

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М. В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*



**Скребкова Анна Сергеевна**

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

1.4.13. – Радиохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2023

Диссертация подготовлена в лаборатории радионуклидов и меченых соединений кафедры радиохимии химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

**Научные руководители** – **Бадун Геннадий Александрович** – кандидат химических наук, доцент

**Чернышева Мария Григорьевна** – доктор химических наук, доцент

**Официальные оппоненты** – **Шевченко Валерий Павлович** - доктор химических наук, ведущий научный сотрудник НИЦ "Курчатовский институт", Москва

**Матвеев Владимир Николаевич** – доктор химических наук, профессор, профессор кафедры коллоидной химии химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

**Герман Константин Эдуардович** – доктор химических наук, заведующий лабораторией химии технеция Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физической химии и электрохимии имени А.Н. Фрумкина РАН

Защита диссертации состоится «7» июня 2023 г. в 14 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.014.6 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 10, ауд. 308.

E-mail: severin@radio.chem.msu.ru (А.В. Северин, ученый секретарь диссертационного совета); skrebkova.a@gmail.com (соискатель)

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д.27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/014.6/2486>.

Автореферат разослан «\_\_\_» апреля 2023 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат химических наук



А.В. Северин

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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

**Степень разработанности темы.** Несмотря на то, что количество исследований взаимодействия белков с ЛС растет, исследований взаимодействий ЛС с лизоцимом сравнительно немного. В основном исследования сосредоточены на одном веществе или нескольких веществах, обладающих схожей структурой. Преимущественно исследуется влияние ЛС на флуоресценцию лизоцима, что позволяет сделать вывод об изменении микроокружения вокруг аминокислотных остатков триптофана и, в некоторых случаях, рассчитать константу взаимодействия. Поэтому имеющиеся данные носят фрагментарный характер, также не разработан комплексный подход к исследованию таких взаимодействий. К тому же все исследования проводились в объеме водной фазы и не затрагивали способность проникать через межфазную границу водный раствор-органическая жидкость, которую можно рассматривать как модель клеточной мембраны.

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

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

#### **Научная новизна работы**

1. Впервые получен меченный тритием левофлоксацин, а также разработана методика доочистки меченного тритием амикацина, позволяющая получать препараты с содержанием примесей менее 0,1%, что критически важно для их использования в методе сцинтиллирующей фазы.
2. Усовершенствована методика исследования комплексов лизоцима с ЛС с помощью обработки атомарным тритием безводных смесей веществ с последующим анализом распределения трития по аминокислотным остаткам белка с помощью тотального гидролиза и трипсинолиза.
3. Впервые применен комплексный подход, включающий метод радиоактивных индикаторов и спектроскопические методы анализа, для описания взаимодействия лизоцима с поверхностно-инактивными веществами.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Совокупность данных, получаемых с помощью метода сцинтиллирующей фазы и межфазного натяжения на границе водный раствор/*n*-ксилол и водный раствор/воздух, позволяет рассчитать состав сложного адсорбционного слоя для смеси лизоцима с лекарственными средствами различной химической природы на границе водный раствор/воздух, в том числе для веществ, не обладающих поверхностно-активными свойствами на границе раздела с воздухом.
2. Комплексный подход, включающий радиохимические и спектрофотометрические методы исследования, а также молекулярный докинг, позволил выявить места контактов лизоцима и лекарственных средств мирамистина, амикацина, левофлоксацина и даларгина.

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

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

**Теоретическая и практическая значимость.** Применение меченных тритием соединений и метода тритиевого зонда расширяет возможности радиохимических методов при проведении биохимических исследований. Разработана экспериментальная методика определения центра связывания белка с ЛС. Метод тритиевого зонда, включающий использование меченных тритием соединений как индикатора количества вещества в составе смешенного адсорбционного слоя, успешно применен для исследования взаимодействия белок-пептид. Использованный комплексный подход позволяет получить информацию о взаимодействии белков с ЛС, как в объеме водной фазы, так и на границе раздела водный раствор/*n*-ксилол. Данная информация может быть использована при разработке новых лекарственных средств.

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

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

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

**Личный вклад** автора включает проведение экспериментов по исследованию поведения лизоцима и лекарственных средств в двухфазной системе водный раствор/*n*-ксилол с помощью метода сцинтиллирующей фазы; снятие спектров флуоресценции; измерение ферментативной активности лизоцима и обработка

полученных результатов. Анализ распределения трития в аминокислотных остатках лизоцима проведен совместно с к.х.н. Ксенофонтовым А.Л. Спектры кругового дихроизма получены и проинтерпретированы совместно с к.ф.-м.н. Арутюняном А.М. ВЭЖХ-МС анализ триптических пептидов проводили совместно с к.х.н. Байгильдиевым Т.М. Исследование совместной адсорбции лизоцима с амикацином и даларгином, а также влияния амикацина и даларгина на флуоресценцию и ферментативную активность лизоцима проведено совместно с Касперович А.В.

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

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

**Объем и структура работы.** Диссертационная работа состоит из введения, трех глав («Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение»), заключения и выводов. Объем работы составляет 158 страниц, содержит 47 рисунков и 12 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 308 источников.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** представлена актуальность работы, сформулированы цель и основные задачи, отражены новизна и положения, выносимые на защиту, также научная и практическая значимость, приведены сведения об апробации основных результатов и список публикаций по теме.

**Первая глава** посвящена литературному обзору и состоит из трех частей. В первой части рассматривается взаимодействие белков с биологически активными веществами. В ней представлены: направления таких исследований, выбор модельного белка, исследования, где в качестве модельного белка выступает лизоцим, кратко рассмотрены применяемые методы. Вторая часть посвящена адсорбции белков на межфазной границе и методам по изучению адсорбции. В третьей части описаны методы получения меченых

веществ и радиохимические методы, которые применяют для исследования взаимодействия белков с лигандами: тритиевая планиграфия и МСФ.

Во **второй главе** описаны используемые в работе материалы и методы: получение меченных тритием лизоцима и ЛС; МСФ; метод тритиевого зонда с определением распределения трития по пептидам и аминокислотным остаткам лизоцима; методы молекулярной спектроскопии (флуоресцентная спектроскопия и спектроскопия кругового дихроизма); определение поверхностного натяжения и ферментативной активности лизоцима по отношению к *Micrococcus luteus*.

В **третьей главе** приведены результаты и их обсуждение.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

С помощью метода термической активации трития были получены меченые соединения: лизоцим, мирамистин, амикацин, левофлоксацин и даларгин. Приведены данные по их очистке от радиоактивных примесей и удельная активность очищенных препаратов.

Взаимное влияние при конкурентной адсорбции на межфазной границе водный раствор<sup>1</sup>/*n*-ксилол<sup>2</sup> было исследовано с помощью МСФ и метода висящей капли. Коэффициенты распределения ЛС индивидуально и в присутствии лизоцима приведены в Таблице 1. Лизоцим не оказывает влияния на коэффициенты распределения левофлоксацина и даларгина, но приводит к снижению коэффициента распределения мирамистина и амикацина, что указывает на возможность образования комплекса с лизоцимом. При этом присутствие мирамистина и даларгина во всей изученной области концентраций не оказывает влияния на коэффициент распределения лизоцима, а добавка левофлоксацина во всем исследуемом диапазоне концентраций и амикацина в области концентраций  $8,5 \times 10^{-4}$  М –  $4,3 \times 10^{-2}$  М снижает коэффициент распределения лизоцима на ~20%, что можно объяснить образованием гидрофильных комплексов амикацин – лизоцим и левофлоксацин – лизоцим.

