insect Mol Biol*. 2016. Vol. 25, № 3. P. 202–215.
45. Xue Q., Hellberg M.E., Schey K.L., Itoh N., Eytan R.I., Cooper R.K., La Peyre J.F. A new lysozyme from the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and a possible evolutionary pathway for i-type lysozymes in bivalves from host defense to digestion // *BMC Evol Biol*. 2010. Vol. 10, № 1. P. 213–230.
46. Evrard C., Fastrez J., Declercq J.-P. Crystal structure of the lysozyme from bacteriophage lambda and its relationship with V and C-type lysozymes // *J Mol Biol*. 1998. Vol. 276, № 1. P. 151–164.
47. Owen J.E., Schultz D.W., Taylor A., Smith G.R. Nucleotide sequence of the lysozyme gene of bacteriophage T4 // *J Mol Biol*. 1983. Vol. 165, № 2. P. 229–248.
48. Ito Y., Yamada H., Nakamura M., Yoshikawa A., Ueda T., Imoto T. The primary structures and properties of non-stomach lysozymes of sheep and cow, and implication for functional divergence of lysozyme // *Eur J Biochem*. 1993. Vol. 213, № 2. P. 649–658.
49. Jollès J., Prager E.M., Alnemri E.S., Jollès P., Ibrahimi I.M., Wilson A.C. Amino acid sequences of stomach and nonstomach lysozymes of ruminants // *J Mol Evol*. 1990. Vol. 30, № 4. P. 370–382.
50. Masschalck B., Houdt R., Haver E.G.R., Michiels C.W. Inactivation of Gram-Negative Bacteria by Lysozyme, Denatured Lysozyme, and Lysozyme-Derived Peptides under High Hydrostatic Pressure // *Appl Environ Microbiol*. 2001. Vol. 67, № 1. P. 339–344.

51. Derde M., Lechevalier V., Guérin-Dubiard C., Cochet M.-F., Jan S., Baron F., Gautier M., Vié V., Nau F. Hen Egg White Lysozyme Permeabilizes *Escherichia coli* Outer and Inner Membranes // *J Agric Food Chem.* 2013. Vol. 61, № 41. P. 9922–9929.
52. Zhang X., Jiang A., Yu H., Xiong Y., Zhou G., Qin M., Dou J., Wang J. Human Lysozyme Synergistically Enhances Bactericidal Dynamics and Lowers the Resistant Mutant Prevention Concentration for Metronidazole to *Helicobacter pylori* by Increasing Cell Permeability // *Molecules.* 2016. Vol. 21, № 11. P. 1435–1446.
53. Khorshidian N., Khanniri E., Koushki M.R., Sohrabvandi S., Yousefi M. An Overview of Antimicrobial Activity of Lysozyme and Its Functionality in Cheese // *Front Nutr.* 2022. Vol. 9. P. e833618.
54. Masschalck B., Michiels C.W. Antimicrobial Properties of Lysozyme in Relation to Foodborne Vegetative Bacteria // *Crit Rev Microbiol.* 2003. Vol. 29, № 3. P. 191–214.
55. Salazar O., Asenjo J.A. Enzymatic lysis of microbial cells // *Biotechnol Lett.* 2007. Vol. 29, № 7. P. 985–994.
56. Steinrauf L.K., Shiuan D., Yang W., Chiang M.Y. Lysozyme Association with Nucleic Acids // *Biochem Biophys Res Commun.* 1999. Vol. 266, № 2. P. 366–370.
57. Lesnierowski G., Stangierski J. What's new in chicken egg research and technology for human health promotion? - A review // *Trends Food Sci Technol.* 2018. Vol. 71. P. 46–51.
58. Tullio V., Spaccapelo R., Polimeni M. Lysozymes in the Animal Kingdom // *Human and Mosquito Lysozymes.* Cham: Springer International Publishing, 2015. P. 45–57.
59. Dadkhodazade E., Khanniri E., Khorshidian N., Hosseini S.M., Mortazavian A.M., Moghaddas Kia E. Yeast cells for encapsulation of bioactive compounds in food products: A review // *Biotechnol Prog.* 2021. Vol. 37, № 4. P. e3138.
60. Rinehart J.J., Cerilli J.G., Jacob H.S., Osserman E.F. Lysozyme stimulates lymphocyte proliferation in monocyte-depleted mixed lymphocyte cultures. // *J Lab Clin Med.* 1982. Vol. 99, № 3. P. 370–381.
61. Adorini L., Miller A., Sercarz E.E. The fine specificity of regulatory T cells. I. Hen egg-white lysozyme-induced suppressor T cells in a genetically nonresponder mouse strain do not recognize a closely related immunogenic lysozyme. // *J Immunol.* 1979. Vol. 122, № 3. P. 871–877.

62. Caruso R., Warner N., Inohara N., Núñez G. NOD1 and NOD2: Signaling, Host Defense, and Inflammatory Disease // *Immunity*. 2014. Vol. 41, № 6. P. 898–908.
63. Matsumoto K., Ogawa H., Kusama T., Nagase O., Sawaki N., Inage M., Kusumoto S., Shiba T., Azuma I. Stimulation of nonspecific resistance to infection induced by 6-O-acyl muramyl dipeptide analogs in mice // *Infect Immun*. 1981. Vol. 32, № 2. P. 748–758.
64. Masumoto J., Yang K., Varambally S., Hasegawa M., Tomlins S.A., Qiu S., Fujimoto Y., Kawasaki A., Foster S.J., Horie Y., Mak T.W., Núñez G., Chinnaiyan A.M., Fukase K., Inohara N. Nod1 acts as an intracellular receptor to stimulate chemokine production and neutrophil recruitment in vivo // *JEM*. 2006. Vol. 203, № 1. P. 203–213.
65. Davis K.M., Nakamura S., Weiser J.N. Nod2 sensing of lysozyme-digested peptidoglycan promotes macrophage recruitment and clearance of *S. pneumoniae* colonization in mice // *JCI*. 2011. Vol. 121, № 9. P. 3666–3676.
66. Knilans K.J., Hackett K.T., Anderson J.E., Weng C., Dillard J.P., Duncan J.A. *Neisseria gonorrhoeae* Lytic Transglycosylases LtgA and LtgD Reduce Host Innate Immune Signaling through TLR2 and NOD2 // *ACS Infect Dis*. 2017. Vol. 3, № 9. P. 624–633.
67. Chaput C., Ecobichon C., Cayet N., Girardin S.E., Werts C., Guadagnini S., Prévost M.-C., Mengin-Lecreulx D., Labigne A., Boneca I.G. Role of AmiA in the Morphological Transition of *Helicobacter pylori* and in Immune Escape // *PLoS Pathog*. 2006. Vol. 2, № 9. P. e970844.
68. Mariathasan S., Newton K., Monack D.M., Vucic D., French D.M., Lee W.P., Roose-Girma M., Erickson S., Dixit V.M. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf // *Nature*. 2004. Vol. 430, № 6996. P. 213–218.
69. Shimada T., Park B.G., Wolf A.J., Brikos C., Goodridge H.S., Becker C.A., Reyes C.N., Miao E.A., Aderem A., Götz F., Liu G.Y., Underhill D.M. *Staphylococcus aureus* Evades Lysozyme-Based Peptidoglycan Digestion that Links Phagocytosis, Inflammasome Activation, and IL-1 β Secretion // *Cell Host Microbe*. 2010. Vol. 7, № 1. P. 38–49.
70. Wolf A.J., Arruda A., Reyes C.N., Kaplan A.T., Shimada T., Shimada K., Arditi M., Liu G., Underhill D.M. Phagosomal Degradation Increases TLR Access to Bacterial Ligands and Enhances Macrophage Sensitivity to Bacteria // *J. Immun*. 2011. Vol. 187, № 11. P. 6002–6010.

71. Fittipaldi N., Sekizaki T., Takamatsu D., de la Cruz Domínguez-Punaro M., Harel J., Bui N.K., Vollmer W., Gottschalk M. Significant contribution of the *pgdA* gene to the virulence of *Streptococcus suis* // Mol Microbiol. 2008. Vol. 70, № 5. P. 1120–1135.
72. Liu H., Zheng F., Cao Q., Ren B., Zhu L., Striker G., Vlassara H. Amelioration of oxidant stress by the defensin lysozyme // Am J Physiol Endocrinol. 2006. Vol. 290, № 5. P. 824–832.
73. Li Y.M., Tan A.X., Vlassara H. Antibacterial activity of lysozyme and lactoferrin is inhibited by binding of advanced glycation–modified proteins to a conserved motif // Nat Med. 1995. Vol. 1, № 10. P. 1057–1061.
74. Riber U., Espersen F., Wilkinson B.J., Kharazmi A. Neutrophil chemotactic activity of peptidoglycan. A comparison between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* // APMIS. 1990. Vol. 98, № 10. P. 881–886.
75. Mangalassary S., Han I., Rieck J., Acton J., Jiang X., Sheldon B., Dawson P. Effect of combining nisin and/or lysozyme with in-package pasteurization on thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat turkey bologna // J Food Prot. J Food Prot, 2007. Vol. 70, № 11. P. 2503–2511.
76. Min S., Rumsey T.R., Krochta J.M. Diffusion of the antimicrobial lysozyme from a whey protein coating on smoked salmon // J Food Eng. 2008. Vol. 84, № 1. P. 39–47.
77. Kaewprachu P., Osako K., Benjakul S., Rawdkuen S. Quality attributes of minced pork wrapped with catechin–lysozyme incorporated gelatin film // Food Packag Shelf Life. 2015. Vol. 3. P. 88–96.
78. Liburdi K., Benucci I., Esti M. Lysozyme in Wine: An Overview of Current and Future Applications // Compr Rev Food Sci Food Saf. 2014. Vol. 13, № 5. P. 1062–1073.
79. Silvetti T., Brasca M., Lodi R., Vanoni L., Chiolerio F., Groot M., Bravi A. Effects of Lysozyme on the Microbiological Stability and Organoleptic Properties of Unpasteurized Beer // JIB. 2010. Vol. 116, № 1. P. 33–40.
80. Nyachoti C.M., Kiarie E., Bhandari S.K., Zhang G., Krause D.O. Weaned pig responses to *Escherichia coli* K88 oral challenge when receiving a lysozyme supplement // J Anim Sci. 2012. Vol. 90, № 1. P. 252–260.
81. Кузнецов А.С. Эффективность применение лизоцима и гамма-аминомасляной кислоты в кормлении телят // Скотоводство. 2019. № 5. С. 1–6.

