

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М. В. Ломоносова



На правах рукописи

Растрига Николай Владимирович

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

1.5.4. Биохимия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2025

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель: **Левашов Павел Андреевич**

доктор химических наук

Официальные оппоненты: **Мирошников Константин Анатольевич**

доктор химических наук, член-корреспондент РАН,
Институт биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
главный научный сотрудник

Азарнова Татьяна Олеговна

доктор биологических наук, доцент,
Московская государственная академия ветеринарной
медицины и биотехнологии – МВА
им. К.И. Скрябина, факультет биотехнологии и
экологии, профессор кафедры химии
им. профессоров С.И. Афонского, А.Г. Малахова

Пометун Евгений Владимирович

кандидат химических наук, доцент,
Первый Московский государственный медицинский
университет им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский университет), Институт фармации
им. А.П. Нелюбова, доцент кафедры аналитической,
физической и коллоидной химии

Защита диссертации состоится «13» мая 2025 года в 15 часов на кафедре химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, Ленинские горы д.1, стр.11Б, ауд. 202.

E. mail: d50100159@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д.27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3369>

Автореферат разослан « » _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук

Сакодынская И.К.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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]. 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 [2–4], противовирусную [5–7] и даже противоопухолевую активность [8]. В настоящей работе мы проводим исследование двух типов лизоцима – куриного яичного, который получил широкое распространение в пищевой промышленности и медицине [9,10], а также человеческого, являющегося как ферментом, так и важным иммуномодулятором человека [11]. Бактериолитическая активность лизоцима зависит от ряда факторов, таких как рН, температура и ионная сила, однако существуют низкомолекулярные вещества, которые специфично регулируют его активность – эффекторы. Так, было показано, что глицин и заряженные аминокислоты, в отличие от неполярных аминокислот (кроме глицина), существенно увеличивают скорость лизиса бактериальных клеток лизоцимом [12]. 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 [12]. 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 [13]. 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. Однако совместное действие эффекторов 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 [14,15]. 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.

Степень разработанности темы исследования. Была разработана и теоретически обоснована методика определения бактериолитической активности лизоцима турбидиметрическим методом анализа [16], а также

методика изучения адсорбции лизоцима на живых бактериальных клетках [17]. Ранее в литературе было изучено действие различных аминокислот на лизис клеток *E. coli* куриным лизоцимом [12]. 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 pH среды [18] и на клетках *Escherichia coli* при разной ионной силе буферного раствора [17]. Кроме того, в литературе имеются данные, что смеси двух и трех аминокислот усиливают антибактериальную активность миелопероксидазы [19]. 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.

Цели и задачи исследования. Целью 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.

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.

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 pH и ионной силы, могут быть использованы в качестве дополнительной компоненты лекарственных препаратов, консервантов и дезинфицирующих средств на основе лизоцима, увеличивающей эффективность работы данного фермента.

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 раздельного 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.

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.

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 методами 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, Россия, 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–PABMB Congress, Лиссабон, Португалия, 9-14 июля 2022; XXVII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2020», Москва, Россия, 20 ноября 2020.

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».

Структура и объем работы.

Диссертационная работа 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 и 16 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Методические аспекты

В качестве метода измерения бактериолитической активности лизоцима нами был выбран метод турбидиметрии, поскольку он удобен, экспрессен и позволяет измерять скорость лизиса бактериальных клеток в режиме реального времени. Если не оговорено иное, под клетками *E. coli* в тексте подразумевается штамм *E. coli* KS-507 (линии К-12) (В-3254), а под *P. megaterium* - штамм *P. megaterium* ATCC 14581 (В-9869). Все измерения начальной скорости лизиса бактериальных клеток лизоцимом были проведены при температуре 37°C. Для измерения начальной скорости лизиса клеток, если не оговорено иное, мы используем концентрацию лизоцима 0,1 мкг/мл, входящую в диапазон концентраций фермента, при которых сохраняется линейность зависимости начальной скорости лизиса клеток. Все используемые в работе эффекторы в концентрациях, как минимум, до 50 мМ каждого, во всех исследуемых в работе сочетаниях не влияют на фоновое изменение оптического поглощения суспензии клеток (в отсутствие фермента). Все компоненты используемых в работе буферных растворов не вносят изменений в скорость лизиса клеток лизоцимом. рН растворов всех добавок доводили с помощью растворов HCl и NaOH до значения рН буфера, в котором проводились измерения. В работе по измерению скорости лизиса клеток использовались размороженные аликвоты с суспензиями бактерий, хранящиеся не более 3-х недель в холодильнике при температуре -70°C. Все используемые в исследовании бактерии были охарактеризованы с использованием метода микроскопии. Если не указано иное, в начале измерения концентрация бактериальных клеток *E. coli* KS-507 и *P. megaterium* ATCC 14581 (В-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 суспензии для определения бактериолитической активности лизоцима). Концентрация клеток в суспензии была определена пересевом на чашки Петри на твердую агаризованную среду. Однократное замораживание и оттаивание содержимого пробирок с клеточной суспензией не влияло на концентрацию живых клеток в пределах погрешности эксперимента. Результаты измерений 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.

В работе были использованы буферные растворы разных составов, чтобы продемонстрировать существование влияния аминокислот и ионов кальция на лизис клеток лизоцимом в широком диапазоне внешних

условий. Буферный раствор состава 0,01 М Трис-MES с добавлением 25 мМ NaCl, pH 8,5 оптимален для проведения лизиса клеток *E. coli* лизоцимом. Буферный раствор состава 0,01 М Трис-MES-Na₂CO₃ с добавлением 25 мМ NaCl, pH 8,5 имеет ионную силу выше оптимальной (70 мМ) для лизиса клеток *E. coli* лизоцимом. Буферный раствор состава 0,01 М Трис-HCl, pH 8,5 (в том числе с добавлением 10 мМ NaCl) имеет ионную силу ниже оптимальной для лизиса клеток *E. coli* лизоцимом. Буферный раствор состава 4 мМ Na₂HPO₄, 5,4 мМ KH₂PO₄, 10 мМ NaCl, pH 7,0 приближен к химическому составу слюны и, как и буферный раствор состава 25 мМ H₃BO₃, 10 мМ Na₂B₄O₇, 10 мМ NaHCO₃, pH 8,73, безопасен для человека и может применяться в медицинских целях.

Обоснование правомерности измерения скорости лизиса клеток методом турбидиметрии

Бактериолитический фермент лизоцим гидролизует муреин (пептидогликан) клеточной стенки бактерий, что приводит к разрушению клеток и осветлению бактериальной суспензии (т.е. падению ее оптического поглощения). Процесс лизиса под действием лизоцима наглядно показан на рис. 1.

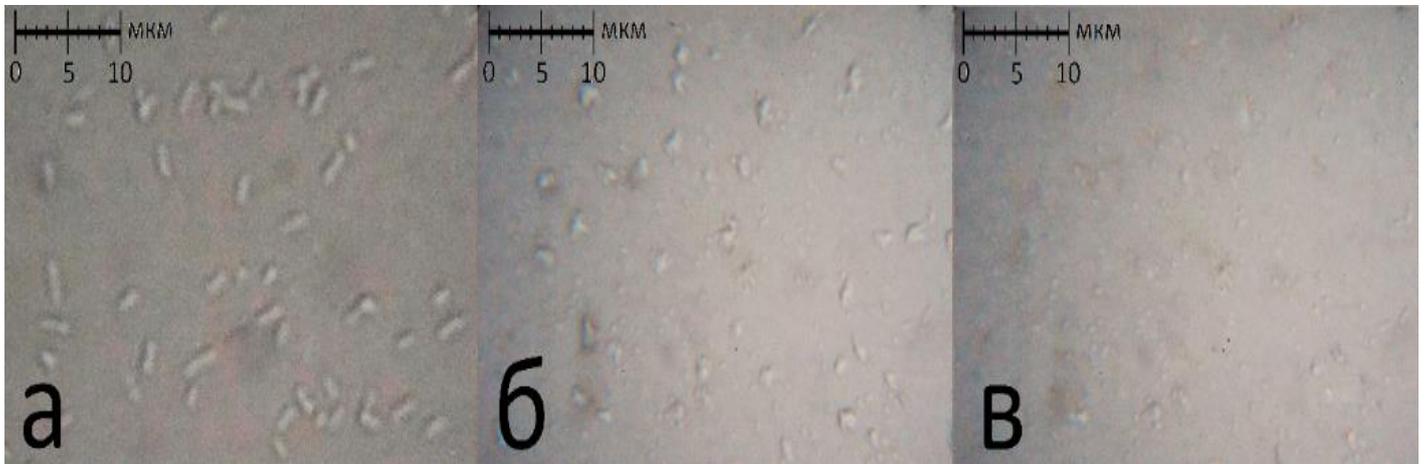


Рисунок 1. Микроскопические фотографии бактериальных клеток *E. coli*. а) – живые бактерии до добавления лизоцима, б) – в присутствии 1 мкг/мл лизоцима по истечении 5 минут, в) – в присутствии 1 мкг/мл лизоцима по истечении 30 минут. Буферная смесь 0,01 М Трис-MES с добавлением 25 мМ NaCl, pH 8,5. Начальная концентрация клеток в суспензии 10⁹ КОЕ/мл.