При объемной концентрации лизоцима 0,01 г/л его адсорбция на границе водный раствор/*n*-ксилол составляла  $(1,5 \pm 0,2)$  мг/м<sup>2</sup>. Добавление амикацина и даларгина не оказывало влияния на адсорбцию лизоцима, а в смеси с левофлоксацином с концентрацией выше 100 мкмоль/л адсорбция лизоцима несколько снижалась (Рис. 1). В присутствии мирамистина максимум адсорбции лизоцима наблюдался в области соотношения белок-лиганд 1:1, что, вероятно, связано с образованием комплекса состава 1:1, который обладает

---

<sup>1</sup> раствор вещества в фосфатно-солевом буфере (PBS) с pH  $7,3 \pm 0,1$

<sup>2</sup> *n*-ксилол с добавкой 2,5-дифениллоксазола 8 г/л

более высокой способностью к адсорбции на межфазной границе, чем свободный белок. Данное предположение подтвердили проведением аналогичных экспериментов при более высоких концентрациях лизоцима в объеме водной фазы – 0,1 г/л и 0,5 г/л ( $7,0 \times 10^{-6}$  М и  $3,5 \times 10^{-5}$  М), однако наблюдаемый эффект становится менее выраженным, что связано с вытеснением белка из адсорбционного слоя при высоких концентрациях мирамистина.

Таблица 1 – Значения коэффициентов распределения ЛС в системе водный раствор/*n*-ксилол

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

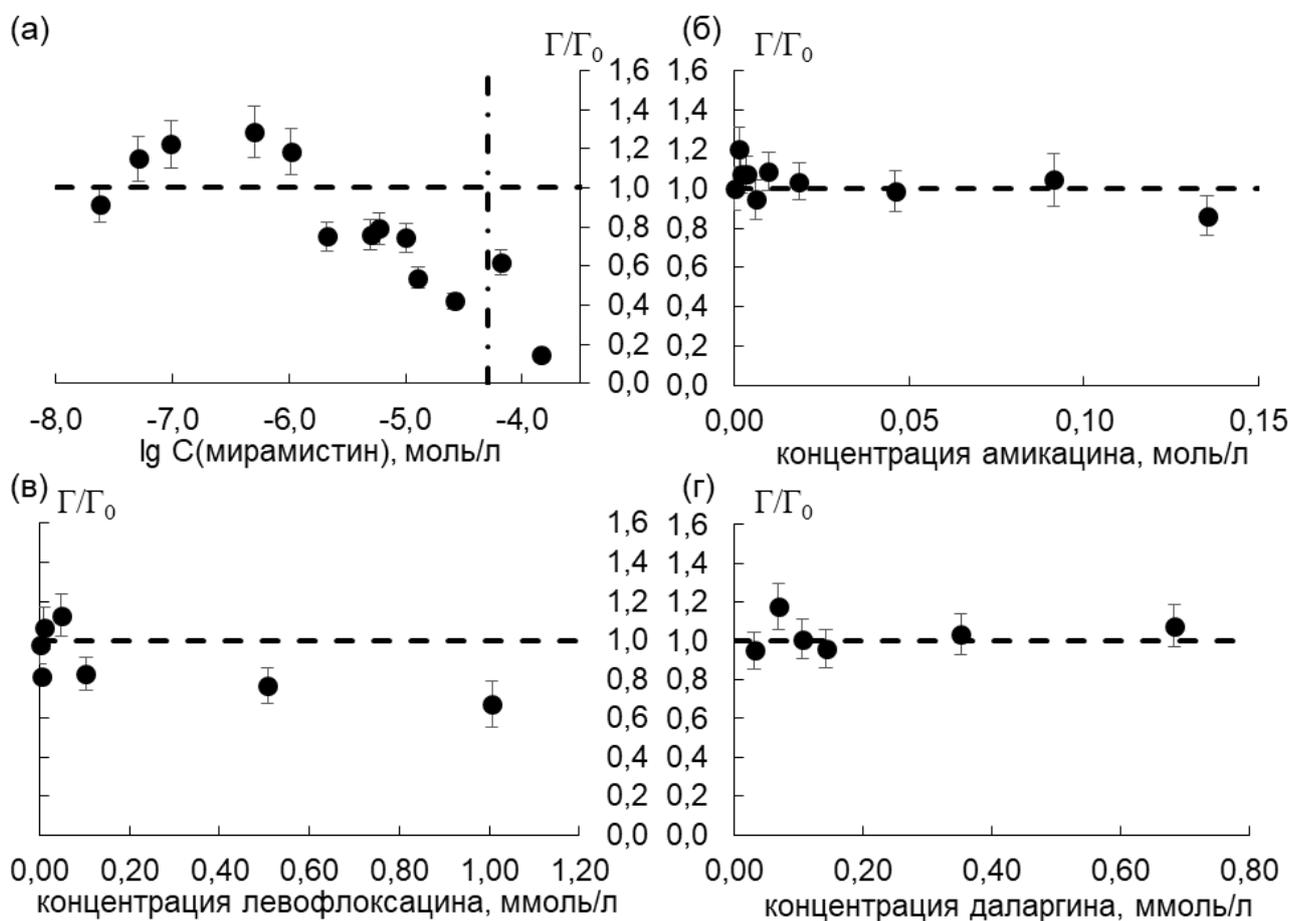


Рис. 1. – Влияние добавок ЛС на адсорбцию лизоцима (относительно адсорбции лизоцима без добавок- $\Gamma_0$ ): (а) мирамистин, перпендикулярной штрихпунктирной линией показано значение критической концентрации мицеллообразования (ККМ); (б) амикацин; (в) левифлоксацин; (г) даларгин. Пунктирной линией показана адсорбция лизоцима без добавок. Концентрация лизоцима 0,01 г/л ( $7,0 \times 10^{-7}$  М).

На Рис. 2 приведены изотермы адсорбции ЛС индивидуально и в присутствии лизоцима (0,01 г/л) на межфазной границе водный раствор/*n*-ксилол, определенные с помощью МСФ.