82. Sahoo N, Kumar P, Bhushan D, Kumar T.B, Dayal S, Sahoo M. Lysozyme in livestock: A guide to selection for disease resistance: A Review // *J Anim Sci Adv*. 2012. Vol. 2, № 4. P. 347–360.
83. Бухарин О.В., Соловых Г.Н., Немцева Н.В., Алехина Г.П., Фабарисова Л.Г. Система лизоцим-антилизоцим микроорганизмов как показатель состояния водных биоценозов // *Гигиена и санитария*. 1998. № 5. С. 59–61.
84. Suárez N., Ferrara F., Rial A., Dee V., Chabalgoity J.A. Bacterial Lysates as Immunotherapies for Respiratory Infections: Methods of Preparation // *Front Bioeng Biotechnol*. 2020. Vol. 8, № 545. P. 1–8.
85. Dondapati S.K., Stech M., Zemella A., Kubick S. Cell-Free Protein Synthesis: A Promising Option for Future Drug Development // *BioDrugs*. 2020. Vol. 34, № 3. P. 327–348.
86. Canfield R.E. The Amino Acid Sequence of Egg White Lysozyme // *JBC*. 1963. Vol. 228, № 8. P. 2698–2707.
87. Phillips D.C. The Three-Dimensional Structure of an Enzyme Molecule // *Sci Am*. 1966. Vol. 215, № 5. P. 78–90.
88. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987. 815 с.
89. Swaminathan R., Ravi V.K., Kumar S., Kumar M.V.S., Chandra N. Lysozyme: a model protein for amyloid research // *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2011. Vol. 84. P. 63–111.
90. Sonavane S., Haider S.Z., Kumar A., Ahmad B. Hemin is able to disaggregate lysozyme amyloid fibrils into monomers // *BBA - Proteins and Proteomics*. 2017. Vol. 1865, № 11. P. 1315–1325.
91. Strynadka N.C.J., James M.N.G. Lysozyme: A model enzyme in protein crystallography // *EXS*. 1996. Vol. 75. P. 185–222.
92. Yamada H., Nagae T., Watanabe N. High-pressure protein crystallography of hen egg-white lysozyme // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2015. Vol. 71, № 4. P. 742–753.
93. Artymiuk P.J., Blake C.C.F. Refinement of human lysozyme at 1.5 Å resolution analysis of non-bonded and hydrogen-bond interactions // *J Mol Biol*. 1981. Vol. 152, № 4. P. 737–762.

94. McCammon J.A., Gelin B.R., Karplus M., Wolynes P.G. The hinge-bending mode in lysozyme // *Nature*. 1976. Vol. 262, № 5566. P. 325–326.
95. Дюга Г., Пенни К. Биоорганическая химия. Химические подходы к механизму действия ферментов. Пер. с английского. М.: Мир, 1983. 512 с.
96. Maenaka K., Matsushima M., Kawai G., Kodera A., Watanabe K., Kuroki R., Kumagai I. Structural and functional effect of Trp-62→Gly and Asp-101→Gly substitutions on substrate-binding modes of mutant hen egg-white lysozymes // *Biochem J*. 1998. Vol. 333, № 1. P. 71–76.
97. Kuramitsu S., Ikeda K., Hamaguchi K., Fujio H., Amano T. Ionization constants of Glu 35 and Asp 52 in hen, turkey, and human lysozymes. // *J Biochem*. 1974. Vol. 76, № 4. P. 671–683.
98. Страйер Л. Биохимия. Пер. с английского. М.: Мир, 1984. Т. 1. 232 с.
99. Bowman A.L., Grant I.M., Mulholland A.J. QM/MM simulations predict a covalent intermediate in the hen egg white lysozyme reaction with its natural substrate // *Chem comm*. 2008. Vol. 37, № 37. P. 4425–4427.
100. Hadfield A.T., Harvey D.J., Archer D.B., MacKenzie D.A., Jeenes D.J., Radford S.E., Lowe G., Dobson C.M., Johnson L.N. Crystal Structure of the Mutant D52S Hen Egg White Lysozyme with an Oligosaccharide Product // *J Mol Biol*. 1994. Vol. 243, № 5. P. 856–872.
101. Held J., Smaalen S. The active site of hen egg-white lysozyme: flexibility and chemical bonding // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2014. Vol. 70, № 4. P. 1136–1146.
102. Blake C.C., Mair G.A., North A.C., Phillips D.C., Sarma V.R. On the conformation of the hen egg-white lysozyme molecule // *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1967. Vol. 167, № 1009. P. 365–377.
103. Koshland D.E. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions // *Biological Reviews*. 1953. Vol. 28, № 4. P. 416–436.
104. Vocadlo D.J., Davies G.J., Laine R., Withers S.G. Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate // *Nature*. 2001. Vol. 412, № 6849. P. 835–838.
105. Karplus M., Post C.B. Simulations of lysozyme: Internal motions and the reaction mechanism // *EXS*. 1996. Vol. 75. P. 111–141.

106. Schindler M., Sharon N. A transition state analog of lysozyme catalysis prepared from the bacterial cell wall tetrasaccharide // *JBC*. 1976. Vol. 251, № 14. P. 4330–4335.
107. Ogata M., Umemoto N., Ohnuma T., Numata T., Suzuki A., Usui T., Fukamizo T. A Novel Transition-state Analogue for Lysozyme, 4-O- β -Tri-N-acetylchitotriosyl Moranoline, Provided Evidence Supporting the Covalent Glycosyl-enzyme Intermediate // *JBC*. 2013. Vol. 288, № 9. P. 6072–6082.
108. Strynadka N.C.J., James M.N.G. Lysozyme revisited: crystallographic evidence for distortion of an N-acetylmuramic acid residue bound in site D // *J Mol Biol*. 1991. Vol. 220, № 2. P. 401–424.
109. Gálvez-Iriqui A.C., Plascencia-Jatomea M., Bautista-Baños S. Lysozymes: characteristics, mechanism of action and technological applications on the control of pathogenic microorganisms // *MJP*. 2020. Vol. 38, № 3. P. 360–383.
110. Cao D., Wu H., Li Q., Sun Y., Liu T., Fei J., Zhao Y., Wu S., Hu X., Li N. Expression of Recombinant Human Lysozyme in Egg Whites of Transgenic Hens // *PLoS One*. 2015. Vol. 10, № 2. P. e0118626.
111. Dumoulin M., Johnson R.J.K., Bellotti V., Dobson C.M. Human Lysozyme // *Protein Misfolding, Aggregation, and Conformational Diseases*. Boston, MA: Springer US, 2007. P. 285–308.
112. Nam K.H. Crystal Structure of Human Lysozyme Complexed with N-Acetyl- α -d-glucosamine // *Applied Sciences*. 2022. Vol. 12, № 9. P. 4363–4374.
113. Osserman E.F., Lawlor D.P. Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia // *Journal of Experimental Medicine*. 1966. Vol. 124, № 5. P. 921–952.
114. Halper J.P., Latovitzki N., Bernstein H., Beychok S. Optical Activity of Human Lysozyme // *PNAS*. 1971. Vol. 68, № 3. P. 517–522.
115. Reitamo S., Klockars M., Adinolfi M., Osserman E.F. Human lysozyme (origin and distribution in health and disease) // *Ric Clin Lab*. 1978. Vol. 8, № 4. P. 211–231.
116. Ovsyannikov V.G., Toropkina Y.E., Kraskevich V.V., Alekseev V.V., Boychenko A.E., Alekseeva N.S., Kraskevich D.A. Lysozyme - the frontiers of possibility // *Современные проблемы науки и образования (Modern Problems of Science and Education)*. 2020. №3. P. 145–145.