В присутствии лизоцима бактериальные клетки со временем полностью лизируются. При этом, падение оптического поглощения бактериальной суспензии может служить показателем скорости литического процесса. На рис. 2 продемонстрирована взаимосвязь между оптическим поглощением клеточной суспензии и числом жизнеспособных клеток (КОЕ) в процессе их лизиса лизоцимом.

В ходе ферментативного лизиса оптическое поглощение клеточных суспензий в исследуемом диапазоне линейно уменьшается. Вычисленные угловые коэффициенты полученных прямых позволяют осуществлять перевод единиц оптического поглощения в КОЕ/мл для конкретного вида бактерий.

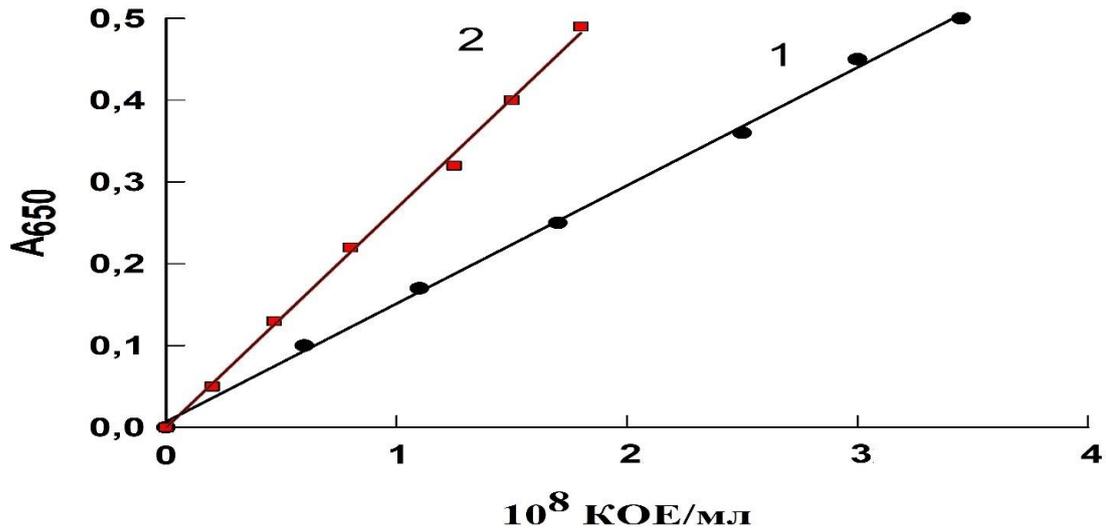


Рисунок 2. Связь оптического поглощения суспензии клеток: 1 – *E. coli* KS-507, 2 – *P. megaterium* ATCC 14581 (В-9869) и концентрации колониеобразующих единиц (КОЕ/мл) в ходе лизиса клеток лизоцимом.

Раздельное и совместное 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 [12]. 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 (рис. 3).

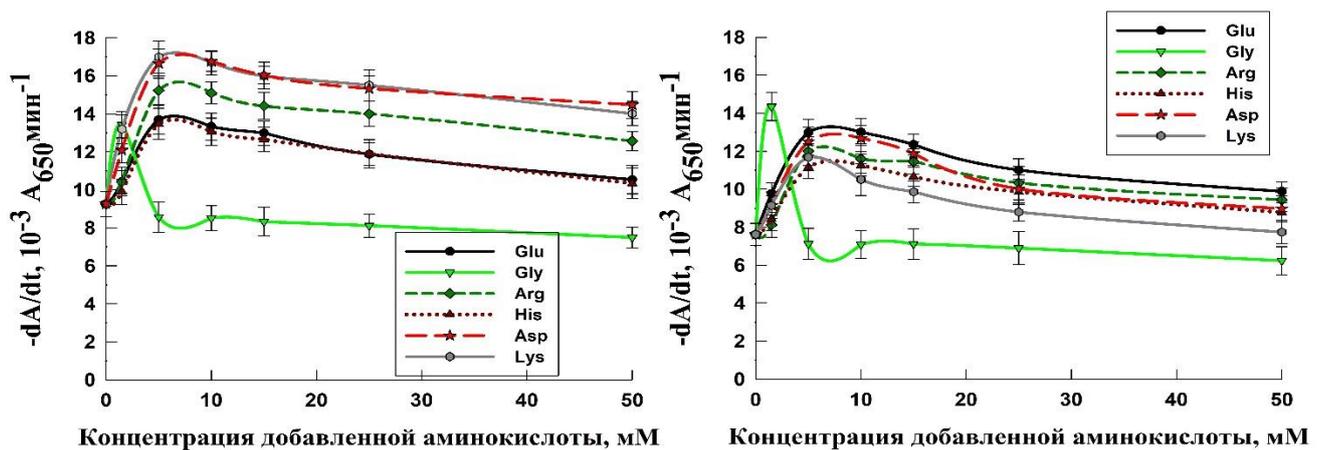


Рисунок 3. Зависимости скорости лизиса клеток *E. coli* человеческим и куриным лизоцимами от концентрации соответствующей свободной аминокислоты (согласно обозначениям на рисунке). Буферная смесь 0,01 М Трис-MES- Na_2CO_3 с добавлением 25 мМ NaCl, рН 8,5.

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 заряженные аминокислоты и глицин влияют на скорость лизиса клеток *E. coli* лизоцимом в зависимости от условий среды, мы провели измерения в буферных растворах с разными значениями pH. На рис. 4 показаны трехмерные зависимости скорости лизиса клеток *E. coli* человеческим и куриным лизоцимами от концентрации эффектора (аминокислоты) и pH.