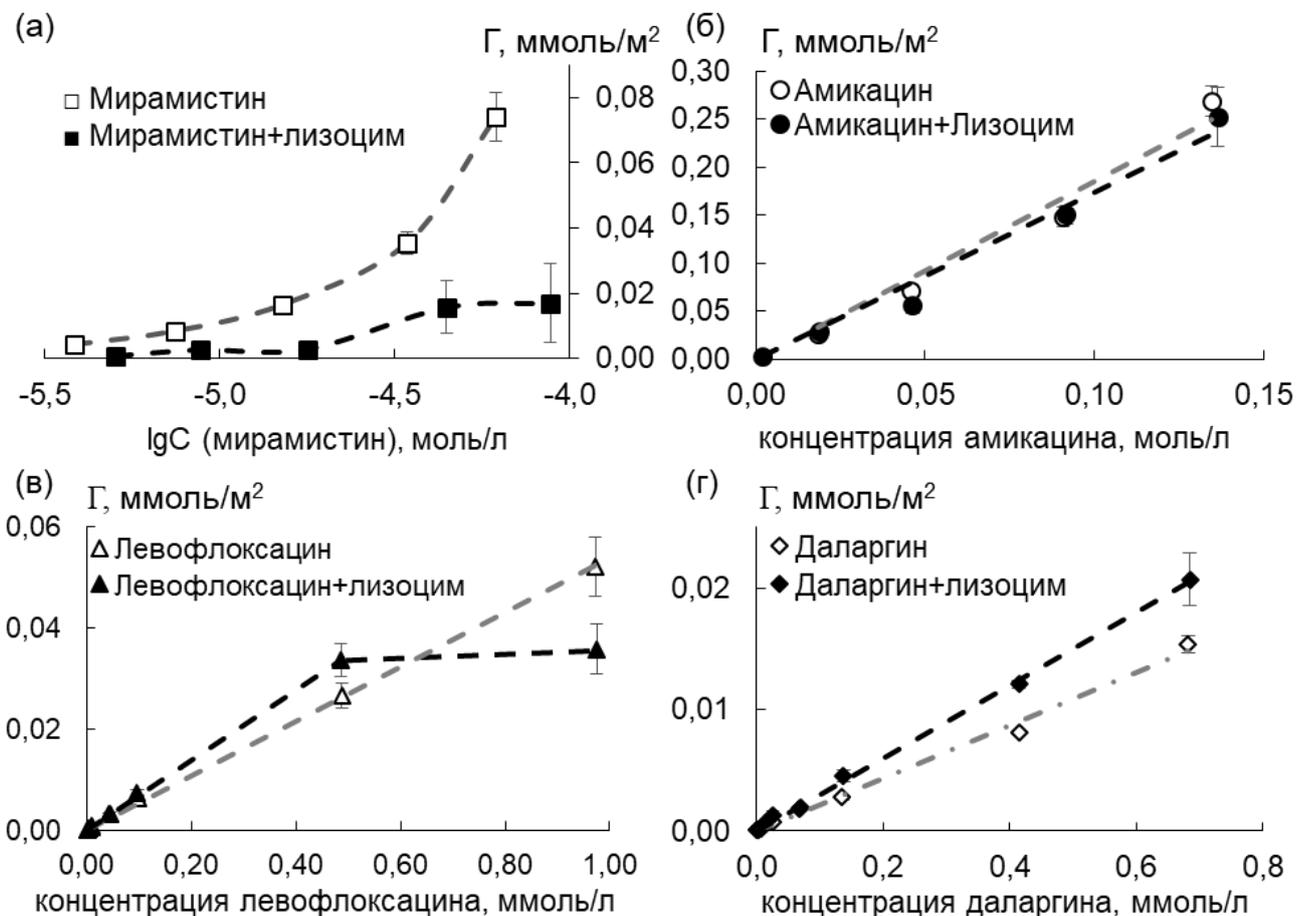


Рис. 2. – Адсорбция ЛС на межфазной границе водный раствор – *n*-ксилол для индивидуального вещества и в присутствии лизоцима в концентрации 0,01 г/л.

В присутствии лизоцима адсорбция мирамистина уменьшается в 4-5 раз. Взаимное уменьшение адсорбции можно объяснить электростатическим отталкиванием, когда количество молекул мирамистина в водном растворе превышает количество молекул белка, образуется «гидратированный комплекс лизоцим-мирамистин» (не эквимольного состава), который покидает адсорбционный слой. Лизоцим вызывает уменьшение содержания мирамистина не только в адсорбционном слое, но и в органической фазе.

Лизоцим не оказывает влияния на концентрирование амикацина в поверхностном слое во всем исследуемом диапазоне концентраций. До определенного момента лизоцим увеличивает адсорбцию левофлоксацина на межфазной границе водный раствор – *n*-ксилол. Данный эффект можно объяснить образованием комплекса лизоцим-левофлоксацин. При дальнейшем увеличении концентрации левофлоксацина происходит

конкурентная адсорбция лизоцима и левофлоксацина. Адсорбция даларгина в присутствии лизоцима также возрастает.

Описание адсорбции проводили с использованием модели, предложенной В.Б. Файнерманом и сотр. для описания смешанных слоев белок - поверхностно-активное вещество [2]. Ранее модель Файнермана в совокупности с данными, полученными МСФ, применили для получения параметров межмолекулярного взаимодействия в смешанном адсорбционном слое лизоцим-ПАВ, с последующим их использованием для определения состава слоя на границе с воздухом [3]. В данной работе такой подход впервые использован для веществ, не проявляющих на границе раздела с воздухом поверхностно-активных свойств (амикацин и левофлоксацин), а также для описания межмолекулярного взаимодействия белок-пептид.

Для определения параметров межмолекулярного взаимодействия использованы данные по количеству белка и пептида на границе раздела фаз раствор/*n*-ксилол и изотермы поверхностного натяжения. Изотермы поверхностного натяжения систем с даларгином показаны на рис.3.

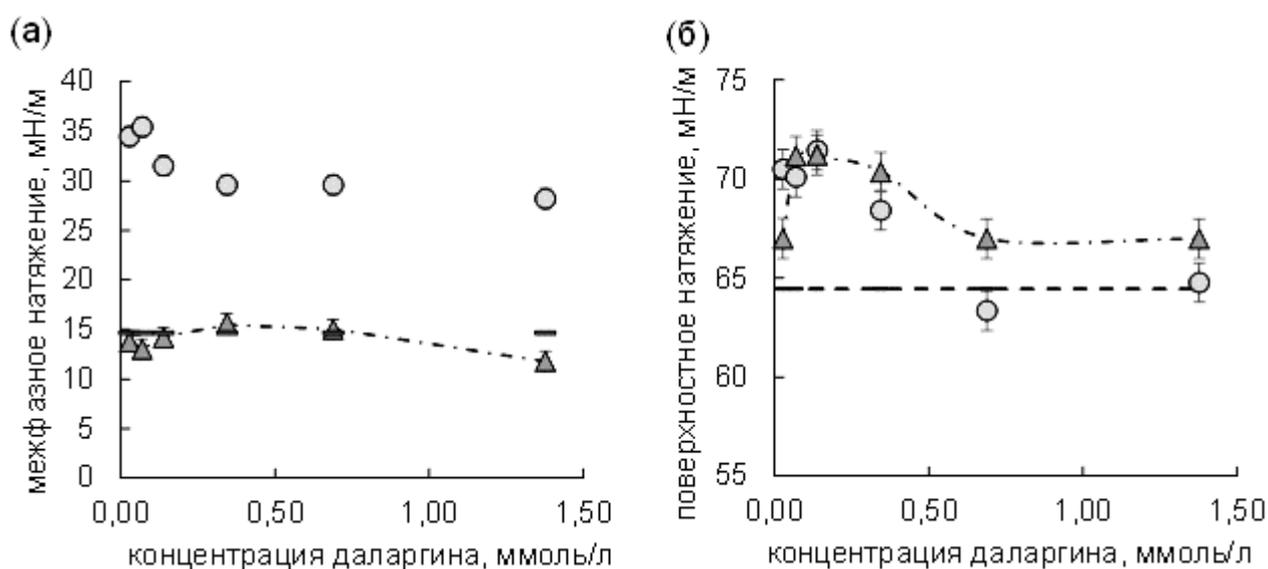


Рис. 3. – Изотермы поверхностного натяжения даларгина (кружки) и его смеси с лизоцимом (треугольники) на границе раздела фаз (а) PBS - ксилол и (б) PBS – воздух. Пунктирной линией показан чистый лизоцим на границе раздела фаз.

Для определения максимальной адсорбции и поверхностной активности даларгина изотермы поверхностного натяжения описывали с помощью уравнения Шишковского, полученные параметры адсорбции даларгина приведены в Таблице 2. Поскольку движущей силой адсорбции коротких пептидов на границе с воздухом является уменьшение площади гидрофобной поверхности раздела с водой, которая, в основном, достигается за счет дегидратации гидрофобных аминокислотных остатков [4], увеличение

адсорбции даларгина в присутствии белка может быть следствием образования белково-пептидного комплекса, поэтому лизоцим вносит значительный вклад в адсорбцию даларгина.

Таблица 2 – Параметры адсорбции даларгина

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

Для определения параметров межмолекулярного взаимодействия белка и лигандов в адсорбционном слое и ЛС была использована модель, предложенная Файнерманом и соавторами [5] для изотерм двумерного давления:

$$-\frac{\pi\omega_0^*}{RT} = \ln(1 - \theta_{pL} - \theta_L) + \theta_p \left(1 - \frac{\omega_0}{\omega}\right) + a_p\theta_p^2 + a_L\theta_L^2 + 2a_{pL}\theta_{pL}\theta_L \quad (1)$$

где  $\Pi$  – двумерное давление,  $R$  – газовая постоянная,  $T$  – температура,  $a$  – параметр межмолекулярного взаимодействия молекул в адсорбционном слое (индексы  $p$  и  $L$  относятся к белку и ЛС, соответственно),  $\theta = \omega\Gamma$  – степень заполнения поверхности молекулами. Двумерное давление определялось из изотерм поверхностного натяжения, параметры заполнения поверхности белком и лигандом в данной работе определялись с использованием данных, полученных с помощью МСФ, что позволило сократить число подбираемых параметров. Остальные параметры подбирались эмпирически. Для молекулы лизоцима использовались следующие параметры:  $\omega_0 = 4,95 \times 10^5 \text{ м}^2/\text{моль}$ ,  $\omega_{\min} = 7,72 \times 10^6 \text{ м}^2/\text{моль}$ ,  $\omega_{\max} = 2,54 \times 10^7 \text{ м}^2/\text{моль}$  [5]. Полученные параметры для исследуемых ЛС представлены в Таблице 3. Параметры  $a$  свидетельствуют о притяжении между молекулами в поверхностном слое. Результаты расчета показаны штрихпунктирными на рис. 3. Результаты расчета степени заполнения адсорбционного слоя на границе раздела PBS/воздух для смеси лизоцима и даларгина приведены на рис. 4.