117. Hansen N.E., Karle H., Andersen V., Olgaard K. Lysozyme turnover in man // JCI. 1972. Vol. 51, № 5. P. 1146–1155.
118. Leung J.M., Gallant C.V. Infections due to *Escherichia* and *Shigella* // Reference Module in Biomedical Science. 2014. P. 121–130.
119. Liu D. *Escherichia coli* // Encyclopedia of Microbiology. 4th ed. Oxford: Academic press, 2019. P. 171.
120. Грачева Н.М., Ющук Н.Д., Чуприна Р.П., Мацулевич Т.В., Пожалостина Л.В. Дисбиозы кишечника, причины возникновения, диагностика, применение бактериальных биологических препаратов. Пособие для врачей и студентов. М.: 1999. 44 с.
121. Nataro J.P., Kaper J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli* // Clin Microbiol Rev. 1998. Vol. 11, № 1. P. 142–201.
122. Evans D.J., Evans D.G. Medical Microbiology. *Escherichia coli* in Diarrheal Disease. 4th ed. / ed. Baron S. Galveston: University of Texas Medical Branch, 1996. 357 p.
123. Neidhardt F.C. Brenner's encyclopedia of genetics / ed. S. Maloy, K. Hughes. Academic press, 2013. 4368 p.
124. Riley L.W., Remis R.S., Helgerson S.D., McGee H.B., Wells J.G., Davis B.R., Hebert R.J., Olcott E.S., Johnson L.M., Hargrett N.T., Blake P.A., Cohen M.L. Hemorrhagic Colitis Associated with a Rare *Escherichia coli* Serotype // NEJM. 1983. Vol. 308, № 12. P. 681–685.
125. Rohde H., Qin J., Cui Y., Li D., Loman N.J., Hentschke M., Chen W., Pu F., Peng Y., Li J., Xi F., Li S., Li Y., Zhang Z., Yang X., Zhao M., Wang P., Guan Y., et al. Open-Source Genomic Analysis of Shiga-Toxin–Producing *E. coli* O104:H4 // NEJM. 2011. Vol. 365, № 8. P. 718–724.
126. Bryan L.E., Den Elzen H.M. Effects of Membrane-Energy Mutations and Cations on Streptomycin and Gentamicin Accumulation by Bacteria: a Model for Entry of Streptomycin and Gentamicin in Susceptible and Resistant Bacteria // Antimicrob Agents Chemother. 1977. Vol. 12, № 2. P. 163–177.
127. Blattner F.R., Plunkett G., Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J.D., Rode C.K., Mayhew G.F., Gregor J., Davis N.W., Kirkpatrick H.A.,

- Goeden M.A., Rose D.J., Mau B., Shao Y. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12 // *Science* (1979). 1997. Vol. 277, № 5331. P. 1453–1462.
128. Zieliński M., Romanik-Chruścielewska A., Mikiewicz D., Łukasiewicz N., Sokołowska I., Antosik J., Sobolewska-Ruta A., Bierczyńska-Krzysik A., Zaleski P., Płucienniczak A. Expression and purification of recombinant human insulin from *E. coli* 20 strain // *Protein Expr Purif.* 2019. Vol. 157. P. 63–69.
129. Lee S.Y. High cell-density culture of *Escherichia coli* // *Trends Biotechnol.* 1996. Vol. 14, № 3. P. 98–105.
130. Большая медицинская энциклопедия. 3-е издание / гл. ред. Б.В. Петровский. М.: Советская энциклопедия, 1988. Т. 3. 224 с.
131. Bentley R., Meganathan R. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria // *Microbiol Rev.* 1982. Vol. 46, № 3. P. 241–280.
132. Daegelen P., Studier F.W., Lenski R.E., Cure S., Kim J.F. Tracing Ancestors and Relatives of *Escherichia coli* B, and the Derivation of B Strains REL606 and BL21(DE3) // *J Mol Biol.* 2009. Vol. 394, № 4. P. 634–643.
133. Serres M.H., Gopal S., Nahum L.A., Liang P., Gaasterland T., Riley M. A functional update of the *Escherichia coli* K-12 genome // *Genome Biol.* 2001. Vol. 2, № 9. P. 351–357.
134. Yoon S., Han M.-J., Jeong H., Lee C., Xia X.-X., Lee D.-H., Shim J., Lee S., Oh T., Kim J.F. Comparative multi-omics systems analysis of *Escherichia coli* strains B and K-12 // *Genome Biol.* 2012. Vol. 13, № 5. P. R37.
135. Gerdes K., Christensen S.K., Løbner-Olesen A. Prokaryotic toxin–antitoxin stress response loci // *Nat Rev Microbiol.* 2005. Vol. 3, № 5. P. 371–382.
136. Piperno J.R., Oxender D.L. Amino Acid Transport Systems in *Escherichia coli* K12 // *JBC.* 1968. Vol. 243, № 22. P. 5914–5920.
137. Rosen B.P. Basic Amino Acid Transport in *Escherichia coli*. // *JBC.* 1971. Vol. 246, № 11. P. 3653–3662.
138. Caldara M., Minh P.N. Le, Bostoen S., Massant J., Charlier D. ArgR-dependent Repression of Arginine and Histidine Transport Genes in *Escherichia coli* K-12 // *J Mol Biol.* 2007. Vol. 373, № 2. P. 251–267.

139. Rosen B.P. Basic Amino Acid Transport in *Escherichia coli*: II. Purification and properties of an arginine-specific binding protein // JBC. 1973. Vol. 248, № 4. P. 1211–1218.
140. Halpern Y.S., Barash H., Druck K. Glutamate Transport in *Escherichia coli* K-12: Nonidentity of Carriers Mediating Entry and Exit // J Bacteriol. 1973. Vol. 113, № 1. P. 51–57.
141. Raunser S., Appel M., Ganea C., Geldmacher-Kaufner U., Fendler K., Kühlbrandt W. Structure and function of prokaryotic glutamate transporters from *Escherichia coli* and *Pyrococcus horikoshii*. // Biochemistry. 2006. Vol. 45, № 42. P. 12796–12805.
142. Miner K.M., Frank L. Sodium-Stimulated Glutamate Transport in Osmotically Shocked Cells and Membrane Vesicles of *Escherichia coli* // J Bacteriol. 1974. Vol. 117, № 3. P. 1093–1098.
143. Tolner B., Ubbink-Kok T., Poolmann B., Konings W.N. Cation-selectivity of the L-glutamate transporters of *Escherichia coli*, *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus caldotenax*: dependence on the environment in which the proteins are expressed // Mol Microbiol. 1995. Vol. 18, № 1. P. 123–133.
144. Bricas E., Ghuysen J.-M., Dezélee P. The Cell Wall Peptidoglycan of *Bacillus megaterium* KM. I. Studies on the Stereochemistry of α, α' -Diaminopimelic Acid // Biochemistry. 1967. Vol. 6, № 8. P. 2598–2607.
145. Vary P.S., Biedendieck R., Fuerch T., Meinhardt F., Rohde M., Deckwer W.-D., Jahn D. *Bacillus megaterium*—from simple soil bacterium to industrial protein production host // Appl Microbiol Biotechnol. 2007. Vol. 76, № 5. P. 957–967.
146. Yousuf J., Thajudeen J., Rahiman M., Krishnankutty S., P. Alikunj A., A. Abdulla M.H. Nitrogen fixing potential of various heterotrophic *Bacillus* strains from a tropical estuary and adjacent coastal regions // J Basic Microbiol. 2017. Vol. 57, № 11. P. 922–932.
147. Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami V.K., Chauhan B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective // Process Biochemistry. 2003. Vol. 38, № 11. P. 1599–1616.
148. Rajkumar R., Jayappriyan K.R., Rengasamy R. Purification and characterization of a protease produced by *Bacillus megaterium* RRM2: application in detergent and dehairing industries // J Basic Microbiol. 2011. Vol. 51, № 6. P. 614–624.

149. Jordan E., Hust M., Roth A., Biedendieck R., Schirrmann T., Jahn D., Dübel S. Production of recombinant antibody fragments in *Bacillus megaterium* // Microb Cell Fact. 2007. Vol. 6, № 1. P. 2.
150. Luo L., Xu Q., Xu W., Li J., Wang C., Wang L., Zhao Z. Effect of *Bacillus megaterium*-Coated Diets on the Growth, Digestive Enzyme Activity, and Intestinal Microbial Diversity of Songpu Mirror Carp *Cyprinus specularis* Songpu // Biomed Res Int. 2020. Vol. 2020. P. 1–7.
151. Ehling-Schulz M., Lereclus D., Koehler T.M. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential // Microbiol Spectr. 2019. Vol. 7, № 3. P. 1–35.
152. Grage K., McDermott P., Rehm B.H.A. Engineering *Bacillus megaterium* for production of functional intracellular materials // Microb Cell Fact. 2017. Vol. 16, № 1. P. 211–223.
153. John G. Holt. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. / ed. W.R. Hensyl. Philadelphia: LWW, 1994. 787 p.
154. Coleman J.P., Smith C.J. Structure and Composition of Microbes // Ref Mod in Biomed Sci. Elsevier, 2014. Vol. 1. P. 1–6.
155. Nikaido H., Nakae T. The Outer Membrane of Gram-negative Bacteria // Adv Microb Physiol. 1979. Vol. 20. P. 163–250.
156. Гусев М.В. Микробиология: Учебник для студентов биологических специальностей вузов. 4-е издание / ред. Гусев М.В., Минеева Л.А. М.: Академия, 2003. 464 с.
157. Bezr R., Bauer K. Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of gram-negative bacteria. Review of bacterial porins // Eur J Biochem. 1988. Vol. 176, № 1. P. 1–19.
158. Madison B. Application of stains in clinical microbiology // Biotechnic & Histochemistry. 2001. Vol. 76, № 3. P. 119–125.
159. Vollmer W., Born P. Bacterial cell envelope peptidoglycan // Microbial Glycobiology. Elsevier, 2010. P. 15–28.
160. Schumann P. Peptidoglycan Structure // Methods in Microbiology. 2011. Vol. 38. P. 101–129.