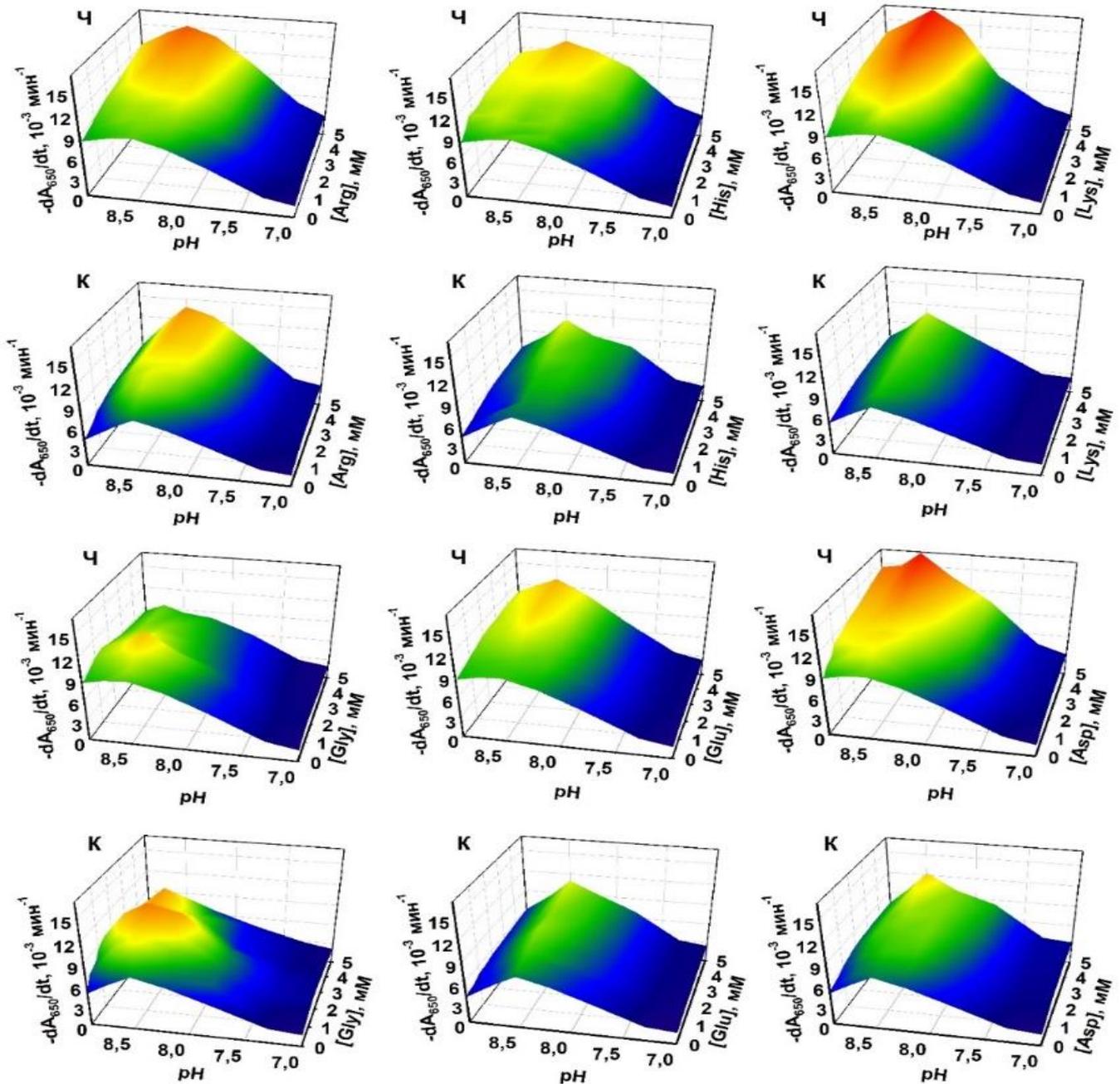


Рисунок 4. Зависимости скорости лизиса клеток *E. coli* лизоцимом от концентрации добавленных аминокислот. Буферная смесь 0,01 М Трис-MES-Na₂CO₃ с добавлением 25 мМ NaCl. Ч – человеческий лизоцим. К – куриный лизоцим.

В целом можно сказать, что характер ускорения лизиса клеток человеческим и куриным лизоцимами в присутствии разных эффекторов схожий. Вероятно, тот факт, что одинаковые аминокислоты сходным образом влияют на скорость лизиса клеток обоими типами лизоцима, говорит в пользу существования единого механизма ускорения ферментативного лизиса клеток. Положение оптимума pH сохраняется при добавлении всех аминокислот, что, вероятно, указывает на то, что значение рКа 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.

Важным как с теоретической, так и с практической точки зрения является вопрос, в присутствии каких сочетаний аминокислот и в каких количествах, наблюдаются наибольшие увеличения скорости ферментативного лизиса бактерий. На рис. 5 представлено сравнение влияния различных эффекторов на скорость лизиса клеток лизоцимом как по отдельности, так в двойных и тройных сочетаниях. На основании данных из рис. 5 условно считаем, что глутамат и аспартат влияют на скорость лизиса клеток схожим образом, поэтому для дальнейшего сравнения сочетаний эффекторов оставим только глутамат, чтобы избежать перебора избыточно большого числа всевозможных комбинаций.

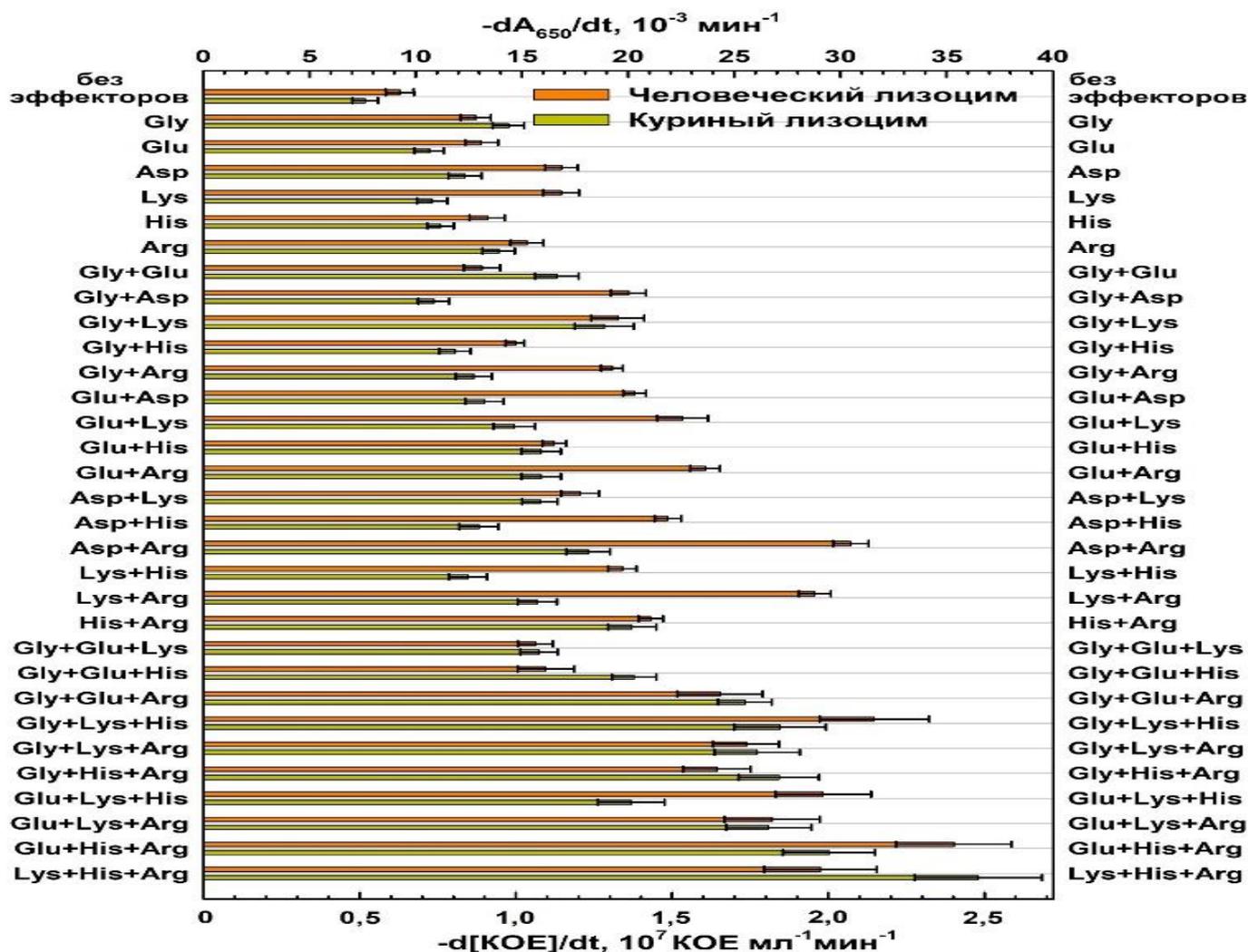


Рисунок 5. Сравнение скоростей лизиса клеток *E. coli* лизоцимом в присутствии одной, двух и трех аминокислот (согласно обозначениям на рисунке). Концентрация глицина 1,5 мМ. Остальные аминокислоты добавлены в концентрациях 5 мМ. Буферная смесь 0,01 М Трис-MES-Na₂CO₃ с добавлением 25 мМ NaCl, pH 8,5.

Как мы видим, двойные сочетания факторов действительно дают ещё больший эффект увеличения скорости лизиса клеток в сравнении с одинарными добавками. Заметим, что согласно рис. 3 (см. с. 8) 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 факторов. Эффекты тройных добавок аминокислот, в свою очередь, превосходят эффекты двойных. Для человеческого лизоцима лучший результат демонстрирует сочетание глутамат + гистидин + аргинин, а для куриного лизоцима наилучший результат даёт сочетание лизин + гистидин + аргинин.

Эффекты увеличения скорости лизиса клеток лизоцимом в присутствии аминокислот сохраняются и в буферных растворах других составов, например, в фосфатном буферном растворе. В данной работе было показано, что композиции из четырех и пяти аминокислот (глутамата, лизина, аргинина и гистидина в концентрациях 5 мМ и 1,5 мМ глицина) одинаково эффективно увеличивает скорость лизиса клеток *E. coli* человеческим и куриным лизоцимами в боратно-карбонатном буферном растворе. При этом в области низкой ионной силы (до 10 мМ добавленного NaCl), как показано на рис. 6, скорость лизиса клеток увеличивается до 9,6 раз для человеческого лизоцима в присутствии глутамата + гистидина + аргинина и до 10,3 раз для куриного лизоцима в присутствии лизина + гистидина + аргинина, соответственно.