Таблица 3 – Параметры межмолекулярного взаимодействия между молекулами ЛС и лизоцима

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

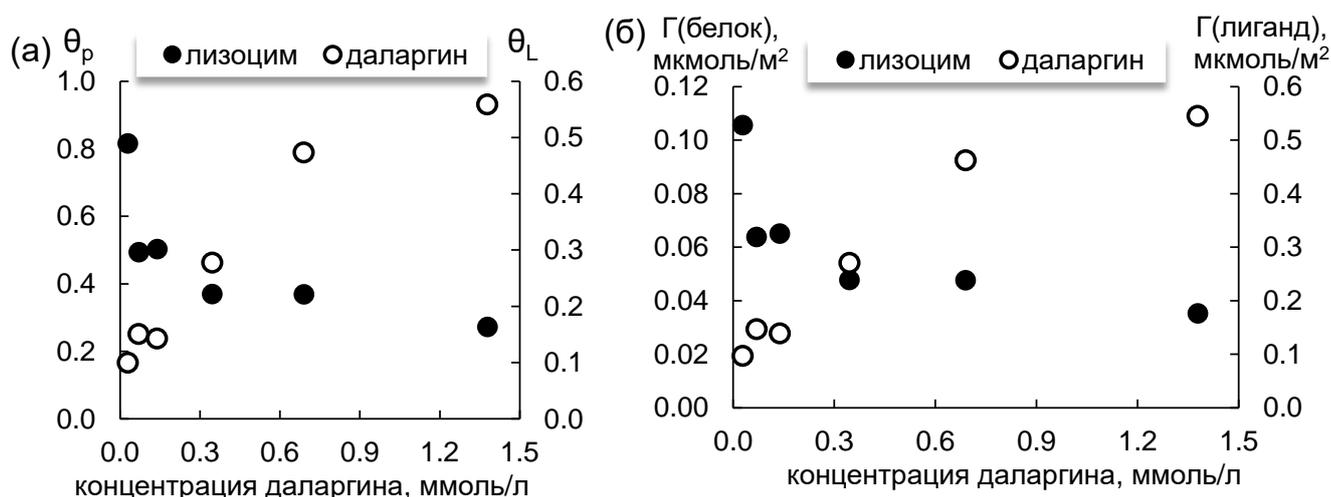


Рис. 4. – Зависимости степени заполнения адсорбционного слоя на границе раздела PBS/воздух лизоцимом и даларгином.

Покрытие поверхности даларгином, при его концентрации 0,7 ммоль/л, превышает поверхностное покрытие лизоцима, что согласуется с данными кинетики изменения межфазного натяжения. Поэтому в данном случае даларгин действует как поверхностно-активное вещество. Отметим, что описание смешанной адсорбции с помощью модели Файнермана до этого использовалось только в отношении смесей белков и ПАВ. В данной работе модель успешно применена для смесей лизоцима и ЛС различной химической природы, в том числе не обладающих поверхностно-активными свойствами на границе раздела с воздухом, и показано, что ЛС образуют комплексы с белками, коллоидные свойства которых отличаются от свойств свободного белка. Аналогичным образом были определены составы смешанных адсорбционных слоев с ЛС. Присутствие в составе слоя на границе с воздухом поверхностно-инактивных ЛС свидетельствует в пользу образования комплексов.

Для исследования структур комплексов лизоцим-ЛС в адсорбционных слоях водный раствор вещества наносился на стенки реакционного сосуда, выдерживался 30 минут для формирования адсорбционного слоя и быстро замораживался. Однако для определения контактов между лизоцимом и ЛС в составе комплекса требуется другой методический подход, который был впервые опробован в данной работе. Исследуемые растворы смесей лизоцима с ЛС выдерживали в течение 24 часов, затем наносили на стенки реакционного сосуда, сразу замораживали и подвергали лиофильной сушке, после чего вакуумировали и обрабатывали атомарным тритием. В работе использовали раствор лизоцима с концентрацией 35  $\mu\text{mol}/\text{l}$ , а также его эквимольные смеси с ЛС.

После обработки атомами трития лизоцима и смеси лизоцима с ЛС перед анализом проводили очистку меченых соединений, которая включала следующие стадии работы: (1)

сбор продукта, (2) лиофилизация и последующее растворение, (3) очистка с помощью равновесного диализа против PBS или мембранной фильтрации, (4) тотальный гидролиз с последующим определением радиоактивности полученных аминокислот в результате аминокислотного анализа. Кроме того, часть препарата подвергли ферментативному гидролизу с получением пептидов, которые разделили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и определили их радиоактивность. Изменение радиоактивности препаратов для двух серий экспериментов (обработка атомами трития замороженных растворов и лиофилизованных препаратов) в процессе работы представлены в Таблице 4.

Таблица 4 – Радиоактивность препаратов лизоцима на различных стадиях работы

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

Примечание. Индекс *x* у символа A<sub>*x*</sub> означает этап работы, согласно описанию в тексте.

Для замороженных растворов значительная часть трития оказалась в лабильной форме и была удалена после лиофилизации, что не позволило достоверно определить влияние ЛС на распределение трития по типам аминокислотных остатков лизоцима. В результате удаления воды лиофилизацией удалось увеличить удельную радиоактивность лизоцима до 2-3 Ки/ммоль, что повысило качество анализа. Распределение трития в аминокислотных остатках лизоцима представлено на Рис. 5 в присутствии ЛС относительно распределения в чистом лизоциме.

Распределение трития по типам аминокислотных остатков оказалось близким, что означает, что, во-первых, не происходит существенной денатурации белка в составе комплекса, а во-вторых, площадь контакта белок-лиганд не столь велика, чтобы обнаружить различие по анализу тотального гидролизата.