161. Schleifer K.H., Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications // *Bacteriol Rev.* 1972. Vol. 36, № 4. P. 407–477.
162. Sobhanifar S., King D.T., Strynadka N.C. Fortifying the wall: synthesis, regulation and degradation of bacterial peptidoglycan // *Curr Opin Struct Biol.* 2013. Vol. 23, № 5. P. 695–703.
163. Pedro M.A. Peptidoglycan (Murein) // *Encyclopedia of Microbiology.* Elsevier, 2009. Vol. 1. P. 453–469.
164. Kusumoto S., Fukase K., Shiba T. Key structures of bacterial peptidoglycan and lipopolysaccharide triggering the innate immune system of higher animals: Chemical synthesis and functional studies // *PJA-B.* 2010. Vol. 86, № 4. P. 322–337.
165. Dalen R., Peschel A., Sorge N.M. Wall Teichoic Acid in *Staphylococcus aureus* Host Interaction // *Trends Microbiol.* 2020. Vol. 28, № 10. P. 985–998.
166. Armstrong J.J., Baddiley J., Buchanan J.G., Carss B., Greenberg G.R. Isolation and structure of ribitol phosphate derivatives (teichoic acids) from bacterial cell walls // *J. Chem. Soc.* 1958. P. 4344–4354.
167. Xia G., Kohler T., Peschel A. The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of *Staphylococcus aureus* // *IJMM.* 2010. Vol. 300, № 2–3. P. 148–154.
168. Hughes A.H., Hancock I.C., Baddiley J. The function of teichoic acids in cation control in bacterial membranes // *Biochem J.* 1973. Vol. 132, № 1. P. 83–93.
169. Heijenoort J. Lipid Intermediates in the Biosynthesis of Bacterial Peptidoglycan // *MMBR.* 2007. Vol. 71, № 4. P. 620–635.
170. Monchois V., Abergel C., Sturgis J., Jeudy S., Claverie J.-M. *Escherichia coli* ykfE ORFan Gene Encodes a Potent Inhibitor of C-type Lysozyme // *JBC.* 2001. Vol. 276, № 21. P. 18437–18441.
171. Erridge C., Bennett-Guerrero E., Poxton I.R. Structure and function of lipopolysaccharides // *Microbes Infect.* 2002. Vol. 4, № 8. P. 837–851.
172. Heesterbeek D.A.C., Muts R.M., Hensbergen V.P., Saint Aulaire P., Wennekes T., Bardoel B.W., Sorge N.M., Rooijackers S.H.M. Outer membrane permeabilization by the membrane attack complex sensitizes Gram-negative bacteria to antimicrobial proteins in serum and phagocytes // *PLoS Pathog.* 2021. Vol. 17, № 1. P. e1009227.

173. Ebbensgaard A., Mordhorst H., Aarestrup F.M., Hansen E.B. The Role of Outer Membrane Proteins and Lipopolysaccharides for the Sensitivity of *Escherichia coli* to Antimicrobial Peptides // *Front Microbiol.* 2018. Vol. 9. P. 2153–2176.
174. Van Heijenoort J., Elbaz L., Dezelee P., Petit J.F., Bricas E., Ghuysen J.M. Structure of the meso-diaminopimelic acid containing peptidoglycans in *Escherichia coli* B and *Bacillus megaterium* KM // *Biochemistry.* 1969. Vol. 8, № 1. P. 207–213.
175. Dezelee P., Bricas E. Structure of the peptidoglycan in *Escherichia coli* B and *Bacillus megaterium* KM. Stereospecific synthesis of two meso-diaminopimelic acid peptides with the tetrapeptide subunit of bacterial cell wall peptidoglycan // *Biochemistry.* 1970. Vol. 9, № 4. P. 823–831.
176. Morales Angeles D., Scheffers D.-J. The Cell Wall of *Bacillus subtilis* // *Curr Issues Mol Biol.* 2021. P. 539–596.
177. Matias V.R.F., Beveridge T.J. Native Cell Wall Organization Shown by Cryo-Electron Microscopy Confirms the Existence of a Periplasmic Space in *Staphylococcus aureus* // *J Bacteriol.* 2006. Vol. 188, № 3. P. 1011–1021.
178. Silhavy T.J., Kahne D., Walker S. The Bacterial Cell Envelope // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010. Vol. 2, № 5. P. a000414.
179. Rajagopal M., Walker S. Envelope Structures of Gram-Positive Bacteria. 2015. P. 1–44.
180. Arciola C.R., Campoccia D., Ravaoli S., Montanaro L. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects // *Front Cell Infect Microbiol.* 2015. Vol. 5, № 7. P. 1–10.
181. Yother J. Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and Other Bacteria: Paradigms for Polysaccharide Biosynthesis and Regulation // *Annu Rev Microbiol.* 2011. Vol. 65, № 1. P. 563–581.
182. Guariglia-Oropeza V., Helmann J.D. *Bacillus subtilis* σ Confers Lysozyme Resistance by Activation of Two Cell Wall Modification Pathways, Peptidoglycan O-Acetylation and Alanylation of Teichoic Acids // *J Bacteriol.* 2011. Vol. 193, № 22. P. 6223–6232.
183. Brown S., Santa Maria J.P., Walker S. Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria // *Annu Rev Microbiol.* 2013. Vol. 67, № 1. P. 313–336.

184. Davis K.M., Weiser J.N. Modifications to the Peptidoglycan Backbone Help Bacteria To Establish Infection // *Infect Immun*. 2011. Vol. 79, № 2. P. 562–570.
185. Wang G., Lo L.F., Forsberg L.S., Maier R.J. *Helicobacter pylori* Peptidoglycan Modifications Confer Lysozyme Resistance and Contribute to Survival in the Host // *mBio*. 2012. Vol. 3, № 6. P. e00409.
186. Vollmer W., Tomasz A. Peptidoglycan *N*-Acetylglucosamine Deacetylase, a Putative Virulence Factor in *Streptococcus pneumoniae* // *Infect Immun*. 2002. Vol. 70, № 12. P. 7176–7178.
187. Moynihan P.J., Clarke A.J. O-Acetylated peptidoglycan: Controlling the activity of bacterial autolysins and lytic enzymes of innate immune systems // *Int J Biochem Cell Biol*. 2011. Vol. 43, № 12. P. 1655–1659.
188. Bera A., Herbert S., Jakob A., Vollmer W., Götz F. Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus* // *Mol Microbiol*. 2004. Vol. 55, № 3. P. 778–787.
189. Raymond J.B., Mahapatra S., Crick D.C., Pavelka M.S. Identification of the namH Gene, Encoding the Hydroxylase Responsible for the N-Glycolylation of the Mycobacterial Peptidoglycan // *JBC*. 2005. Vol. 280, № 1. P. 326–333.
190. Grifoll-Romero L., Sainz-Polo M.A., Albesa-Jové D., Guerin M.E., Biarnés X., Planas A. Structure-function relationships underlying the dual N-acetylmuramic and N-acetylglucosamine specificities of the bacterial peptidoglycan deacetylase PdaC // *JBC*. 2019. Vol. 294, № 50. P. 19066–19080.
191. Neuhaus F.C., Baddiley J. A Continuum of Anionic Charge: Structures and Functions of Alanyl-Teichoic Acids in Gram-Positive Bacteria // *MMBR*. 2003. Vol. 67, № 4. P. 686–723.
192. Ernst C.M., Peschel A. Broad-spectrum antimicrobial peptide resistance by MprF-mediated aminoacylation and flipping of phospholipids // *Mol Microbiol*. 2011. Vol. 80, № 2. P. 290–299.
193. Gonçalves B. V., Portela R., Lobo R., Figueiredo T.A., Grilo I.R., Ludovice A.M., de Lencastre H., Dias J.S., Sobral R.G. Role of MurT C-Terminal Domain in the Amidation

- of *Staphylococcus aureus* Peptidoglycan // Antimicrob Agents Chemother. 2019. Vol. 63, № 10. P. 1–44.
194. Hao P., Liang D., Cao L., Qiao B., Wu H., Caiyin Q., Zhu H., Qiao J. Promoting acid resistance and nisin yield of *Lactococcus lactis* F44 by genetically increasing D-Asp amidation level inside cell wall // Appl Microbiol Biotechnol. 2017. Vol. 101, № 15. P. 6137–6153.
195. Lewis L.A., Choudhury B., Balthazar J.T., Martin L.E., Ram S., Rice P.A., Stephens D.S., Carlson R., Shafer W.M. Phosphoethanolamine Substitution of Lipid A and Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to Cationic Antimicrobial Peptides and Complement-Mediated Killing by Normal Human Serum // Infect Immun. 2009. Vol. 77, № 3. P. 1112–1120.
196. Liu Z., García-Díaz B., Catachio B., Chiancone E., Vogel H.J. Protecting Gram-negative bacterial cell envelopes from human lysozyme: Interactions with Ivy inhibitor proteins from *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* // BBA - Biomembranes. 2015. Vol. 1848, № 11. P. 3032–3046.
197. Callewaert L., Vanderkelen L., Deckers D., Aertsen A., Robben J., Michiels C.W. Detection of a Lysozyme Inhibitor in *Proteus mirabilis* by a New Reverse Zymogram Method // Appl Environ Microbiol. 2008. Vol. 74, № 15. P. 4978–4981.
198. Derbise A., Pierre F., Merchez M., Pradel E., Laouami S., Ricard I., Sirard J.-C., Fritz J., Lemaître N., Akinbi H., Boneca I.G., Sebbane F. Inheritance of the Lysozyme Inhibitor Ivy Was an Important Evolutionary Step by *Yersinia pestis* to Avoid the Host Innate Immune Response // J Infect Dis. 2013. Vol. 207, № 10. P. 1535–1543.
199. Leysen S., Herreweghe J.M., Callewaert L., Heirbaut M., Buntinx P., Michiels C.W., Strelkov S.V. Molecular Basis of Bacterial Defense against Host Lysozymes: X-ray Structures of Periplasmic Lysozyme Inhibitors PliI and PliC // J Mol Biol. 2011. Vol. 405, № 5. P. 1233–1245.
200. Abergel C., Monchois V., Byrne D., Chenivesse S., Lembo F., Lazzaroni J.-C., Claverie J.-M. Structure and evolution of the Ivy protein family, unexpected lysozyme inhibitors in Gram-negative bacteria // PNAS. 2007. Vol. 104, № 15. P. 6394–6399.
201. Clarke C.A., Scheurwater E.M., Clarke A.J. The Vertebrate Lysozyme Inhibitor Ivy Functions to Inhibit the Activity of Lytic Transglycosylase // JBC. 2010. Vol. 285, № 20. P. 14843–14847.