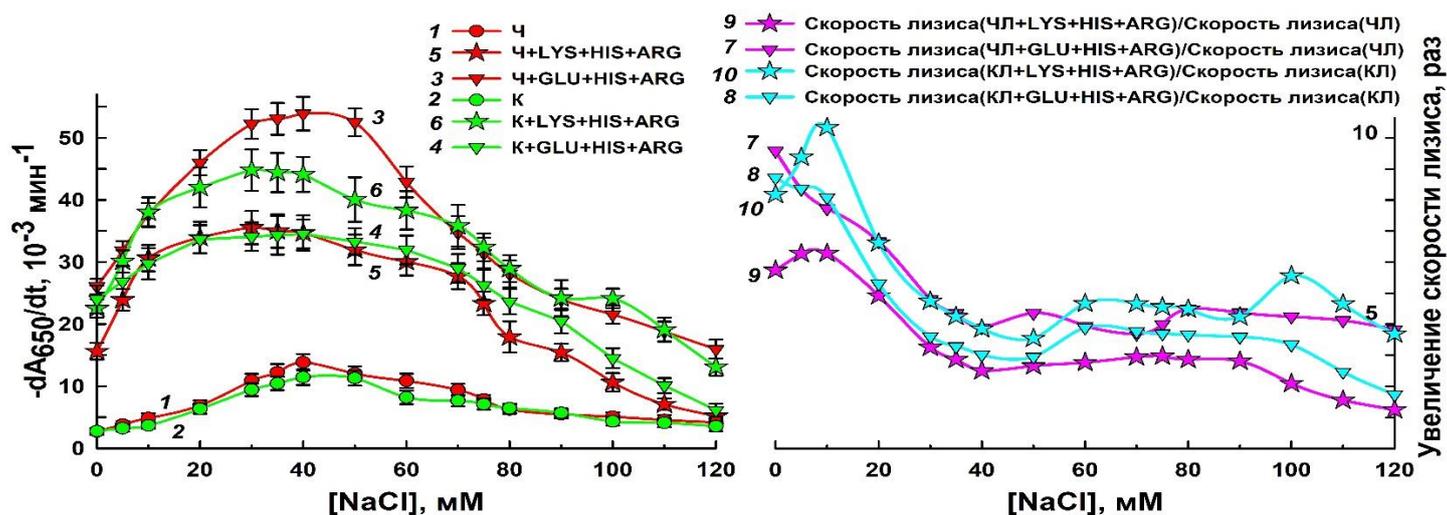


Рисунок 6. Зависимости скорости лизиса клеток *E. coli* лизоцимом от концентрации NaCl при одновременном присутствии трех свободных аминокислот. Буферная смесь 0,01 М Трис-НСl, рН 8,5. Каждый фактор добавлен в концентрации 5 мМ. 1, 2 — скорость лизиса клеток человеческого лизоцимом (Ч) и куриным лизоцимом (К) без фактора; 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 в присутствии Glu+His+Arg; 9, 10 – кратность увеличения скорости лизиса клеток Ч и К в присутствии Lys+His+Arg.

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

Сочетанное антибактериальное действие заряженных аминокислот и лизоцима

Усиление антибактериальных свойств лизоцима в присутствии смеси пяти аминокислот демонстрирует изменение динамики роста клеток *E. coli* (рис. 7).

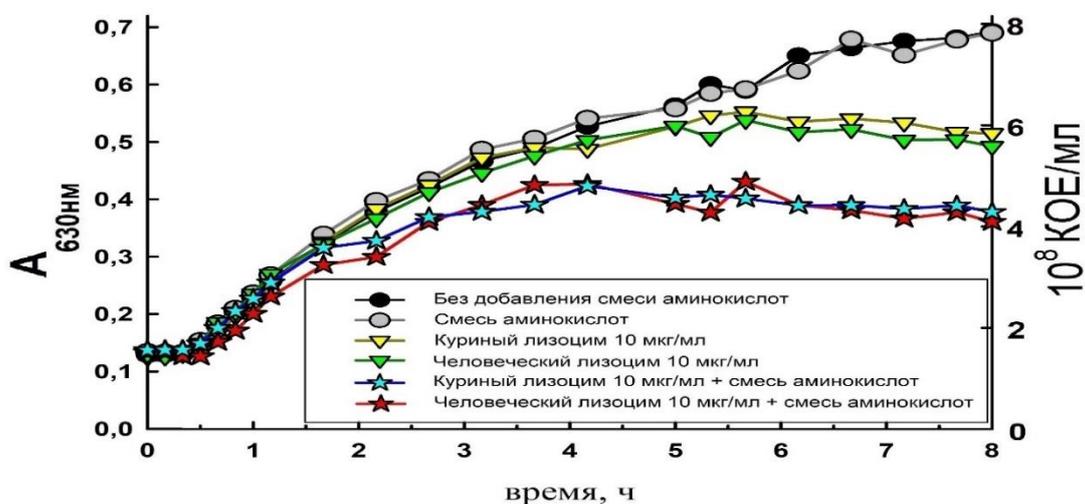


Рисунок 7. Рост бактерий *E. coli* в присутствии лизоцима и смеси аминокислот (согласно обозначениям на рисунке). Состав смеси аминокислот: Gly+Glu+Lys+His+Arg (1,5 мМ Gly и по 5 мМ остальных аминокислот). LB питательная среда (бактотриптон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, NaCl 5 г/л), рН 7,2. Длина оптического пути 0,6 см. 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 [19]. 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 [20]. 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. В табл. 1 приведены полученные результаты. 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 [21], другие называют величину 3,2 мг/мл [22]. Наш результат наиболее близок к полученному в 2018 году российскими исследователями А.В. Сгибневым и Е.А. Кремлевой [23]. Авторы сообщают о МБК лизоцима составляет 110 мкг/мл.

Таблица 1. Определение минимальной бактерицидной концентрации человеческого и куриного лизоцимов в присутствии и в отсутствие смесей аминокислот по отношению к клеткам *E. coli*. 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. pH 7,2.

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*	-	-	-	++	++

Согласно данным табл. 1 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% [23]. Модификация лизоцима кофейной кислотой и п-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 [21]. 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. 2.

Таблица 2. 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

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*.

Сравнение влияния аминокислот на скорость лизиса разных бактериальных клеток лизоцимом

В табл. 3 показано, что в присутствии смеси пяти аминокислот (Glu + Lys + Arg + His (по 5 мМ каждой аминокислоты) и 1,5 мМ Gly) эффекты увеличения скорости лизиса клеток лизоцимом наблюдаются для пяти бактериальных штаммов.

Таблица 3. Сравнение скоростей лизиса разных бактерий куриным и человеческим лизоцимами в присутствии пяти аминокислот: Lys+His+Arg+Glu+Gly. Буферная смесь 15 мМ Na₂HPO₄, 15 мМ KН₂PO₄, pH 7,4.

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 cerotovorа</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

Погрешность всех измерений, представленных в таблице, составляла не более 20%.

Так, двухкратное увеличение скорости лизиса клеток наблюдается для штаммов *E. coli* КМ МГУ 85, *P. megaterium* КМ МГУ 17, *P. megaterium* ATCC 14581 (В-9869, основной штамм в данной работе) и *P. fluorescens* КМ МГУ 71. Наибольший эффект увеличения скорости лизиса клеток лизоцимом в присутствии смеси пяти аминокислот в условиях, близких к физиологическим, наблюдается для клеток *E. coli*. KS-507 (В-3254, основной штамм в данной работе) и составляет 4,2-4,4 раза. Мы предполагаем, что активирующее действие аминокислот вызвано одновременным увеличением продуктивной адсорбции лизоцима и блокировкой действия белковых ингибиторов лизоцима С-типа (куриного типа), которые известны для семейств Bacillaceae (к которому относят *P. megaterium*), *Escherichia* и *Pseudomonas*.

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. На рис. 8 представлены спектры флуоресценции лизоцима в присутствии аминокислот.

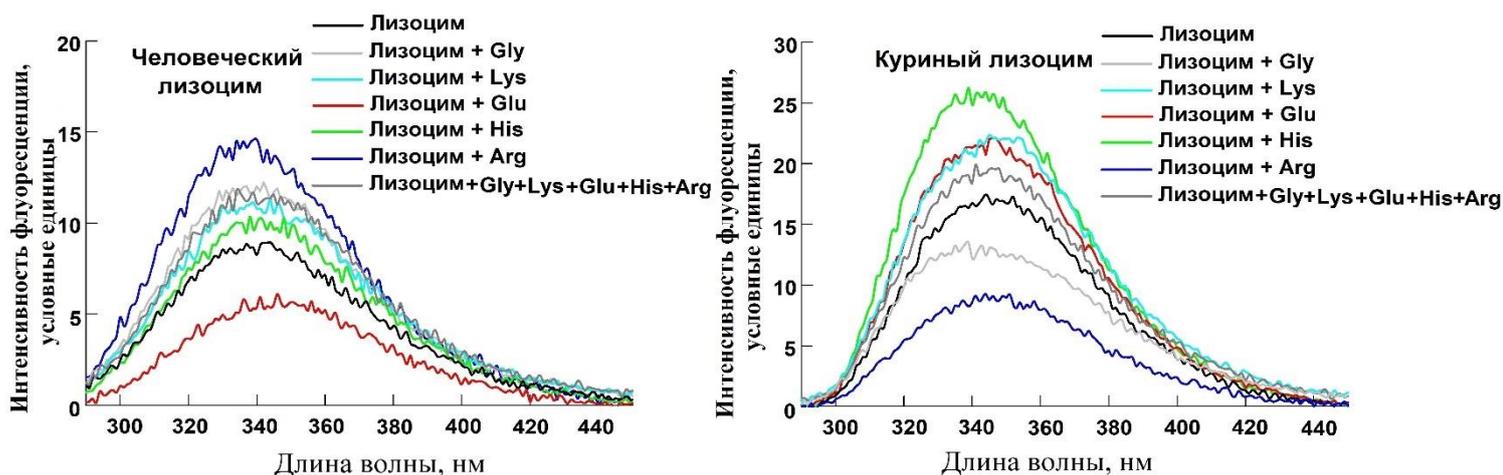


Рисунок 8. Спектры флуоресценции человеческого и куриного лизоцимов в присутствии аминокислот (согласно обозначениям на рисунке). Длина возбуждающего света 280 нм. Концентрация лизоцима 0,1 мг/мл. Концентрация аминокислот 5 мМ. 0,01 М Трис-MES с добавлением 25 мМ NaCl, pH 8,5, 37°C.