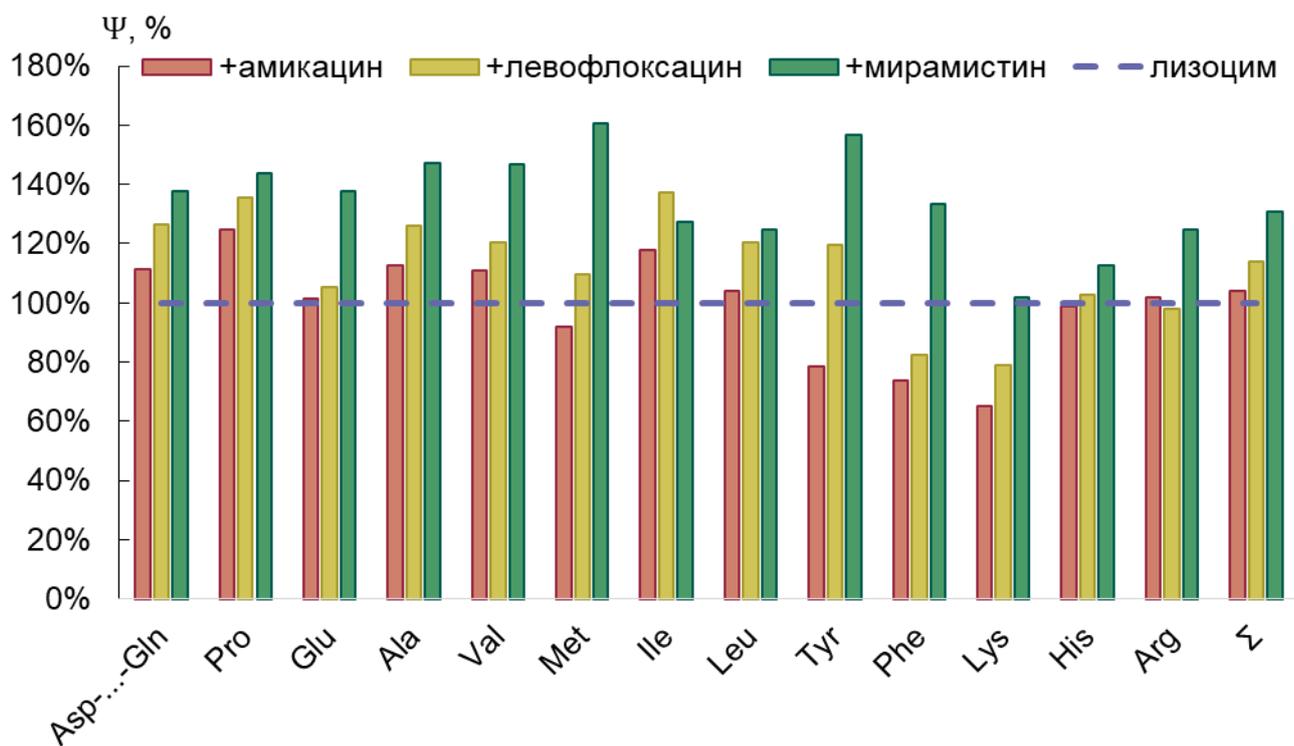


Рис. 5. – Относительное изменение радиоактивности аминокислот лизоцима в присутствии ЛС (за 100 % принята радиоактивность аминокислот в лизоциме без добавок).

В соответствии с пространственным распределением аминокислотных остатков в глобуле лизоцима можно сопоставить изменение радиоактивности двух аминокислот - пролина и фенилаланина, которые локализованы на определенных участках молекулы (Таблица 5). В присутствии амикацина и левофлоксацина отношение активности фенилаланина к пролину снижается практически в 2 раза. Можно предположить, что при образовании комплекса лизоцима с амикацином и левофлоксацином происходит частичная экранировка фенилаланина. Комплекс с мирамистином не затрагивает этот участок белка.

Таблица 5 – Отношение удельной радиоактивности  $A_{Phe}/A_{Pro}$

Мишень	Лизоцим	+ амикацин	+ левофлоксацин	+ мирамистин
$A_{Phe}/A_{Pro}$	0,40	0,24	0,24	0,37

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

атомы трития способны проникать в пространство между молекулами без потери реакционной способности, что по сути повышает доступность поверхности лизоцима атомам трития и увеличивает его радиоактивность.

Для определения положения связывания лизоцима с ЛС в объеме раствора часть препаратов после их очистки подвергали трипсинолизу. В результате трипсинолиза лизоцима образуется 17 пептидов, которые разделяли с помощью ВЭЖХ с анализом их радиоактивности. По величине отношения массы к заряду ( $m/z$ ) с помощью ВЭЖХ-МС удалось точно идентифицировать 7 пептидов (Val2-Arg5, Cys6-Lys13, His15-Arg21, Phe34-Arg45, Asn46-Arg61, Thr69-Arg73, Gly117-Arg125), положение пептидов и изменение радиоактивности пептидов в единицах, нормированных на радиоактивность в анализе показаны на Рис. 6.

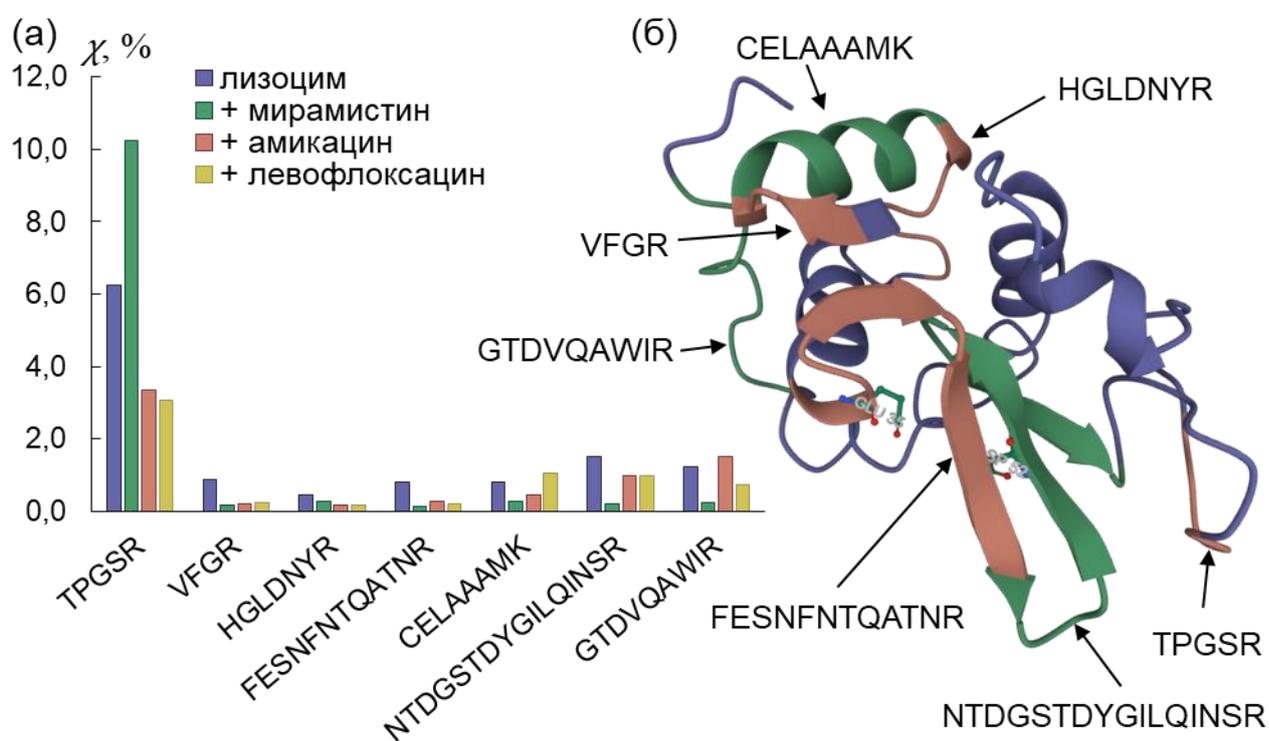


Рис. 6. Радиоактивность пептидов (а), которые были обнаружены с помощью ВЭЖХ-МС после трипсинолиза, нормированная на радиоактивность в анализе. (б) Расположение пептидов в лизоциме (PDB: 6LYZ).

Несмотря на то, что общая удельная активность лизоцима в присутствии мирамистина увеличилась на 30 % (Таблица 4), радиоактивность всех обнаруженных пептидов снизилась, кроме Thr69-Arg73, радиоактивность которого увеличилась практически в два раза. Вероятно, увеличение удельной радиоактивности лизоцима в присутствии мирамистина связано с увеличением радиоактивности аминокислот, положение которых мы не можем определить при пептидном анализе.

В присутствии амикацина и левофлоксацина значительно снизилась радиоактивность четырех пептидов: Thr69-Arg73, Val2-Arg5, His15-Arg21 и Phe34-Arg45, при этом пептид Phe34-Arg45 содержит аминокислотный остаток Glu35 – один из остатков активного центра фермента. Данные, полученные при пептидном анализе, позволили определить положения контактов, что в дальнейшем было подтверждено с помощью молекулярного докинга.

Необходимо отметить, что при образовании комплексов с ЛС не происходило существенного изменения вторичной структуры белка, даже при десятикратном избытке мирамистина (ПАВ). По данным, полученным с помощью спектроскопии кругового дихроизма, небольшие изменения вторичной структуры лизоцима происходят в присутствии даларгина. При этом флуоресцентный анализ показал: увеличение флуоресценции лизоцима до 160 % с увеличением концентрации мирамистина; сдвиг максимума флуоресценции лизоцима в более длинноволновую область с увеличением концентрации амикацина; тушение флуоресценции лизоцима с ростом концентрации левофлоксацина; увеличение флуоресценции лизоцима с увеличением концентрации даларгина до его концентрации 13,8 ммоль/л, однако уже при концентрации даларгина 27,6 ммоль/л происходит наложение спектров даларгина и лизоцима друг на друга и в дальнейшем повышении концентрации – полное перекрывание спектров. На основании данных флуоресцентного анализа рассчитаны константы связывания лизоцима с ЛС: константа ассоциации мирамистина с лизоцимом составила  $4,25 \times 10^4$  л/моль, что соответствует энергии Гиббса ( $T=289$  К)  $\Delta G^\circ = -6,31$  ккал/моль, а даларгина с лизоцимом составила  $(1,4 \pm 0,6) \times 10^5$  л/моль. Количество сайтов взаимодействия левофлоксацина с лизоцимом составило 1,49, а константа ассоциации равна  $(1,1 \pm 0,2) \times 10^7$  л/моль, значение свободной энергии Гиббса составило  $-(9,6 \pm 0,1)$  ккал/моль.