202. Ragland S.A., Humbert M. V., Christodoulides M., Criss A.K. Neisseria gonorrhoeae employs two protein inhibitors to evade killing by human lysozyme // PLoS Pathog. 2018. Vol. 14, № 7. P. e1007080.
203. Leysen S., Herreweghe J.M., Yoneda K., Ogata M., Usui T., Araki T., Michiels C.W., Strelkov S. V. The structure of the proteinaceous inhibitor PliI from *Aeromonas hydrophila* in complex with its target lysozyme // Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2015. Vol. 71, № 2. P. 344–351.
204. Vanderkelen L., Herreweghe J.M., Callewaert L., Michiels C.W. Goose-Type Lysozyme Inhibitor (PliG) Enhances Survival of *Escherichia coli* in Goose Egg Albumen // Appl Environ Microbiol. 2011. Vol. 77, № 13. P. 4697–4699.
205. Okamura E., Hirai M.Y. Novel regulatory mechanism of serine biosynthesis associated with 3-phosphoglycerate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* // Sci Rep. 2017. Vol. 7, № 1. P. 3533–3547.
206. Шеховцова Т.Н., Мугинова С.В., Веселова И.А. Определение ионов металлов с использованием нативных и иммобилизованных ферментов // Рос. хим. ж. 2004. Т. 44, № 4. С. 73–82.
207. Пальмина Н.П., Мальцева Е.Л., Пынзарь Е.И., Бурлакова Е.Б. Модификация активности протеинкиназы С лигандами в сверхмалых концентрациях. Роль протеинкиназы С и ее эффекторов в процессах пероксидного окисления. // Рос. хим. ж. 1999. Т. 43, № 5. С. 55–63.
208. Oishi K., Raynor R.L., Chapp P.A., Kuo J.F. Regulation of protein kinase C by lysophospholipids. Potential role in signal transduction. // JBC. 1988. Vol. 263, № 14. P. 6865–6871.
209. Плакунов В.К. Основы динамической биохимии. М.: Логос, 2020. 216 с.
210. Адунц Г.Т., Саркисян Л.В. Участие некоторых факторов в регуляции активности щелочной фосфатазы. // Биол. ж. Армении. 1973. Т. 26, № 2. С. 22–32.
211. Kaiser E. Inhibition and Activation of Lysozyme // Nature. 1953. Vol. 171, № 4353. P. 607–608.
212. Jolleès P., Saint Blancard J., Charlemagne D., Dianoux A.C., Jollès J., Le Baron J.L. Comparative behaviour of six different lysozymes in the presence of an inhibitor // BBA - Enzymology. 1968. Vol. 151, № 2. P. 532–534.

213. Wenzel M., Lenk H.P., Schuette E. H-3 and its splitting by lysozyme. // Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 1961. Vol. 327. P. 13–20.
214. Watanabe K., Takesue S. Inhibitory Effect of Some Gaseous Hydrocarbons on the Cell-lysis of *Micrococcus lysodeikticus* by Egg-white Lysozyme // Agric Biol Chem. 1972. Vol. 36, № 5. P. 825–830.
215. Swan I.D.A. The inhibition of hen egg-white lysozyme by imidazole and indole derivatives // J Mol Biol. 1972. Vol. 65, № 1. P. 59–62.
216. Hunter T.M., McNae I.W., Simpson D.P., Smith A.M., Moggach S., White F., Walkinshaw M.D., Parsons S., Sadler P.J. Configurations of Nickel-Cyclam Antiviral Complexes and Protein Recognition // Chem. Eur. J. 2007. Vol. 13, № 1. P. 40–50.
217. Salmain M., Blais J.-C., Tran-Huy H., Compain C., Jaouen G. Reaction of hen egg white lysozyme with Fischer-type metallocarbene complexes // Eur J Biochem. 2001. Vol. 268, № 20. P. 5479–5487.
218. Bera A., Biswas R., Herbert S., Kulauzovic E., Weidenmaier C., Peschel A., Götz F. Influence of Wall Teichoic Acid on Lysozyme Resistance in *Staphylococcus aureus* // J Bacteriol. 2007. Vol. 189, № 1. P. 280–283.
219. Smith G.N., Stocker C. Inhibition of crystalline lysozyme. // Arch Biochem Biophys. 1949. Vol. 21, № 2. P. 383–394.
220. Moss J.N., Martin G.J. The inhibition of lysozyme activity // Am J Dig Dis. 1948. Vol. 15, № 12. P. 412–414.
221. Shnitko A. V., Chernysheva M.G., Levashov P.A., Badun G.A. Kinetic analysis as an approach to studying specific features of lysozyme—pluronic complexes // Russ Chem Bull. 2021. Vol. 70, № 7. P. 1400–1403.
222. Kolodkin-Gal I., Romero D., Cao S., Clardy J., Kolter R., Losick R. Amino Acids Trigger Biofilm Disassembly // Science (1979). 2010. Vol. 328, № 5978. P. 627–629.
223. Pfalzgraff A., Brandenburg K., Weindl G. Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential for Bacterial Skin Infections and Wounds // Front Pharmacol. 2018. Vol. 9, № 281. P. 1–23.

224. ElShaer A., Hanson P., Worthington T., Lambert P., Mohammed A.R. Preparation and Characterization of Amino Acids-Based Trimethoprim Salts // *Pharmaceutics*. 2012. Vol. 4, № 1. P. 179–196.
225. Afzal R Mohammed P.H. Preparation and Evaluation of Amino Acid Based Salt Forms of Model Zwitterionic Drug Ciprofloxacin // *J Pharm Drug Deliv Res*. 2013. Vol. 2, № 1. P. 1–18.
226. Lim J., Na W., Kim H., Yeom M., Park G., Kang A., Chun H., Park C., Oh S., Le V.P., Jeong H.H., Song D., Haam S. Cationic Poly(Amino Acid) Vaccine Adjuvant for Promoting Both Cell-Mediated and Humoral Immunity Against Influenza Virus // *Adv Healthc Mater*. 2019. Vol. 8, № 1800953. P. 1–8.
227. Ampornaramveth R.S., Akeatchod N., Lertnukkhid J., Songsang N. Application of D-Amino Acids as Biofilm Dispersing Agent in Dental Unit Waterlines // *Int J Dent*. 2018. Vol. 2018. P. 1–7.
228. Sanchez C.J., Akers K.S., Romano D.R., Woodbury R.L., Hardy S.K., Murray C.K., Wenke J.C. Amino Acids Enhance the Activity of Antimicrobials against Biofilms of Clinical Wound Isolates of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* // *Antimicrob Agents Chemother*. 2014. Vol. 58, № 8. P. 4353–4361.
229. Minami M., Ando T., Hashikawa S., Torii K., Hasegawa T., Israel D.A., Ina K., Kusugami K., Goto H., Ohta M. Effect of Glycine on *Helicobacter pylori* In Vitro // *Antimicrob Agents Chemother*. 2004. Vol. 48, № 10. P. 3782–3788.
230. Dunny G.M., Lee L.N., LeBlanc D.J. Improved electroporation and cloning vector system for gram-positive bacteria // *Appl Environ Microbiol*. 1991. Vol. 57, № 4. P. 1194–1201.
231. Hishinuma F., Izaki K., Takahashi H. Effects of Glycine and d-Amino Acids on Growth of Various Microorganisms // *Agric Biol Chem*. 1969. Vol. 33, № 11. P. 1577–1586.
232. Giordano C., Barnini S. Glycine restores the sensitivity to antibiotics in multidrug-resistant bacteria // *Microbiol Spectr*. 2024. Vol. 12, № 8.
233. Halpern B.P. Glutamate and the Flavor of Foods // *J Nutr*. 2000. Vol. 130, № 4. P. 910–914.

234. Fernstrom J.D. Monosodium Glutamate in the Diet Does Not Raise Brain Glutamate Concentrations or Disrupt Brain Functions // *Ann Nutr Metab.* 2018. Vol. 73, № 5. P. 43–52.
235. Platt S.R. The role of glutamate in central nervous system health and disease – A review // *TVJ.* 2007. Vol. 173, № 2. P. 278–286.
236. Garattini S. Glutamic Acid, Twenty Years Later // *J Nutr.* 2000. Vol. 130, № 4. P. 901–909.
237. Feehily C., Karatzas K.A.G. Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses // *J Appl Microbiol.* 2013. Vol. 114, № 1. P. 11–24.
238. Niu H., Li T., Du Y., Lv Z., Cao Q., Zhang Y. Glutamate Transporters GltS, GltP and GltI Are Involved in *Escherichia coli* Tolerance In Vitro and Pathogenicity in Mouse Urinary Tract Infections // *Microorganisms.* 2023. Vol. 11, № 5. P. 1173–1187.
239. Lu P., Ma D., Chen Y., Guo Y., Chen G.-Q., Deng H., Shi Y. L-glutamine provides acid resistance for *Escherichia coli* through enzymatic release of ammonia // *Cell Res.* 2013. Vol. 23, № 5. P. 635–644.
240. Северьянова Л.А., Долгинцев М.Е. Современные представления о действии аминокислоты L-лизина на нервную и иммунную регуляторные системы // *Человек и его здоровье. Государственное образовательное учреждение «Курский государственный медицинский университет»*, 2007. № 2. С. 63–67.
241. Chang Y.-F., Gao X.-M. L-lysine is a barbiturate-like anticonvulsant and modulator of the benzodiazepine receptor // *Neurochem Res.* 1995. Vol. 20, № 8. P. 931–937.
242. Smriga M., Torii K. Lysine acts like a partial serotonin receptor 4 antagonist and inhibits serotonin-mediated intestinal pathologies and anxiety in rats // *PNAS.* 2003. Vol. 100, № 26. P. 15370–15375.
243. Fujita T., Fujita M., Kodama T., Hada T., Higashino K. Determination of D- and L-Pipecolic Acid in Food Samples Including Processed Foods // *Ann Nutr Metab.* 2003. Vol. 47, № 3–4. P. 165–169.
244. Oxlund H., Barckman M., Ortoft G., Andreassen T.T. Reduced concentrations of collagen cross-links are associated with reduced strength of bone // *Bone.* 1995. Vol. 17, № 4. P. 365–371.