Различия в спектрах флуоресценции лизоцима в отсутствие аминокислот и в их присутствии мы интерпретировали как свидетельство взаимодействия молекулы фермента со свободными аминокислотами. По-видимому, взаимодействие с аминокислотами происходит вблизи остатков триптофана, которые, как известно, вносят наибольший вклад в флуоресценцию при длине волны возбуждающего света 280 нм. Изменение микроокружения остатков триптофана в результате взаимодействия с аминокислотой вполне могло привести к изменению интенсивности флуоресценции лизоцима. Наиболее доступными (находящимися на поверхности белка) являются остатки Trp-123 и Trp-63 у куриного лизоцима, и Trp-34 и Trp-64 у человеческого. Поскольку триптофан, как правило, участвует в гидрофобных и стеклинг-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.

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

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. Для того чтобы правильно интерпретировать результаты эксперимента по измерению сорбционных параметров лизоцима в присутствии аминокислот, мы должны сначала выяснить, какие именно сорбционные параметры и в какую сторону изменяются при изменении тех или иных факторов. На рис. 9 представлены изотермы адсорбции человеческого и куриного лизоцимов на клетках *E. coli* при разных pH среды.

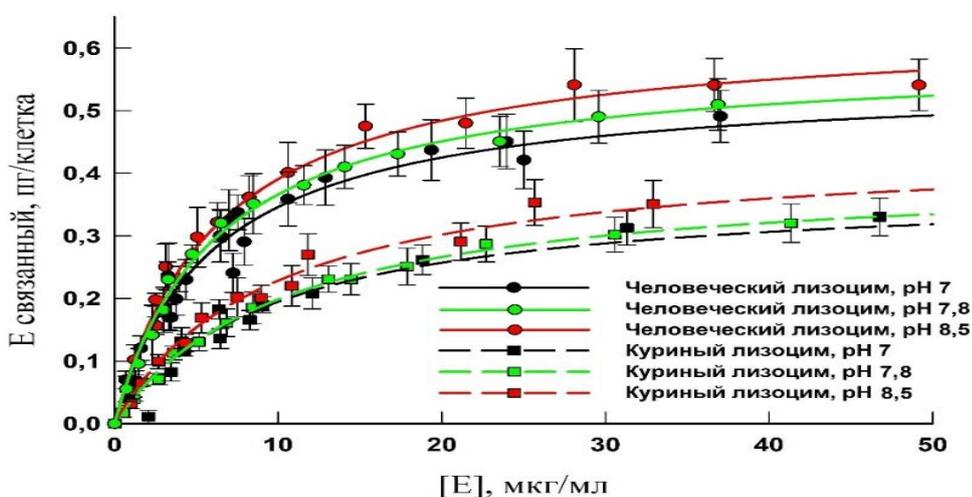


Рисунок 9. Изотермы адсорбции человеческого и куриного лизоцимов на клетках *E. coli* при разных значениях pH (согласно обозначениям на рисунке). Буферная смесь 0,01 М Трис-MES с добавлением 25 мМ NaCl.

Заметим, что все полученные экспериментальные данные по исследованию адсорбции лизоцима в разных условиях, проведенные в этой работе, удовлетворительно описываются уравнением адсорбции Ленгмюра. Сорбционное равновесие при этом устанавливалось за 5-7 минут. Небольшие отклонения экспериментальных данных от уравнения Ленгмюра могут объясняться 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 (K_d) и максимальная сорбционная емкость клеток по отношению к ферменту (V_{max}) (то есть максимальное количество лизоцима, способное адсорбироваться на поверхности клеток). Рассчитанные параметры адсорбции приведены в табл. 4. Значения максимальной сорбционной емкости клеток по отношению к двум лизоцимам различаются в одних и тех же условиях приблизительно на 20-30%, 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, данных, приведенных в табл. 4, недостаточно, чтобы достоверно определить характер изменения максимальной сорбционной емкости клеток по отношению к лизоциму с

увеличением pH, однако, как далее показано в табл. 6 (см. с. 20), средние значения максимальных сорбционных емкостей клеток при pH 8,5 на 15-30% выше, чем при pH 7,0. Таким образом, мы можем утверждать об увеличении максимальной сорбционной емкости клеток с ростом pH.

Таблица 4. Адсорбция человеческого и куриного лизоцимов на клетках *E. coli* при разных pH. Сорбционные параметры, рассчитанные по уравнению Ленгмюра.

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

Ч – человеческий лизоцим, К – куриный лизоцим.

Для того, чтобы определить влияние ионной силы на сорбционные параметры лизоцима, мы построили изотермы адсорбции лизоцима в буферных растворах с разной концентрацией NaCl. Проверить влияние фактора ионной силы на адсорбцию фермента было крайне важно, поскольку используемые нами в работе эффекторы являются электролитами и сами по себе изменяют ионную силу раствора. В работе было показано, что при увеличении концентрации NaCl с 0 мМ до 60 мМ константа десорбции увеличивается в 9,8 раз для человеческого, и 9,5 раз для куриного лизоцимов. 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.

Влияние свободных аминокислот на адсорбцию лизоцима на клетках *E. coli*

В табл. 6 (см. с. 20) показано, что заряженные аминокислоты и глицин в концентрациях, при которых наблюдается наибольшая скорость лизиса клеток *E. coli* лизоцимом, уменьшают константы десорбции фермента в 1,4-2,0 раза как для человеческого, так и для куриного лизоцимов. При этом максимальная сорбционная емкость клеток остается постоянной. Эффекты уменьшения константы десорбции проявляются и при pH 7,0 и при pH 8,5. Использование же двойных и тройных смесей аминокислот приводит к еще более существенному снижению констант десорбции фермента. Так, для парных сочетаний аминокислот константы десорбции в 1,5-3,7 меньше, чем в отсутствие эффекторов для человеческого лизоцима, а для куриного лизоцима - в 1,4-2,7 раз меньше. Для тройных сочетаний – в 2,0-3,8 раз меньше для человеческого лизоцима и в 2,0-4,8 для куриного. В табл. 7 (с. 21) приведены значения сорбционных параметров человеческого и куриного лизоцима для двойных и тройных смесей аминокислот. Видим, что присутствие сразу нескольких аминокислот еще сильнее увеличивает скорость лизиса клеток и уменьшает константу десорбции лизоцима на клетках по сравнению с присутствием только одной аминокислоты. Заметим так же, что сочетания аминокислот, при которых наблюдалась наибольшая скорость лизиса клеток лизоцимом, 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 ($1,4 \cdot 10^{-7} \pm 0,2 \cdot 10^{-7}$ М) оказалась наименьшей из констант десорбции куриного лизоцима для 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, при которой, как было показано ранее, наблюдается наибольшее увеличение скорости лизиса клеток (в 3,8 раз). Подобные корреляции наблюдаются и для двойных смесей. И хотя эксперимент дает ощутимую погрешность измеренных констант десорбции, многократное проведение однотипных экспериментов позволило утверждать, что константы десорбции уменьшаются в присутствии аминокислот тем существеннее, чем сильнее аминокислоты увеличивали скорость лизиса клеток лизоцимом. Наличие корреляции между уменьшением константы десорбции и увеличением скорости лизиса клеток лизоцимом в присутствии соответствующих смесей аминокислот подтверждает вычисленный коэффициент ранговой корреляции Спирмена для массива данных из табл. 6 и 7 (см. с. 20-21, рН 8,5). Коэффициент Спирмена для человеческого лизоцима составил $-0,966$ с $P\text{-value } 3,3 \cdot 10^{-19}$. Для куриного лизоцима коэффициент корреляции Спирмена оказался равен $-0,934$ с $P\text{-value } 6,1 \cdot 10^{-15}$. Близкие к -1 значения коэффициентов корреляции вкупе с чрезвычайно низкими значениями $P\text{-value}$ фактически гарантирует, что между величиной константы десорбции лизоцима и скоростью лизиса клеток лизоцимом существует математическая зависимость. Таким образом, улучшение продуктивной адсорбции фермента на клетках является, как минимум, одним из механизмов увеличения эффективности работы лизоцима.