Изменения в спектрах флуоресценции лизоцима в присутствии ЛС свидетельствуют об изменении окружения аминокислотных остатков триптофана в белковой глобуле при образовании комплексов лизоцим-ЛС. Аминокислотные остатки Trp-62, Trp-63 и Trp-108 расположены вблизи активного центра фермента и участвуют в связывании фермента и субстрата, поэтому было определено влияние ЛС на ферментативную активность лизоцима по отношению к *M. Luteus*. Найдено, что в присутствии мирамистина и даларгина происходит увеличение ферментативной активности лизоцима в 1,5 раза, которое коррелирует с увеличением флуоресценции. Левофлоксацин практически не влияет на активность лизоцима, что согласуется с данными литературы [6], а с повышением концентрации амикацина скорость лизиса клеток резко падает. Можно

заклучить, что аминокислотные остатки активного центра лизоцима участвуют в процессе комплексообразования, и микроокружение активного центра в комплексе лизоцим-ЛС отличается от нативного.

Для установления положения ЛС в составе комплекса был проведен анализ молекулярного докинга с помощью программ HEX 8 и Autodock 4, в которых использовали структуру лизоцима 6LYZ (PDB). На рис. 7 показана схема комплекса лизоцима с мирамистином при связывании в области пептида NTDGSTDYGILQINSR, для которой значение свободной энергии Гиббса составило -5,40 ккал/моль (наименьшее и наиболее близкое к экспериментальному). Было установлено, что связывание с мирамистином происходит только за счет гидрофобных взаимодействий, в котором участвуют аминокислотные остатки Ile58, Trp63, Ile98, Ala107, Trp108, Val109.

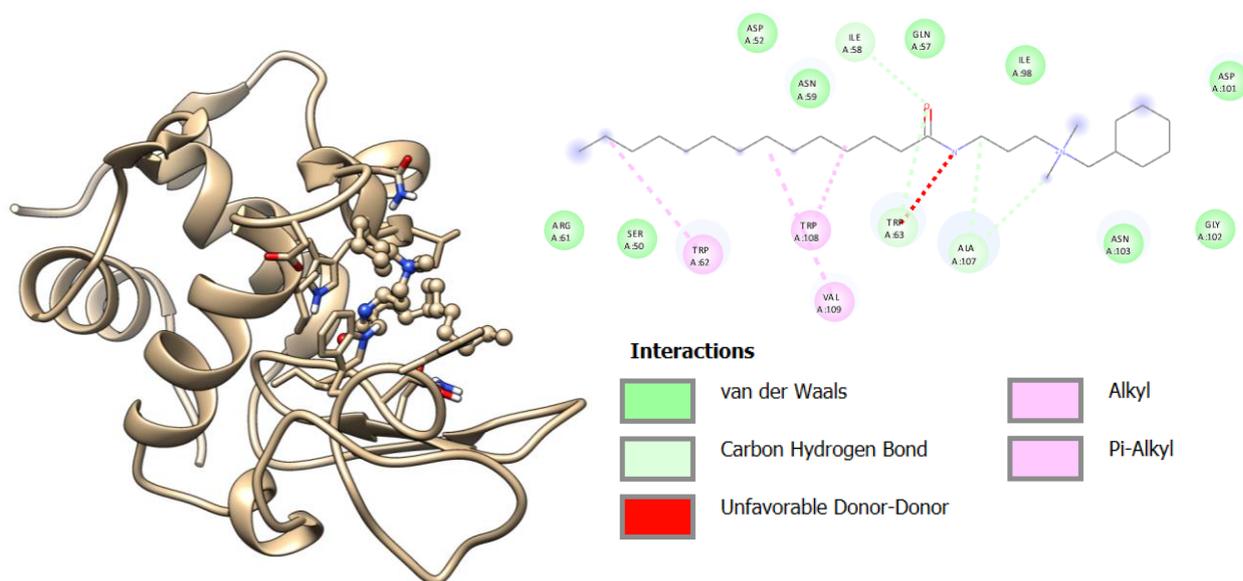


Рис. 7. Комплекс лизоцим-мирамистин при положении лиганда в области пептида NTDGSTDYGILQINSR.

Для амикацина и левофлоксацина при моделировании рассмотрели четыре возможных положения, которые были определены при пептидном анализе: активный центр, а также TPGSR, VFGR, HGLDNYR, с помощью программного обеспечения Autodock 4 было протестировано положение стыковки и выполнены расчеты. На рис. 8 и 9 приведены соответствующие изображения комплексов лизоцима с амикацином и левофлоксацином для положения лиганда в области активного центра фермента, для которого получены наименьшие значения энергии Гиббса (-9,55 ккал/моль для амикацина и -7,04 ккал/моль для левофлоксацина).

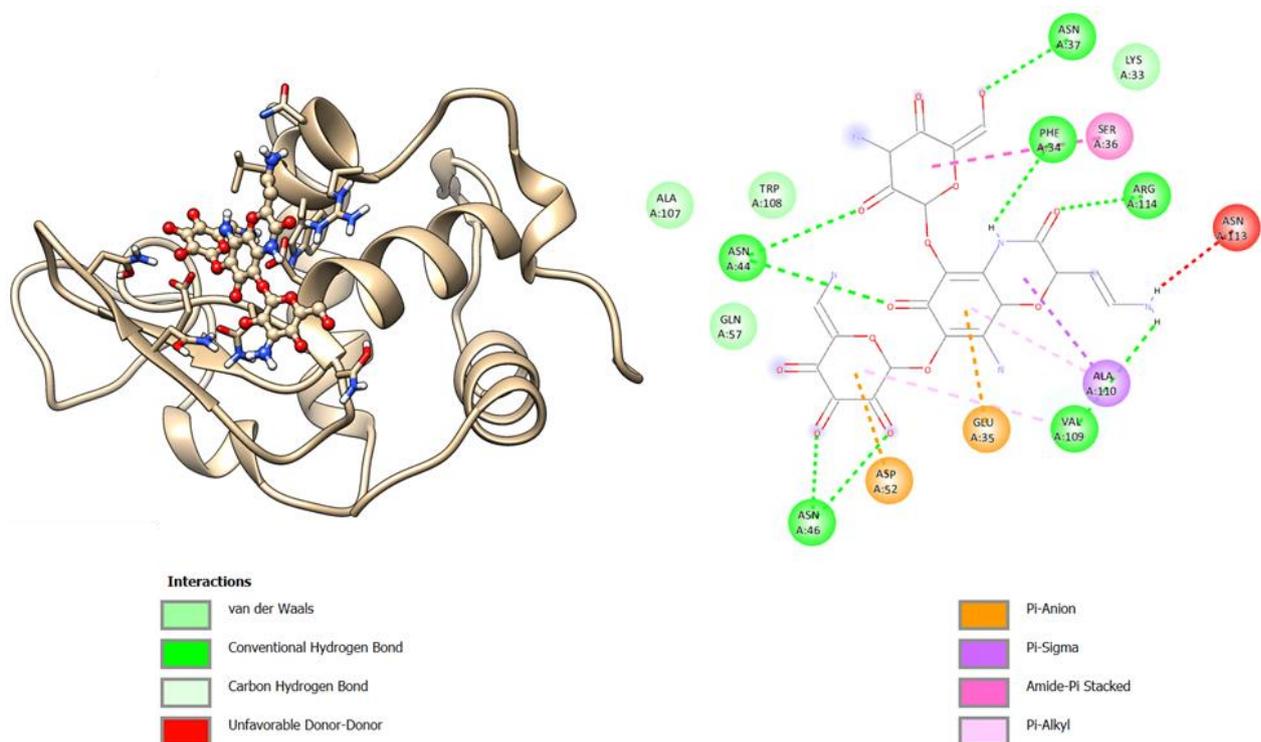


Рис. 8. Комплекс лизоцим-амикацин, связанный в активном центре лизоцима, по данным молекулярного докинга.