245. Beauman J.G. Genital herpes: a review. // *Am Fam Physician*. 2005. Vol. 72, № 8. P. 1527–1534.
246. Смирнова И.П., Алексеев С.Б., Шевченко А.А. Биосинтез противоопухолевого фермента L-лизин-а-оксидазы *Trichoderma spp* // *Антибиотики и химиотерапия*. Общество с ограниченной ответственностью «Издательство ОКИ», 2009. Т. 54, № 5–6. С. 1–12.
247. Fürst P. Dietary L-lysine supplementation: a promising nutritional tool in the prophylaxis and treatment of osteoporosis. // *Nutrition*. 1993. Vol. 9, № 1. P. 71–72.
248. Kalogeropoulou D., LaFave L., Schweim K., Gannon M.C., Nuttall F.Q. Lysine ingestion markedly attenuates the glucose response to ingested glucose without a change in insulin response // *Am J Clin Nutr*. 2009. Vol. 90, № 2. P. 314–320.
249. Flodin N.W. The metabolic roles, pharmacology, and toxicology of lysine. // *J Am Coll Nutr*. 1997. Vol. 16, № 1. P. 7–21.
250. Hlais S., Reslan D.R.A., Saredidine H.K., Nasreddine L., Taan G., Azar S., Obeid O.A. Effect of Lysine, Vitamin B6, and Carnitine Supplementation on the Lipid Profile of Male Patients With Hypertriglyceridemia: A 12-Week, Open-Label, Randomized, Placebo-Controlled Trial // *Clin Ther*. 2012. Vol. 34, № 8. P. 1674–1682.
251. Kang S.-S., Wong P.W.K., Melyn M.A. Hyperargininemia: Effect of ornithine and lysine supplementation // *J Pediatr*. 1983. Vol. 103, № 5. P. 763–765.
252. Zawoiski E.J. The effect of l-aspartic acid, l-alanine, and hemoglobin on trypan blue-induced embryoletality and gross fetal malformations in gestating albino mice // *Toxicol Appl Pharmacol*. 1977. Vol. 42, № 2. P. 411–416.
253. Mavon A. Acetyl aspartic acid, a novel active ingredient, demonstrates potential to improve signs of skin ageing: from consumer need to clinical proof // *Int J Cosmet Sci*. 2015. Vol. 37. P. 1–2.
254. Bauza M.T., Lagunoff D. Histidine uptake by isolated rat peritoneal mast cells. Effect of inhibition of histidine decarboxylase by α -fluoromethylhistidine // *Biochem Pharmacol*. 1983. Vol. 32, № 1. P. 59–63.
255. Комов В.П., Шведова В.Н. Биохимия. М.: Юрайт, 2023. 684 с.

256. Shinagawa-Kobayashi Y., Kamimura K., Goto R., Ogawa K., Inoue R., Yokoo T., Sakai N., Nagoya T., Sakamaki A., Abe S., Sugitani S., Yanagi M., Fujisawa K., Nozawa Y., Koyama N., Nishina H., Furutani-Seiki M., Sakaida I., et al. Effect of histidine on sorafenib-induced vascular damage: Analysis using novel medaka fish model // *Biochem Biophys Res Commun*. 2018. Vol. 496, № 2. P. 556–561.
257. Matsui T., Ichikawa H., Fujita T., Takemura S., Takagi T., Osada-Oka M., Minamiyama Y. Histidine and arginine modulate intestinal cell restitution via transforming growth factor- β 1 // *Eur J Pharmacol*. 2019. Vol. 850. P. 35–42.
258. Ochoa J.B. Arginine Deficiency Caused by Myeloid Cells: Importance, Identification and Treatment // *Nestle Nutr Inst Workshop Ser*. 2013. Vol. 77. P. 29–45.
259. Kumari N., Bansal S. Arginine depriving enzymes: applications as emerging therapeutics in cancer treatment // *Cancer Chemother Pharmacol*. 2021. Vol. 88, № 4. P. 565–594.
260. Popolo A., Adesso S., Pinto A., Autore G., Marzocco S. L-Arginine and its metabolites in kidney and cardiovascular disease // *Amino Acids*. 2014. Vol. 46, № 10. P. 2271–2286.
261. Verjugina N.I., Chimagomedova A.Sh., Starovoitova I.M., Levin O.S. Endothelial dysfunction in chronic vascular encephalopathy // *S.S. Korsakov J Neur Psychiat*. 2017. Vol. 117, № 6. P. 73–80.
262. Gogoi M., Datey A., Wilson K.T., Chakravorty D. Dual role of arginine metabolism in establishing pathogenesis // *Curr Opin Microbiol*. 2016. Vol. 29. P. 43–48.
263. Eick S., Lussi A. Arginine: A Weapon against Cariogenic Biofilm? // *Monogr Oral Sci* . 2021. Vol. 29. P. 80–90.
264. Reijnierse M., Schwabl C., Klauser A. Imaging of Crystal Disorders: Calcium Pyrophosphate Dihydrate Crystal Deposition Disease, Calcium Hydroxyapatite Crystal Deposition Disease and Gout Pathophysiology, Imaging, and Diagnosis // *Radiol Clin North Am*. 2022. Vol. 60, № 4. P. 641–656.
265. Matikainen N., Pekkarinen T., Ryhänen E.M., Schalin-Jäntti C. Physiology of Calcium Homeostasis // *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2021. Vol. 50, № 4. P. 575–590.
266. Raisz L.G. Calcium regulation // *Clin Biochem*. 1981. Vol. 14, № 5. P. 209–212.
267. Moore P.B., Dedman J.R. Calcium binding proteins and cellular regulation // *Life Sci*. 1982. Vol. 31, № 26. P. 2937–2946.

268. Peterlik M., Cross H.S. Vitamin D and calcium deficits predispose for multiple chronic diseases // *Eur J Clin Invest*. 2005. Vol. 35, № 5. P. 290–304.
269. Muñoz-Torres M., García-Martín A. Hiperparatiroidismo primario // *Med Clin (Barc)*. 2018. Vol. 150, № 6. P. 226–232.
270. Gao Y., Patil S., Jia J. The Development of Molecular Biology of Osteoporosis // *Int J Mol Sci*. 2021. Vol. 22, № 15. P. 8182–8205.
271. Hover B.M., Kim S.-H., Katz M., Charlop-Powers Z., Owen J.G., Ternei M.A., Maniko J., Estrela A.B., Molina H., Park S., Perlin D.S., Brady S.F. Culture-independent discovery of the malacidins as calcium-dependent antibiotics with activity against multidrug-resistant Gram-positive pathogens // *Nat Microbiol*. 2018. Vol. 3, № 4. P. 415–422.
272. Thomas K.J., Rice C. V. Revised model of calcium and magnesium binding to the bacterial cell wall // *BioMetals*. 2014. Vol. 27, № 6. P. 1361–1370.
273. Eagon R.G. Ultrastructure of the Cell Envelope of *Pseudomonas aeruginosa*: Electron Microscopic and Chemical Observations // *J Infect Dis*. 1974. Vol. 130. P. 65–80.
274. Eagon R.G. Cell wall-associated inorganic substances from *Pseudomonas aeruginosa* // *Can J Microbiol*. 1969. Vol. 15, № 2. P. 235–236.
275. Leive L. The barrier function of the gram-negative envelope // *Ann N Y Acad Sci*. 1974. Vol. 235, № 1 Mode of Actio. P. 109–129.
276. Cox Jr. S.T., Eagon R.G. Action of ethylenediaminetetraacetic acid, tris(hydroxymethyl)aminomethane, and lysozyme on cell walls of *Pseudomonas aeruginosa* // *Can J Microbiol*. 1968. Vol. 14, № 8. P. 913–922.
277. Anraku Y., Heppel L.A. On the Nature of the Changes Induced in *Escherichia coli* by Osmotic Shock // *JBC*. 1967. Vol. 242, № 10. P. 2561–2569.
278. Pavlasova E., Harold F.M. Energy Coupling in the Transport of β -Galactosides by *Escherichia Coli*: Effect of Proton Conductors // *J Bacteriol*. 1969. Vol. 98, № 1. P. 198–204.
279. Tsuge H., Ago H., Noma M., Nitta K., Sugai S., Miyano M. Crystallographic Studies of a Calcium Binding Lysozyme from Equine Milk at 2.5 Å Resolution // *J Biochem*. 1992. Vol. 111, № 2. P. 141–143.