Влияние ионов кальция на бактериолитическую активность лизоцима

На рис. 10 представлено уменьшение скорости лизиса клеток *E. coli* KS-507 и *P. megaterium* ATCC 14581 куриным лизоцимом в присутствии ионов кальция.

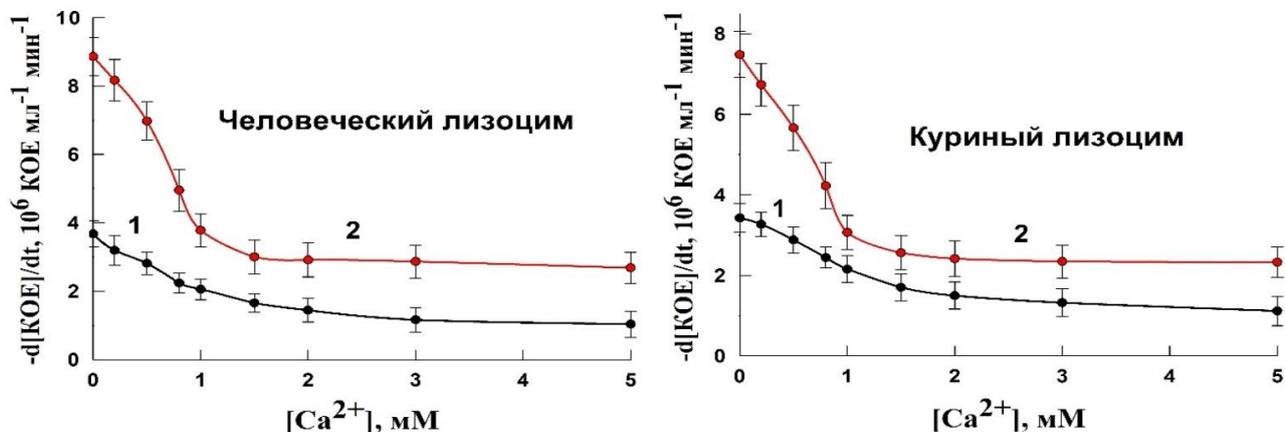


Рисунок 10. Зависимости скорости лизиса клеток *P. megaterium* ATCC 14581 (1) и *E. coli* KS-507 (2) куриным и человеческим лизоцимами от концентрации CaCl_2 . Буферная смесь для *E. coli*: 0,01 М Трис-MES с добавлением 25 мМ NaCl, рН 8,5, концентрация лизоцима 0,1 мкг/мл. Буферная смесь для *P. megaterium*: 0,02 М Трис-HCl с добавлением 55 мМ NaCl, рН 8,0, концентрация лизоцима 0,5 мкг/мл.

И для человеческого, и для куриного лизоцима наблюдаются схожие зависимости скорости лизиса клеток от концентрации ионов кальция. Видим, что ионы кальция, в отличие от заряженных аминокислот, замедляют скорость лизиса клеток лизоцимом. В отличие от *E. coli* зависимости для *P. megaterium* не имеют участка с выраженным резким падением скорости лизиса клеток при малых концентрациях CaCl_2 . 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 вкупе со связыванием ионов кальция с молекулой лизоцима приводит к общему замедлению скорости лизиса клеток. В данной работе также показано, что ингибирующее действие ионов кальция распространяется и на человеческий лизоцим и проявляется в диапазоне pH как минимум от 7,0 до 9,0. Таким образом, мы можем утверждать, что ингибирующий эффект ионов кальция не ограничивается клетками *E. coli* и определенным составом буферного раствора, а имеет более общий характер.

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

В работе показано, что в присутствии 5 мМ CaCl₂ максимальная сорбционная емкость клеток падает в 3,7 раз по отношению к человеческому и 4,0 раза по отношению к куриному лизоциму. По-видимому, ионы кальция уменьшают количество мест посадки фермента на поверхности клеток. Уменьшение адсорбции фермента на клетках сопровождается уменьшением скорости лизиса клеток, а следовательно, понижается доля продуктивной адсорбции. При этом, константы десорбции лизоцима постепенно увеличиваются по мере увеличения концентрации ионов кальция. Мы объясняем это изменением ионной силы буферного раствора. 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 лизоцимом 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. В табл. 5 приведены вычисленные параметры адсорбции лизоцима и измеренные относительные изменения скоростей лизиса клеток лизоцимом в присутствии 5 мМ CaCl₂ и тройных сочетаний аминокислот, продемонстрировавших наиболее высокие скорости лизиса клеток.

Таблица 5. Сравнение изменения скоростей ферментативного лизиса клеток *E. coli* и параметров адсорбции человеческого и куриного лизоцимов при одновременном присутствии трех аминокислот и CaCl₂. Буферная смесь 0,01 М Трис-HCl с добавлением 10 мМ NaCl, pH 8,5.

Эффектор	Тип лизоцима	Отношение скорости лизиса клеток в присутствии эффектора к скорости лизиса клеток в отсутствие эффектора	Константа десорбции фермента на поверхность и клеток K _d , 10 ⁻⁷ М	Максимальная сорбционная емкость клеток по лизоциму V _{max} , пг/клетка (слева); аттомоль/клетка (справа)		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
				0,62±0,05	38±3		
нет	Ч	1	1,8±0,3	0,62±0,05	38±3	1	1
нет	К	1	2,4±0,5	0,48±0,04	34±3	1	1
Glu, His, Arg, CaCl ₂	Ч	1,5±0,2	2,3±0,3	0,19±0,03	12±2	0,9±0,1	3,3±0,8
Lys, His, Arg, CaCl ₂	К	1,9±0,3	4,0±1,0	0,14±0,02	10±1	0,5±0,2	3,4±0,8
Glu, His, Arg	Ч	7,7±1,0	0,7±0,3	0,62±0,06	38±4	2,5±1,5	1,0±0,2
Lys, His, Arg	К	10,3±1,4	0,9±0,3	0,45±0,03	31±2	2,7±1,7	1,1±0,2
CaCl ₂	Ч	0,3±0,1	3,1±0,6	0,18±0,03	11±2	0,6±0,2	3,4±1,1
CaCl ₂	К	0,3±0,1	4,8±1,0	0,11±0,02	8±1	0,5±0,2	4,4±1,5

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

Таблица 6. Относительные увеличения скорости ферментативного лизиса клеток *E. coli* и параметры сорбции человеческого и куриного лизоцимов в присутствии глицина и заряженных аминокислот при pH 7,0 и 8,5. Буферная смесь 0,01 М Трис-MES с добавлением 25 мМ.

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 $K_d, 10^{-7}$ М	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); <u>аттомоль/клетка (снизу)</u>	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

Таблица 7. Сравнение относительных увеличений скорости ферментативного лизиса клеток *E. coli* и параметров адсорбции человеческого и куриного лизоцимов в присутствии сочетаний двух и трех аминокислот. Буферная смесь 0,01 М Трис-MES с добавлением 25 мМ NaCl, pH 8,5.