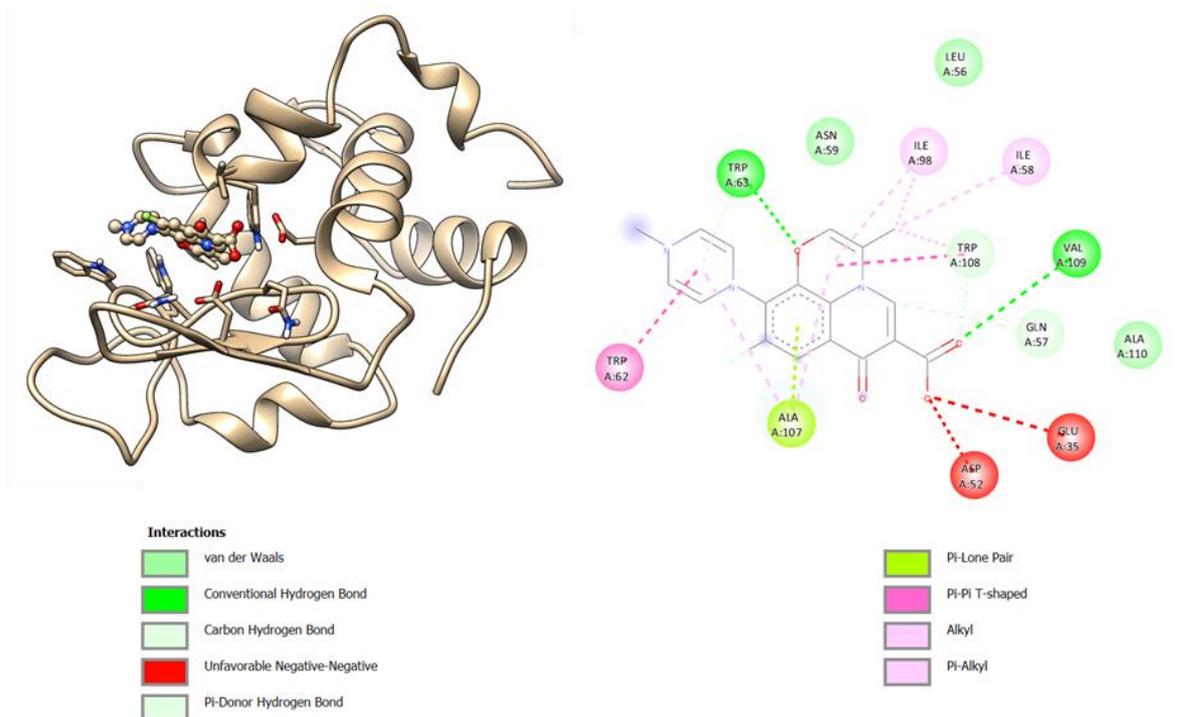


Рис. 9. Комплекс лизоцим-левофлоксацин, связанный в активном центре лизоцима, по данным молекулярного докинга.

При образовании комплекса с амикацином во взаимодействии участвуют оба остатка, ответственные за ферментативную активность лизоцима Asp52 и Glu35. При образовании комплекса с амикацином также велика вероятность расположения лиганда в

области пептида His15-Arg21. В этом случае в образовании связи участвуют аминокислотные остатки Tyr20, Arg14, входящие в состав спиралей, и находящиеся рядом с ними Asn19 и His15, что вероятно может приводить к нарушению спиральности белка, и, как следствие, к красному сдвигу спектра флуоресценции. При образовании комплекса с левофлоксацином установлено образование связи с Trp62, Trp63 и Trp108, что объясняет тушение флуоресценции в присутствии левофлоксацина, Asp52 и Glu35 не затрагиваются при взаимодействии, что объясняет очень слабое снижение ферментативной активности лизоцима. При взаимодействии с даларгином задействованы следующие аминокислотные остатки лизоцима: Glu35, Asp52, Gln57, Asn59, Trp62, Trp63, Leu75, Asn106, Trp108 и Val109, предполагается, что комплекс стабилизирован гидрофобными взаимодействиями (Рис. 10). Стоит отметить, что результаты моделирования хорошо согласуются с полученными экспериментальными данными.

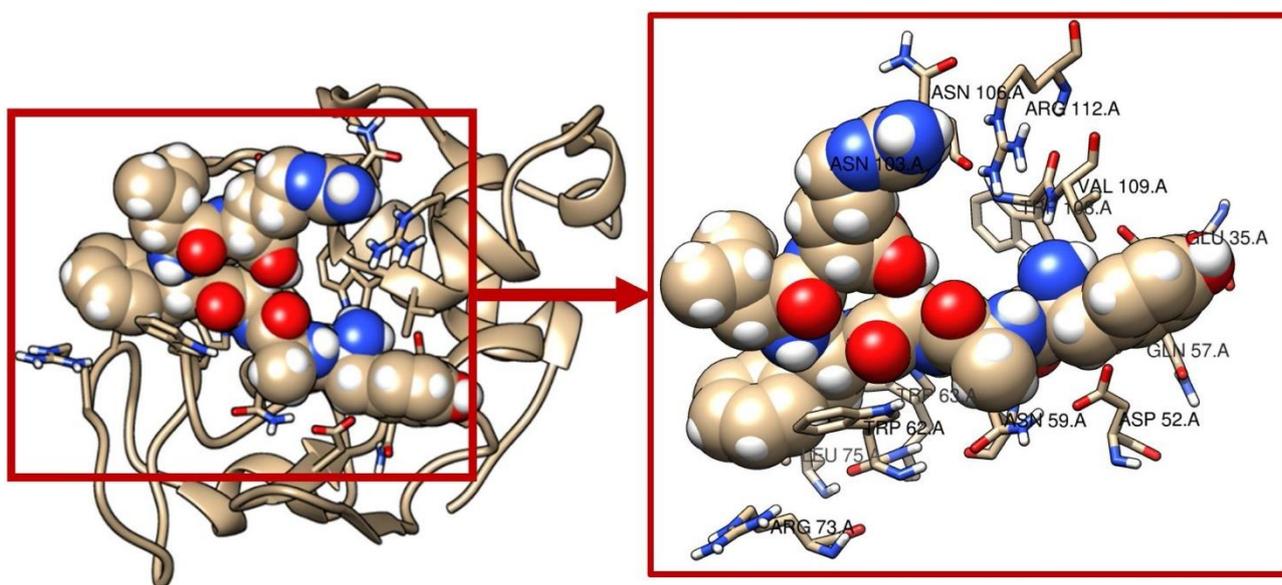


Рис. 10. Комплекс лизоцим-даларгин, по данным молекулярного докинга.

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

Полученные отрицательные значения полной энергии системы свидетельствуют о возможности самопроизвольного образования комплекса, для всех ЛС, наиболее вероятно, центром связывания служит область активного центра лизоцима.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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

Образование комплекса с амикацином приводит к практически полной потере ферментативной активности лизоцима и красному смещению максимума на спектре флуоресценции лизоцима. По небольшому снижению коэффициента распределения лизоцима в присутствии амикацина можно предположить, что комплекс обладает большей гидрофильностью в сравнении с лизоцимом без добавок. С помощью молекулярного докинга проанализировали предполагаемые места связывания, определенные при анализе

пептидов, наиболее вероятными для связывания оказались положения активного центра, задействованы аминокислоты Asp52 и Glu35, а также в области пептида His15-Arg21, с участием аминокислот Tyr20, Arg14, что хорошо согласуется с экспериментальными данными.