280. Postgate J.R. Chapter XVIII Viable counts and Viability. Sussex, Falmer: University of Sussex, England, 1969. P. 611–628.
281. Hafner F. Cytosensor Microphysiometer: technology and recent applications // *Biosens Bioelectron.* 2000. Vol. 15, № 3–4. P. 149–158.
282. Richards J.C.S., Jason A.C., Hobbs G., Gibson D.M., Christie R.H. Electronic measurement of bacterial growth // *J Phys E.* 1978. Vol. 11, № 6. P. 560–568.
283. Lorenzelli L., Margesin B., Martinoia S., Tedesco M.T., Valle M. Bioelectrochemical signal monitoring of in-vitro cultured cells by means of an automated microsystem based on solid state sensor-array // *Biosens Bioelectron.* 2003. Vol. 18, № 5–6. P. 621–626.
284. Левашов П.А., Попов Д.В., Попова В.М., Жиленков Е.Л., Морозова О.А., Белогурова Н.Г., Седов С.А., Дятлов И.А., Клячко Н.Л., Левашов А.В. Бактериолитические ферменты фага SPZ7: выделение и свойства // *Биохимия.* 2010. Vol. 75, № 9. P. 1299–1304.
285. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *JBC.* 1951. Vol. 193, № 1. P. 265–275.
286. Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding // *Anal Biochem.* 1976. Vol. 72, № 1–2. P. 248–254.
287. Goldring J.P.D. Spectrophotometric Methods to Determine Protein Concentration // *Methods Mol Biol.* 2015. Vol. 1312. P. 41–47.
288. Berg E.A., Fishman J.B. Labeling Antibodies // *Cold Spring Harb Protoc.* 2020. Vol. 2020, № 7. P. 252–263.
289. Laverman P., McBride W.J., Sharkey R.M., Goldenberg D.M., Boerman O.C. Al(18) F labeling of peptides and proteins // *J Labelled Comp Radiopharm.* 2014. Vol. 57, № 4. P. 219–223.
290. Amodio E., Dino C. Use of ATP bioluminescence for assessing the cleanliness of hospital surfaces: A review of the published literature (1990–2012) // *J Infect Public Health.* 2014. Vol. 7, № 2. P. 92–98.
291. Shama G., Malik D.J. The uses and abuses of rapid bioluminescence-based ATP assays // *Int J Hyg Environ Health.* 2013. Vol. 216, № 2. P. 115–125.

292. McKinnon K.M. Flow Cytometry: An Overview // *Curr Protoc Immunol*. 2018. Vol. 120, № 1. P. 1–11.
293. Pozarowski P., Darzynkiewicz Z. Analysis of Cell Cycle by Flow Cytometry // *Methods Mol Biol*. New Jersey: Humana Press, 2004. Vol. 281. P. 301–312.
294. Flaender M., den Dulk R., Flegeau V., Ventosa J., Delapierre G., Berthier J., Bourdat A.-G. Grinding Lysis (GL): A microfluidic device for sample enrichment and mechanical lysis in one // *Sens Actuators B Chem*. 2018. Vol. 258. P. 148–155.
295. Takayama K., Kurosaki T., Ikeda T. Mediated electrocatalysis at a biocatalyst electrode based on a bacterium, *Gluconobacter industrius* // *JEAC*. Elsevier, 1993. Vol. 356, № 1–2. P. 295–301.
296. Ercole C., Del Gallo M., Mosiello L., Baccella S., Lepidi A. *Escherichia coli* detection in vegetable food by a potentiometric biosensor // *Sens Actuators B Chem*. 2003. Vol. 91, № 1–3. P. 163–168.
297. Hernández R., Vallés C., Benito A.M., Maser W.K., Xavier Rius F., Riu J. Graphene-based potentiometric biosensor for the immediate detection of living bacteria // *Biosens Bioelectron*. 2014. Vol. 54. P. 553–557.
298. Clotilde L.M., Bernard C., Salvador A., Lin A., Lauzon C.R., Muldoon M., Xu Y., Lindpaintner K., Carter J.M. A 7-plex microbead-based immunoassay for serotyping Shiga toxin-producing *Escherichia coli* // *J Microbiol Methods*. 2013. Vol. 92, № 2. P. 226–230.
299. Wan Y., Zhang D., Hou B. Selective and specific detection of sulfate-reducing bacteria using potentiometric stripping analysis // *Talanta*. 2010. Vol. 82, № 4. P. 1608–1611.
300. Obuchowska A. Quantitation of bacteria through adsorption of intracellular biomolecules on carbon paste and screen-printed carbon electrodes and voltammetry of redox-active probes // *Anal Bioanal Chem*. 2008. Vol. 390, № 5. P. 1361–1371.
301. Tabatabaei M.S., Ahmed M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) // *Methods Mol Biol*. 2022. Vol. 2508. P. 115–134.
302. Libby J.M., Wada H.G. Detection of *Neisseria meningitidis* and *Yersinia pestis* with a novel silicon-based sensor // *J Clin Microbiol*. American Society for Microbiology (ASM), 1989. Vol. 27, № 7. P. 1456–1459.

303. Helal R., Melzig M.F. Determination of lysozyme activity by a fluorescence technique in comparison with the classical turbidity assay // *Pharmazie*. 2008. Vol. 63, № 6. P. 415–419.
304. Gorin G., Wang S.-F., Papapavlou L. Assay of lysozyme by its lytic action on *M. lysodeikticus* cells // *Anal Biochem*. 1971. Vol. 39, № 1. P. 113–127.
305. Matsuzaki K., Murase O., Sugishita K., Yoneyama S., Akada K., Ueha M., Nakamura A., Kobayashi S. Optical characterization of liposomes by right angle light scattering and turbidity measurement // *BBA - Biomembranes*. 2000. Vol. 1467, № 1. P. 219–226.
306. Lindqvist R. Estimation of *Staphylococcus aureus* Growth Parameters from Turbidity Data: Characterization of Strain Variation and Comparison of Methods // *Appl Environ Microbiol*. 2006. Vol. 72, № 7. P. 4862–4870.
307. Robrish S.A., LeRoy A.F., Chassy B.M., Wilson J.J., Krichevsky M.I. Use of a Fiber Optic Probe for Spectral Measurements and the Continuous Recording of the Turbidity of Growing Microbial Cultures // *Appl Microbiol*. 1971. Vol. 21, № 2. P. 278–287.
308. Li R.C., Nix D.E., Schentag J.J. New turbidimetric assay for quantitation of viable bacterial densities // *Antimicrob Agents Chemother*. 1993. Vol. 37, № 2. P. 371–374.
309. Carvalho M.E., Gonçalves M.H., Silva M.T. A turbidimetric and electron microscopic study of the effects of several parameters on the lysis of *Streptococcus faecalis* by lysozyme // *Can J Microbiol*. 1984. Vol. 30, № 7. P. 905–915.
310. Mai W., Hu C. Molecular cloning, characterization, expression and antibacterial analysis of a lysozyme homologue from *Fenneropenaeus merguensis* // *Mol Biol Rep*. 2009. Vol. 36, № 6. P. 1587–1595.
311. Матолыгина Д.А., Душутина Н.С., Овчинникова Е.Д., Еремеев Н.Л., Белогурова Н.Г., Атрошенко Д.Л., Смирнов С.А., Савин С.С., Тишков В.И., Левашов А.В., Левашов П.А. Единый подход для расчета скорости ферментативного лизиса живых бактериальных клеточных субстратов турбидиметрическим методом // *Вестн. Моск. ун-та. Сер 2. Химия*. 2018. Т. 59, № 2. С. 125–131.
312. Leive L. The barrier function of the gram-negative envelope // *Ann N Y Acad Sci*. 1974. Vol. 235, № 1. P. 109–129.

313. Saint-Blancard J., Jollès P. Comportement cinétique de plusieurs lysozymes en fonction du pH et de la force ionique vis-à-vis de *Micrococcus lysodeikticus* // Biochimie. 1972. Vol. 54, № 1. P. 7–15.
314. Matolygina D.A., Osipova H.E., Smirnov S.A., Belogurova N.G., Ereemeev N.L., Tishkov V.I., Levashov A. V., Levashov P.A. Determination of the activity of bacteriolytic enzymes and measurement of their sorption in the system of living cells of *Lactobacillus plantarum* // Mosc Univ Chem Bull. 2015. Vol. 70, № 6. P. 292–297.
315. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual / ed. Sambrook J. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1987. 1546 p.
316. Albert Lauwers, Simon Scharpé. Pharmaceutical Enzymes. Taylor & Francis, 1997. 408 p.
317. Levashov P.A., Matolygina D.A., Osipova H.E., Savin S.S., Zaharova G.S., Gasanova D.A., Belogurova N.G., Ovchinnikova E.D., Smirnov S.A., Tishkov V.I., Levashov A. V. Comparison of bacteriolytic activity of human interleukin-2 and chicken egg lysozyme on *Lactobacillus plantarum* and *Escherichia coli* cells // Mosc Univ Chem Bull. 2015. Vol. 70, № 6. P. 287–291.
318. Procter J.B., Carstairs G.M., Soares B., Mourão K., Ofoegbu T.C., Barton D., Lui L., Menard A., Sherstnev N., Roldan-Martinez D., Duce S., Martin D.M.A., Barton G.J. Alignment of Biological Sequences with Jalview. 2021. P. 203–224.
319. Grosdidier A., Zoete V., Michielin O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS // Nucleic Acids Res. 2011. Vol. 39, № suppl. P. 270–277.
320. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Meng E.C., Couch G.S., Croll T.I., Morris J.H., Ferrin T.E. UCSF ChimeraX : Structure visualization for researchers, educators, and developers // Protein Science. 2021. Vol. 30, № 1. P. 70–82.
321. Gushchina I. V., Polenova A.M., Suplatov D.A., Švedas V.K., Nilov D.K. vsFilt: A Tool to Improve Virtual Screening by Structural Filtration of Docking Poses // J Chem Inf Model. 2020. Vol. 60, № 8. P. 3692–3696.
322. Eberhardt J., Santos-Martins D., Tillack A.F., Forli S. AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings // J Chem Inf Model. 2021. Vol. 61, № 8. P. 3891–3898.