Эффектор	Отношение скорости лизиса клеток в присутствии эффектора к скорости лизиса клеток в отсутствие эффектора		Константа десорбции $K_d, 10^{-7}$ М		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±0,7	6,6 ±1,2	0,63±0,04	<u>38±2</u>	0,44±0,02	<u>31±1</u>	1	1
Gly+Glu	1,4±0,2	2,2±0,3	2,6±0,4	3,5±0,6	0,64±0,05	<u>39±3</u>	0,48±0,03	<u>34±2</u>	1,5±0,4	1,9±0,5
Gly+Lys	2,1±0,3	2,5±0,3	1,6±0,2	2,5±0,5	0,61±0,05	<u>37±3</u>	0,46±0,03	<u>32±2</u>	2,3±0,6	2,6±0,7
Glu+Lys	2,4±0,3	1,9±0,2	1,6±0,4	4,7±0,7	0,61±0,06	<u>37±4</u>	0,47±0,03	<u>33±2</u>	2,3±0,8	1,4±0,4
Gly+Asp	2,2±0,3	1,4±0,2	1,8±0,5	4,4±0,7	0,63±0,07	<u>38±4</u>	0,47±0,04	<u>33±3</u>	2,1±0,7	1,5±0,4
Lys+Asp	1,9±0,2	2,1±0,3	2,0±0,5	3,3±0,7	0,62±0,07	<u>38±4</u>	0,44±0,05	<u>31±3</u>	1,9±0,6	2,0±0,6
Gly+His	1,6±0,2	1,6±0,2	2,4±0,5	4,7±0,6	0,67±0,08	<u>41±5</u>	0,47±0,03	<u>33±2</u>	1,6±0,5	1,4±0,3
Glu+Asp	2,2±0,3	1,7±0,2	1,8±0,3	4,3±0,7	0,63±0,04	<u>38±2</u>	0,44±0,03	<u>31±2</u>	2,2±0,6	1,6±0,4
Glu+His	1,8±0,2	2,1±0,3	2,2±0,3	3,4±0,5	0,64±0,03	<u>39±2</u>	0,46±0,03	<u>32±2</u>	1,7±0,4	2,0±0,5
Gly+Arg	2,1±0,2	1,7±0,2	1,8±0,2	3,9±0,7	0,62±0,03	<u>38±2</u>	0,44±0,03	<u>31±2</u>	2,1±0,5	1,7±0,5
Glu+Arg	2,6±0,3	2,1±0,3	1,5±0,2	3,5±0,4	0,62±0,04	<u>38±2</u>	0,47±0,02	<u>33±1</u>	2,6±0,6	1,9±0,4
Lys+His	2,1±0,3	1,6±0,2	1,9±0,2	3,8±0,6	0,62±0,04	<u>38±2</u>	0,47±0,03	<u>33±2</u>	2,0±0,5	1,7±0,4
Lys+Arg	3,1±0,4	2,1±0,3	1,3±0,3	2,9±0,4	0,67±0,08	<u>41±5</u>	0,47±0,02	<u>33±1</u>	2,9±0,8	2,3±0,5
Arg+Asp	3,3±0,4	2,4±0,3	1,0±0,2	3,0±0,6	0,67±0,04	<u>41±2</u>	0,46±0,03	<u>32±2</u>	3,7±0,9	2,2±0,6
His+Asp	2,4±0,3	1,7±0,2	1,6±0,3	4,2±0,5	0,63±0,05	<u>38±3</u>	0,46±0,02	<u>32±1</u>	2,3±0,7	1,6±0,3
His+Arg	2,3±0,3	2,6±0,3	1,8±0,3	2,4±0,3	0,63±0,05	<u>38±2</u>	0,45±0,02	<u>31±1</u>	2,1±0,6	2,7±0,6
Lys+His+Arg	3,1±0,4	4,8±0,6	1,4±0,4	1,4±0,2	0,65±0,08	<u>39±5</u>	0,45±0,02	<u>31±1</u>	2,7±0,9	4,8±1,1
Gly+Lys+Arg	2,8±0,4	3,4±0,4	1,3±0,2	1,9±0,2	0,64±0,05	<u>39±3</u>	0,44±0,02	<u>31±1</u>	3,0±0,7	3,5±0,6
Gly +Lys+His	3,4±0,5	3,6±0,5	1,2±0,2	2,1±0,2	0,69±0,06	<u>42±4</u>	0,45±0,02	<u>31±1</u>	3,3±1,0	3,2±0,6
Glu+Lys+Arg	2,9±0,3	3,5±0,5	1,3±0,3	2,0±0,4	0,68±0,08	<u>41±5</u>	0,45±0,03	<u>31±2</u>	3,4±1,0	3,4±1,0
Glu+His+Arg	3,8±0,5	3,9±0,5	0,9±0,2	2,0±0,4	0,68±0,04	<u>41±2</u>	0,45±0,04	<u>31±3</u>	3,4±1,0	3,0±0,8
Glu+Lys+His	3,2±0,4	2,6±0,4	1,3±0,2	2,2±0,4	0,67±0,06	<u>41±4</u>	0,45±0,02	<u>31±1</u>	3,0±0,8	3,3±0,9
Gly+Glu+Arg	2,6±0,3	3,3±0,4	1,3±0,2	2,0±0,4	0,65±0,04	<u>39±2</u>	0,44±0,03	<u>31±2</u>	3,3±0,9	2,6±0,6
Gly+Glu+His	1,7±0,2	2,7±0,4	2,2±0,5	2,5±0,4	0,60±0,06	<u>36±4</u>	0,46±0,02	<u>32±1</u>	2,6±0,6	3,8±1,2
Gly+His+Arg	2,6±0,3	3,6±0,5	1,3±0,2	1,7±0,4	0,69±0,05	<u>42±3</u>	0,44±0,03	<u>31±2</u>	3,8±1,2	2,0±0,8
Gly+Glu+Lys	1,7±0,2	2,1±0,2	2,5±0,5	3,3±0,9	0,64±0,06	<u>39±4</u>	0,46±0,05	<u>32±3</u>	2,0±0,8	2,0±0,8

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

Из табл. 5 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. В работе также показано, что уменьшение констант десорбции лизоцима в присутствии тройных сочетаний аминокислот и кальция происходит в большой степени, чем для парных сочетаний аминокислоты и кальция.

Наиболее значимым с практической точки зрения является экспериментальный факт, что смеси из трех, четырех и пяти аминокислот оказались способны производить увеличение скорости лизиса клеток лизоцимом (в 1,4-1,9 раз) даже в присутствии высокой концентрации CaCl_2 (5 мМ, выше физиологической в биологических жидкостях) (см. табл. 8).

Таблица 8. Сравнение изменения скоростей лизиса клеток *E. coli* человеческим и куриным лизоцимами в присутствии смесей аминокислот и CaCl_2 в разных условиях.

Эффекторы	Тип лизоцима	Отношение скорости лизиса клеток в присутствии эффектора к скорости лизиса клеток в отсутствие эффектора	
Glu, His, Arg, CaCl_2	Человеческий	1,4±0,2*	1,5±0,2**
Lys, His, Arg, CaCl_2	Куриный	1,7±0,2*	1,9±0,3**
Lys, Glu, His, Arg, CaCl_2	Человеческий	1,5±0,2*	1,7±0,2**
Lys, Glu, His, Arg, CaCl_2	Куриный	1,6±0,2*	1,7±0,2**
Gly, Lys, Glu, His, Arg, CaCl_2	Человеческий	1,6±0,2*	1,6±0,2**
Gly, Lys, Glu, His, Arg, CaCl_2	Куриный	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 мМ 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 осмолальностью, но и в присутствии компонент, которые сами по себе препятствуют протеканию лизиса клеток лизоцимом.

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 рН (7,2-7,4). Данная комбинация аминокислот при физиологических значениях рН 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.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sengupta S. et al. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature / Sengupta S., Chattopadhyay M.K., Grossart H.-P. // Front Microbiol. – 2013. – Vol. 4. – № 47. – P. 1–13.
2. Nakamura Y. et al. Enhanced activity of antifungal drugs by lysozyme against *Cryptococcus neoformans* / Nakamura Y., Kano R., Watanabe S., Takahashi H., Hasegawa A. // Mycoses. – 1998. – Vol. 41. – № 5–6. – P. 199–202.
3. Hemalatha K. et al. Binding mode of dihydroquinazolinones with lysozyme and its antifungal activity against *Aspergillus species* / Hemalatha K., Madhumitha G., Ravi L., Khanna V.G., Al-Dhabi N.A., Arasu M.V. // J Photochem Photobiol B. – 2016. – Vol. 161. – P. 71–79.