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

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

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

## ВЫВОДЫ

1. С помощью комплексного подхода с использованием радиохимических методов, методов спектроскопии, а также молекулярного докинга показано, что лизоцим образует комплексы с лекарственными средствами мирамистином, амикацином, левофлоксацином и даларгином, что приводит к изменению поверхностно-активных свойств белка и его ферментативной активности.
2. С помощью метода сцинтиллирующей фазы и тензиометрии определили составы смешанных адсорбционных слоев лизоцима с изученными лекарственными средствами на границах водный раствор/*n*-ксилол и водный раствор/воздух. Для выявления мест контактов белка с лекарственными средствами предложено использовать обработку атомами трития лиофилизированных комплексов лизоцим-лекарственное средство, образующихся в водных растворах, что повысило радиоактивность аминокислотных остатков лизоцима и достоверность получаемых результатов.
3. Наиболее сильные эффекты наблюдались при образовании комплекса лизоцима с мирамистином, что проявлялось в изменении коэффициентов распределения и адсорбции на межфазной границе водный раствор/*n*-ксилол. Показано, что максимум адсорбции лизоцима наблюдался при соотношении белок-мирамистин 1:1. Образующийся комплекс увеличивал интенсивность флуоресценции лизоцима, его ферментативную активность, а также максимально сильно нарушал упаковку молекул в лиофилизированных препаратах, что увеличивало радиоактивность белка при реакции с атомами трития. Экспериментальные данные подтверждены с помощью молекулярного докинга: наиболее вероятно, связывание происходит либо в зоне активного центра фермента, либо в области пептида Asn46-Arg61 и затрагивает аминокислотные остатки триптофана Trp63 и Trp108.
4. Амикацин при образовании комплекса с лизоцимом снижает сродство белка к гидрофобным средам и практически не влияет на его адсорбцию на границе раздела *n*-ксилол/вода. Показано, что происходит связывание амикацина с активным сайтом белка, задействованы аминокислотные остатки Asp52 и Glu35, что приводит к снижению его ферментативной активности, и в области пептида His15-Arg21, где в образовании связи участвуют аминокислотные остатки Asn19 и His15, что приводит к красному смещению максимума флуоресценции.
5. Найдено, что комплекс лизоцима с левофлоксацином не затрагивает активный сайт белка, однако задействованы аминокислотные остатки триптофана Trp62, Trp63 и Trp108 вне активного центра фермента. При образовании комплекса с левофлоксацином

снижается гидрофобность лизоцима, также наблюдалось взаимное влияние этих веществ при их адсорбции.

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

### **ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА С СОАВТОРАМИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

**Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, включенных в перечень Минобрнауки РФ, а также индексируемых в базах данных РИНЦ, Web of Science, Scopus**

1. Skrabkova H.S., Chernysheva M.G., Arutyunyan A.M., Badun G.A. Complex of lysozyme and Myramistin: formation and adsorption at the water–xylene interface // *Mendeleev Communications*. 2020. Vol. 30, № 5. P. 645–646. (Импакт-фактор 1,837. WoS, Scopus), 0,2 п.л./30%
2. Chernysheva M.G., Kasperovich A.V., Skrabkova H.S., Shnitko A.V., Arutyunyan A.M., Badun G.A. Lysozyme-dalargin self-organization at the aqueous-air and liquid-liquid interfaces // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2021. Art # 111695. (Импакт-фактор 5,999 WoS, Scopus), 0,5 п.л./20%
3. Chernysheva M.G., Shnitko A.V., Skrabkova H.S., Badun G.A. Peculiarities of alkylamidopropyldimethylbenzylammonium (Miramistin) in the relationship to lysozyme in comparison with quaternary ammonium surfactants: Coadsorption at the interfaces, enzymatic activity and molecular docking // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2021. Art # 127503. (Импакт-фактор 5,518 WoS, Scopus), 1 п.л./25%

### **Тезисы докладов конференций**

4. Скребкова А.С. Влияние мирамистина на поведение лизоцима на границе раздела фаз вода-ксилол // *Материалы Международного молодежного научного форума Ломоносов-2019 / Под ред. Алешковский И.А., Андриянов А.В., Антипов Е.А. – Москва – 2019. – Т. 1. – С. 757–757.*
5. Chernysheva M.G., Shnitko A.V., Soboleva O.A., Skrebkova A.S., Ksenofontov A.L., Arutyunyan A.M., Badun G.A. Lysozyme-surfactant self-organization at the aqueous-air and aqueous-xylene interfaces // *Book of abstracts XXI Mendeleev Congress on general and applied chemistry. Book 6. Satellite symposia. – СПб. – 2019. – Т. 6. – С. 231–231.*

6. Скребкова А.С., Касперович А.В., Чернышева М.Г., Бадун Г.А. In vitro исследование взаимодействия лекарственных средств с белками с использованием метода сцинтиллирующей фазы // Сборник тезисов III Международной научно-практической конференции Радиофарма-2019 Актуальные проблемы разработки, производства и применения радиофармацевтических препаратов / ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА – Москва – 2019. – С. 53–53.
7. Чернышева М.Г., Касперович А.В., Скребкова А.С., Шнитко А.В., Бадун Г.А. Комплексное исследование взаимодействия лизоцима с поверхностно-активными веществами и лекарственными средствами // Восьмая Всероссийская Каргинская конференция Полимеры в стратегии научно-технического развития РФ Полимеры-2020 (г.Москва, 9-13 ноября 2020 г.): сборник тезисов. – Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова М. – 2020. – С. 353–353.
8. Скребкова А.С. Взаимодействие мирамистина с лизоцимом по данным спектрометрических методов и метода сцинтиллирующей фазы // Материалы Международного молодежного научного форума Ломоносов-2020 / Под ред. Алешковский И.А., Андриянов А.В., Антипов Е.А. – Москва – 2020.
9. Скребкова А.С. Взаимодействие лизоцима и левофлоксацина по данным радиохимических и спектрофотометрических методов // Материалы Международного молодежного научного форума Ломоносов-2021 / Под ред. Алешковский И.А., Андриянов А.В., Антипов Е.А., Зимакова Е.И. – Москва – 2021.
10. Скребкова А.С. Образование комплексов лизоцима с амикацином, левофлоксацином и мирамистином по данным спектрофотометрических и радиохимических методов // Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных Ломоносов-2022, секция Химия. / Издательство Перо Москва. – Москва – 2022. – С. 690–690.

#### **В АВТОРЕФЕРАТЕ ИСПОЛЬЗОВАНЫ ССЫЛКИ НА РАБОТЫ:**

1. Almutairi F.M. et al. Biophysical Insight into the Interaction of Human Lysozyme with Anticancer Drug Anastrozole: A Multitechnique Approach // Sci. World J. 2020. Vol. 2020. P. 8363685.
2. Kairaliyeva T. et al. Surface Tension and Adsorption Studies by Drop Profile Analysis Tensiometry // Journal of Surfactants and Detergents. 2017. Vol. 20, № 6. P. 1225–1241.
3. Чернышева М.Г. Новый подход к определению структурных особенностей комплексов белок - лиганд на межфазных границах и в объеме раствора (на примере лизоцима). МГУ имени М.В.Ломоносова, 2022. 193 p.

4. Engin O. et al. Driving forces for adsorption of amphiphilic peptides to the air-water interface // J. Phys. Chem. B. American Chemical Society, 2010. Vol. 114, № 34. P. 11093–11101.
5. Alahverdijeva V.S. et al. Adsorption of hen egg-white lysozyme at the air-water interface in presence of sodium dodecyl sulphate // Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 2008. Vol. 317, № 1–3. P. 610–617.
6. Fang Q. et al. The study on interactions between levofloxacin and model proteins by using multi-spectroscopic and molecular docking methods // J. Biomol. Struct. Dyn. Taylor and Francis Ltd., 2018. Vol. 36, № 8. P. 2032–2044.

### **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ККМ – критическая концентрация мицеллообразования

ЛС – лекарственное средство

МСФ – метод сцинтиллирующей фазы

ПАВ – поверхностно-активное вещество

PBS – phosphate-buffered saline – фосфатно-солевой буфер

PDB – банк данных трёхмерных структур белков (protein data bank)

### **БЛАГОДАРНОСТИ**

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

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

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