323. Irwin J., Shoichet B. ZINC – A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening // *J. Chem. Inf. Model.* 2005. Vol. 45, № 1. P. 177–182.
324. Awale M., Jin X., Reymond J.-L. Stereoselective virtual screening of the ZINC database using atom pair 3D-fingerprints // *J Cheminform.* 2015. Vol. 7, № 1. P. 3–18.
325. O’Boyle N.M., Banck M., James C.A., Morley C., Vandermeersch T., Hutchison G.R. Open Babel: An open chemical toolbox // *J Cheminform.* 2011. Vol. 3, № 1. P. 33–44.
326. Grosdidier A., Zoete V., Michielin O. Fast docking using the CHARMM force field with EADock DSS // *J Comput Chem.* 2011. Vol. 32, № 10. P. 2149–2159.
327. Brooks B.R., Brooks C.L., Mackerell A.D., Nilsson L., Petrella R.J., Roux B., Won Y., Archontis G., Bartels C., Boresch S., Caflisch A., Caves L., Cui Q., Dinner A.R., Feig M., Fischer S., Gao J., Hodoseck M., et al. CHARMM: The biomolecular simulation program // *J Comput Chem.* 2009. Vol. 30, № 10. P. 1545–1614.
328. Haberthür U., Caflisch A. FACTS: Fast analytical continuum treatment of solvation // *J Comput Chem.* 2008. Vol. 29, № 5. P. 701–715.
329. Drożdż R., Naskalski J.W. Lysozyme oligomers as a molecular mass standard for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis // *Anal Biochem.* 1988. Vol. 171, № 2. P. 419–422.
330. Gorbenko G., Trusova V. Effects of oligomeric lysozyme on structural state of model membranes // *Biophys Chem.* 2011. Vol. 154, № 2–3. P. 73–81.
331. Бухарин О.В., Васильев Н.В. Лизоцим и его роль в биологии и медицине. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1974. 209 с.
332. Brade H., Brade L., Rietschel E.Th. Structure-activity relationships of Bacterial lipopolysaccharides (Endotoxins) // *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A.* 1988. Vol. 268, № 2. P. 151–179.
333. Вахитов Т. Я., Полевая Е.В., Шалаева О.Н. Средство, ингибирующее жизнедеятельность бактерий *Escherichia coli* O75 №5557 (варианты): пат. RU2524138C2 USA. Россия, 2014. С. 1–12.
334. Wang S.-W., Wang T.-Y. Study on Antibacterial Activity and Structure of Chemically Modified Lysozyme // *Molecules.* 2022. Vol. 28, № 1. P. 95–107.

335. Ye Y., Klimchuk S., Shang M., Niu J. Improved antibacterial performance using hydrogel-immobilized lysozyme as a catalyst in water // RSC Adv. 2019. Vol. 9, № 35. P. 20169–20173.
336. Sgibnev A. V., Kremleva E.A. Vaginal lactobacilli regulate the activity of muramidase via hydrogen peroxide and surfactants // Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology. 2018. Vol. 95, № 4. P. 21–27.
337. Callewaert L., Aertsen A., Deckers D., Vanoirbeek K.G.A., Vanderkelen L., Van Herreweghe J.M., Masschalck B., Nakimbugwe D., Robben J., Michiels C.W. A New Family of Lysozyme Inhibitors Contributing to Lysozyme Tolerance in Gram-Negative Bacteria // PLoS Pathog. 2008. Vol. 4, № 3. P. e1000019.
338. Yum S., Kim M.J., Xu Y., Jin X.L., Yoo H.Y., Park J.-W., Gong J.H., Choe K.-M., Lee B.L., Ha N.-C. Structural basis for the recognition of lysozyme by MliC, a periplasmic lysozyme inhibitor in Gram-negative bacteria // Biochem Biophys Res Commun. 2009. Vol. 378, № 2. P. 244–248.
339. Murao S., Kato M., Wang S.-L., Hoshino M., Arai M. Isolation and Characterization of a Novel Hen Egg White Lysozyme Inhibitor from *Bacillus subtilis* I-139 // Agric Biol Chem. 1990. Vol. 54, № 5. P. 1129–1136.
340. Wang S.-L., Murao S., Arai M. Some Properties of Hen Egg White Lysozyme Inhibitor from *Bacillus subtilis* I-139 // Agric Biol Chem. 1990. Vol. 54, № 9. P. 2447–2448.
341. Leysen S., Van Herreweghe J.M., Callewaert L., Heirbaut M., Buntinx P., Michiels C.W., Strelkov S.V. Molecular Basis of Bacterial Defense against Host Lysozymes: X-ray Structures of Periplasmic Lysozyme Inhibitors PliI and PliC // J Mol Biol. 2011. Vol. 405, № 5. P. 1233–1245.
342. Van Herreweghe J.M., Vanderkelen L., Callewaert L., Aertsen A., Compernelle G., Declerck P.J., Michiels C.W. Lysozyme inhibitor conferring bacterial tolerance to invertebrate type lysozyme // Cellular and Molecular Life Sciences. 2010. Vol. 67, № 7. P. 1177–1188.
343. Leysen S., Vanderkelen L., Van Asten K., Vanheuverzwijn S., Theuwis V., Michiels C.W., Strelkov S. V. Structural characterization of the PliG lysozyme inhibitor family // J Struct Biol. 2012. Vol. 180, № 1. P. 235–242.

344. Vanderkelen L., Van Herreweghe J.M., Callewaert L., Michiels C.W. Goose-Type Lysozyme Inhibitor (PliG) Enhances Survival of *Escherichia coli* in Goose Egg Albumen // *Appl Environ Microbiol.* 2011. Vol. 77, № 13. P. 4697–4699.
345. Müller I., Gernold M., Schneider B., Geider K. Expression of Lysozymes from *Erwinia amylovora*; Phages and Erwinia; Genomes and Inhibition by a Bacterial Protein // *Microb Physiol.* 2012. Vol. 22, № 1. P. 59–70.
346. Azam M.W., Khan A.U. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa* // *Drug Discov Today.* 2019. Vol. 24, № 1. P. 350–359.
347. Herrera-Espejo S., Domínguez-Miranda J.L., Rodríguez-Mogollo J.I., Pachón J., Cordero E., Pachón-Ibáñez M.E. Effects of pH on the Pathogenicity of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* on the Kidney: In Vitro and In Vivo Studies // *Int J Mol Sci.* 2024. Vol. 25, № 14. P. 7925.
348. Shah D., Shaikh A.R., Peng X., Rajagopalan R. Effects of arginine on heat-induced aggregation of concentrated protein solutions // *Biotechnol Prog.* 2011. Vol. 27, № 2. P. 513–520.
349. Yoshimura K., Toibana A., Nakahama K. Human lysozyme: Sequencing of a cDNA, and expression and secretion by *Saccharomyces cerevisiae* // *Biochem Biophys Res Commun.* 1988. Vol. 150, № 2. P. 794–801.
350. Liu Y., Xu J., Han L., Liu Q., Yang Y., Li Z., Lu Z., Zhang H., Guo T., Liu Q. Theoretical Research on Excited States: Ultraviolet and Fluorescence Spectra of Aromatic Amino Acids // *Interdiscip Sci.* 2020. Vol. 12, № 4. P. 530–536.
351. Whitfield C., Williams D.M., Kelly S.D. Lipopolysaccharide O-antigens—bacterial glycans made to measure // *Journal of Biological Chemistry.* 2020. Vol. 295, № 31. P. 10593–10609.
352. Guo H., Yi W., Shao J., Lu Y., Zhang W., Song J., Wang P.G. Molecular Analysis of the O-Antigen Gene Cluster of *Escherichia coli* O86:B7 and Characterization of the Chain Length Determinant Gene (*wzz*) // *Appl Environ Microbiol.* 2005. Vol. 71, № 12. P. 7995–8001.
353. Franco A. V., Liu D., Reeves P.R. A Wzz (Cld) protein determines the chain length of K lipopolysaccharide in *Escherichia coli* O8 and O9 strains // *J Bacteriol.* 1996. Vol. 178, № 7. P. 1903–1907.

354. Holst O., Müller-Loennies S., Lindner B., Brade H. Chemical structure of the lipid A of *Escherichia coli* J-5 // Eur J Biochem. 1993. Vol. 214, № 3. P. 695–701.
355. Javed A., Balhuizen M.D., Pannekoek A., Bikker F.J., Heesterbeek D.A.C., Haagsman H.P., Broere F., Weingarh M., Veldhuizen E.J.A. Effects of *Escherichia coli* LPS Structure on Antibacterial and Anti-Endotoxin Activities of Host Defense Peptides // Pharmaceuticals. 2023. Vol. 16, № 10. P. 1485–1501.
356. Wang C., Nelson T., Chen D., Ellis J.C., Abbott N.L. Understanding lipopolysaccharide aggregation and its influence on activation of Factor C // J Colloid Interface Sci. 2019. Vol. 552. P. 540–553.