4. Ellepola A.N.B. et al. Impact of Brief Exposure to Drugs with Antifungal Properties on the Susceptibility of Oral *Candida dubliniensis* Isolates to Lysozyme and Lactoferrin / Ellepola A.N.B., Dassanayake R.S., Khan Z. // *Med Princ Pract.* – 2018. – Vol. 27. – № 6. – P. 523–530.
5. Singh I.P. et al. Recent advances in anti-HIV natural products / Singh I.P., Bodiwala H.S. // *Nat Prod Rep.* – 2010. – Vol. 27. – № 12. – P. 1781–1800.
6. Mai W. et al. Protection of blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) against the White Spot Syndrome Virus (WSSV) when injected with shrimp lysozyme / Mai W., Wang W. // *Fish Shellfish Immunol.* – 2010. – Vol. 28. – № 4. – P. 727–733.
7. Wei S. et al. Molecular cloning and characterization of c-type lysozyme gene in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* / Wei S., Huang Y., Cai J., Huang X., Fu J., Qin Q. // *Fish Shellfish Immunol.* – 2012. – Vol. 33. – № 2. – P. 186–196.
8. Sava G. et al. Lysozyme and cancer: role of exogenous lysozyme as anticancer agent (review) / Sava G., Benetti A., Ceschia V., Pacor S. // *Anticancer Res.* – 1989. – Vol. 9. – № 3. – P. 583–591.
9. Ferraboschi P. et al. Applications of Lysozyme, an Innate Immune Defense Factor, as an Alternative Antibiotic / Ferraboschi P., Ciceri S., Grisenti P. // *Antibiotics.* – 2021. – Vol. 10. – № 12. – P. 1534–1570.
10. Davidson P.M. et al. *Antimicrobials in Food*. 4th ed. / Davidson P.M., Taylor T.M., David J.R.D // Boca Raton: CRC Press. – 2020. – 826 p.
11. Ragland S.A. et al. From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme / Ragland S.A., Criss A.K. // *PLoS Pathog.* – 2017. – Vol. 13. – № 9. – P. e1006512.
12. Levashov P.A. et al. Bacteriolytic Activity Of Human Interleukin-2, Chicken Egg Lysozyme In The Presence Of Potential Effectors / 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. // *Acta Naturae.* – 2017. – Vol. 9. – № 2. – P. 82–87.
13. Imoto T. et al. Yamada H. Binding of Calcium to Lysozyme and Its Derivatives / Imoto T., Ono T. // *J Biochem.* – 1981. – Vol. 90. – № 2. – P. 335–340.
14. Березин И.В. и др. Кинетика ферментативных реакций в гетерогенных системах. I. Кинетические закономерности расщепления бактериальных клеток *Micrococcus lysodeikticus* под действием лизоцима / Березин И.В., Клесов А.А., Рабинович М.Л. // *Биоорг. химия.* – 1976. – Т. 2. – № 5. – С. 680–688.
15. Рабинович М.Л. и др. Кинетика ферментативных реакций в гетерогенных системах. II. Бактериолитическое действие лизоцима на клетки *Micrococcus lysodeikticus* / Рабинович М.Л., Клесов А.А., Березин И.В. // *Биоорг. химия.* – 1976. – Т. 2. – № 5. – С. 689–699.
16. Levashov P.A. et al. Quantitative Turbidimetric Assay of Enzymatic Gram-Negative Bacteria Lysis / Levashov P.A., Sedov S.A., Shipovskov S., Belogurova N.G., Levashov A. V. // *Anal Chem.* – 2010. – Vol. 82. – № 5. – P. 2161–2163.
17. Sedov S.A. et al. Lysis of *Escherichia coli* cells by lysozyme: Discrimination between adsorption and enzyme action / Sedov S.A., Belogurova N.G., Shipovskov S., Levashov A. V., Levashov P.A. // *Colloids Surf B Biointerfaces.* – 2011. – Vol. 88. – № 1. – P. 131–133.
18. Матольгина Д.А. и др. Определение активности и измерение сорбции бактериолитического фермента в системе живых клеток *Lactobacillus plantarum* / Матольгина Д.А., Осипова Е.Э., Смирнов С.А., Белогурова Н.Г., Еремеев Н.Л., Тишков В.И., Левашов А.В., Левашов П.А. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер 2. Химия.* – 2015. – Т. 56. – № 6. – С. 365–371.
19. Бекерель С. и др. Композиции для усиления антибактериальной активности миелопероксидазы и способы их применения / Бекерель С., Хааг У., Абрил-Хорпел О., Валвани Ш // патент RU2529799C2 USA. Россия. – 2014. – С. 1–68.
20. Вахитов Т. Я. и др. Средство, ингибирующее жизнедеятельность бактерий *Escherichia coli* O75 №5557 (варианты) / Вахитов Т. Я., Полевая Е.В., Шалаева О.Н. // патент RU2524138C2 USA. Россия. – 2014. – С. 1–12.
21. Wang S.W. et al. Study on Antibacterial Activity and Structure of Chemically Modified Lysozyme / Wang S.W., Wang T.Y. // *Molecules.* – 2022. – Vol. 28. – № 1. – P. 1–95.
22. Ye Y. et al. Improved antibacterial performance using hydrogel-immobilized lysozyme as a catalyst in water / Ye Y., Klimchuk S., Shang M., Niu J. // *RSC Adv.* – 2019. – Vol. 9. – № 35. – P. 20169–20173.
23. Sgibnev A.V. et al. Vaginal lactobacilli regulate the activity of muramidase via hydrogen peroxide and surfactants / Sgibnev A. V., Kremleva E.A. // *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* – 2018. – Vol. 95. – № 4. – P. 21–27.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования «eLibrary Science Index»

1. Rastriga N.V. et al. Comparison of the individual and combined actions of charged amino acids and glycine on the lysis of *Escherichia coli* cells by human and chicken lysozyme / **Rastriga N.V.**, Klimov D.A., Gasanova D.A., Levashov P.A. // Process Biochemistry. – 2023. – Vol. 125. – P. 190–197. (объем 0,5 п. л., авт. вклад 61%) [Импакт-фактор WOS JIF = 3,7] doi: 10.1016/j.procbio.2022.12.024.
2. Растрига Н.В. и др. Адсорбция лизоцима на живых клетках *Escherichia coli* и его бактериолитическая активность в присутствии глицина и заряженных аминокислот / **Растрига Н.В.**, Гасанова Д.А., Левашов П.А. // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. – 2023. – Т. 64. – № 2. – С. 195–202. (объем 0,5 п. л.) [Импакт-фактор РИНЦ = 0,558] <https://doi.org/10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-2-195-202>. (**Rastriga N.V.** et al. Adsorption of Lysozyme on Living Cells of *Escherichia coli* and its Bacteriolytic Activity in the Presence of Glycine and Charged Amino Acids / **Rastriga N.V.**, Gasanova D.A., Levashov P.A. // Moscow University Chemistry Bulletin. – 2023. – Vol. 78. – № 2. – P. 89–94. (объем 0,375 п. л., 65% авт. вклад) [Импакт-фактор WOS JIF = 0,7] doi: 10.3103/s0027131423020074.
3. Растрига Н.В. и др. Ферментативный лизис бактерий *Priestia megaterium* лизоцимом / Южаков С.В., Якимов А.Ю., **Растрига Н.В.**, Гасанова Д.А., Климов Д.А., Смирнов С.А., Левашов П.А. // Биотехнология. – 2023. – Т. 39. – № 4. – С. 1–7. (объем 0,437 п. л., авт. вклад 62%) [Импакт-фактор РИНЦ = 0,560] doi: 10.56304/S0234275823040075.
4. Растрига Н.В. и др. Регуляция ферментативного лизиса бактерий: мишень эффектора – это фермент или субстрат? / **Растрига Н.В.**, Еремеев Н.Л., Климов Д.А., Левашов П.А. // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. – 2024. – Т. 65. – № 3. – С. 235–244. (объем 0,625 п. л.) [Импакт-фактор РИНЦ = 0,558] <https://doi.org/10.55959/MSU0579-9384-2-2024-65-3-235-244>. (**Rastriga N.V.** et al. Regulation of Enzyme-Dependent Lysis of Microbial Cells: Is the Effector Target an Enzyme or Substrate? / Rastriga N.V., Eremeev N.L., Klimov D.A., Levashov P.A. // Moscow University Chemistry Bulletin. – 2024. – Vol. 79. – № 3. – P. 195–202. (объем 0,5 п. л., авторский вклад 65%) [Импакт-фактор WOS JIF = 0,7] doi: 10.3103/S0027131424700172.

Статьи в сборниках конференций, индексируемых в базе «Scopus»

1. Rastriga N.V. et al. The Adsorption of Lysozyme on Living *Escherichia Coli* Bacterial Cells in the Presence of Charged Amino Acids and Glycine / **Rastriga N.V.**, Gasanova D.A., Smirnov S.A., Levashov P.A. // BIO Web of Conferences. – 2023. – Vol. 57. – № 02004. – P. 1–6. (объем 0,375 п. л., авт. вклад 63%) [Импакт-фактор Scopus SJR = 0,18] doi: 10.1051/bioconf/20235702004.
2. Rastriga N.V. et al. Combinations of charged amino acids and glycine as enhancers of the antibacterial properties of chicken lysozyme / **Rastriga N.V.**, Gasanova D.A., Smirnov S.A., Levashov P.A. // BIO Web of Conferences. – 2024. – Vol. 118. – № 01014. – P. 1–6. (объем 0,375 п. л., авт. вклад 61%) [Импакт-фактор Scopus SJR = 0,18] doi: 10.1051/bioconf/202411801014.
3. Gasanova D.A. et al. Resistance of various soil geosystem bacteria to enzymatic lysis at different pH / Gasanova D.A., Smirnov S.A., **Rastriga N.V.**, Klimov D.A., Levashov P.A. // E3S Web of Conferences. – 2024. – Vol. 555. – № 02004. – P. 1–9. (объем 0,56 п. л., авт. вклад 63%) [Импакт-фактор Scopus SJR = 0,18] doi: 10.1051/e3sconf/202455502004.