


МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. Ломоносова

На правах рукописи



ЛЕВАШОВ

Павел Андреевич

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ЛИЗИС БАКТЕРИЙ

03.01.04 –Биохимия

03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

диссертация на соискание учёной степени

доктора химических наук

Научный консультант:
доктор химических наук,
профессор В.И. Тишков

Москва – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

I.	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	7
II.	ВВЕДЕНИЕ	9
2.1.	Актуальность темы исследования	9
2.2.	Степень разработанности темы исследования	11
2.3.	Цели и задачи исследования	12
2.4.	Научная новизна	13
2.5.	Теоретическая и практическая значимость работы	15
2.6.	Методология и методы исследования	16
2.7.	Положения, выносимые на защиту	16
2.8.	Степень достоверности и апробация работы	18
2.9.	Публикации	19
2.10.	Структура и объем работы	19
III.	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	20
3.1.	Бактериолитические ферменты и их природные субстраты	20
3.1.1.	Клеточная стенка и связанные с ней структуры	20
3.1.2.	Ферменты бактерий	24
3.1.3.	Ферменты бактериофагов	26
3.1.4.	Ферменты грибов	28
3.1.5.	Ферменты растений	28
3.1.6.	Ферменты животных	29
3.2	Ферментативные и неферментативные свойства лизоцима	30
3.2.1.	Лизоцим как фермент. Особенности измерения активности фермента на живых целых бактериальных клетках. Турбодиметрия в измерении количества бактериальных клеток и скорости их лизиса. Сорбция фермента на субстрате.	30

3.2.2.	Антимикробная, противогрибковая, противовирусная, противораковая и иммуномоделирующие активности лизоцима.	34
3.3.	Интерлейкин-2	36
3.4.	Система комплемента и фактор С2	37
3.5.	Серотрансферрин	40
3.6.	Химическая модификация лизоцима, усиливающая эффективность действия фермента.	42
3.7.	Методы иммобилизации и свойства иммобилизованного лизоцима	45
IV.	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	48
4.1.	Материалы и основное оборудование	48
4.2.	Методы исследования	50
4.2.1.	Подготовка субстратов (бактериальных клеток)	50
4.2.2.	Определение общего белка	53
4.2.3	Определение бактериолитической активности растворимого фермента на бактериальных клетках	53
4.2.4.	Определение скорости ферментативного лизиса бактериальных клеток в присутствии дополнительных эффекторов	54
4.2.5.	Определение бактериолитической активности иммобилизованного лизоцима на бактериальных клетках	55
4.2.6.	Подсчёт клеток (КОЕ) и измерение внеклеточного уровня активности ГАФД для сопоставления с данными турбидиметрии	56
4.2.7.	Изучение сорбции лизоцима на бактериальных клетках	57
4.2.8.	Выделение ферментов бактериофага SPZ7	57
4.2.9.	Выделение бактериолитических ферментов из плазмы крови барана	59

4.2.10.	Выделение бактериолитического фактора из плазмы крови человека	60
4.2.11.	Определение молекулярной массы и чистоты выделенных ферментов	61
4.2.12.	Масс-спектрометрия при идентификации ферментов	62
4.2.12.1.	Бактериолитические ферменты барана	62
4.2.12.2.	Бактериолитические ферменты человека	63
4.2.13.	Химическая модификация лизоцима	64
4.2.14.	Определение степени модификации лизоцима	65
4.2.15.	Исследование размеров внутренних пор матрицы, предназначенной для иммобилизации фермента	65
4.2.16.	Иммобилизация лизоцима	66
4.2.16.1.	Иммобилизация лизоцима при помощи активации матрицы BrCN (метод 1)	66
4.2.16.2.	Иммобилизация лизоцима на матрицу, активированную с помощью периодата натрия (метод 2); получение аминированной матрицы для метода 3	67
4.2.16.3.	Иммобилизация лизоцима на аминированную матрицу с использованием глутарового альдегида (метод 3)	68
4.2.17.	Определение количества иммобилизованного лизоцима	68
4.2.18.	Хранение препарата иммобилизованного лизоцима	69
4.2.19.	Исследование смыва иммобилизованного лизоцима (контроль утечки лизоцима)	69
4.2.20.	Изучение лизиса бактериальных клеток при пропускании их через колонку с иммобилизованным лизоцимом при физиологических значениях ионной силы и pH	69
4.2.21.	Исследование сорбции эндотоксина на иммобилизованном лизоциме методом сорбции в объеме (batch chromatography)	70

4.2.22.	Исследование адсорбции IgG на иммобилизованном лизоциме методом сорбции в объёме (batch chromatography)	71
4.2.23.	Исследование связывания белков плазмы крови сорбентом методом колоночной хроматографии и электрофореза элюатов в денатурирующих условиях	71
4.2.24.	Автоклавирование сорбентов	72
4.2.25.	Проверка совместимости материалов с кровью человека для определения возможности создания сорбционного материала медицинского назначения	72
4.2.26.	Гемосовместимость матрицы	73
4.2.27.	Гемолиз в присутствии лизоцима (проверка возможности использования иммобилизованного лизоцима в качестве гемосорбента)	73
4.2.28.	Исследование гемосовместимости сорбента	74
V.	РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	75
5.1.	Методические особенности измерения скорости ферментативного лизиса бактериальных клеток. Выбор условий эксперимента для обеспечения ферментативной стадии расщепления клеток как скорость лимитирующей.	75
5.2.	Турбидиметрический метод измерения активности. Разработка математической модели для описания кинетики ферментативного лизиса бактериальных клеток.	84
5.3.	Сорбция бактериолитического фермента на субстрате. Сопоставление равновесных параметров сорбции и кинетических данных скорости лизиса клеток в одинаковых условиях.	95
5.4.	Поиск и исследование новых бактериолитических ферментов. Выделение и исследование ферментов сальмонелльного бактариофага SPZ7. Обнаружение и исследование бактериолитической активности C2 компонента комплемента.	

	Обнаружение и исследование бактериолитической активности интерлейкина-2. Обнаружение и исследование бактериолитической активности серотрансферрина.	108
5.4.1.	Бактериолитические ферменты сальмонелльного бактериофага SPZ7	108
5.4.2.	Интерлейкин-2 и компонент системы комплемент C2	112
5.4.3	Серотрансферрин	115
5.5.	Субстратная специфичность бактериолитических ферментов на различных субстратах – бактериальных клетках. Сравнение действия куриного яичного лизоцима и интерлейкина-2 человека, общие закономерности и различия.	118
5.6.	Влияние низкомолекулярных эффекторов на активность бактериолитических ферментов. Сравнение скоростей лизиса клеток <i>E.coli</i> куриным яичным лизоцимом и интерлейкином-2 человека в присутствии различных веществ (биогеенных аминов, аминокислот, пептидных антибиотиков, милдроната).	128
5.7.	Влияние ПАВ на ферментативный лизис бактериальных клеток.	137
5.8.	Химическая модификация фермента для улучшения бактериолитических свойств (на примере куриного яичного лизоцима).	142
5.9.	Иммобилизация лизоцима.	147
V.	ВЫВОДЫ	160
VI.	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	162
	Список публикаций автора с соавторами по теме работы	189
	Благодарности	195

I. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат

БОЕ – бляшкообразующие единицы

БСА – бычий сывороточный альбумин

ГАФД – глицеральдегидфосфатдегидрогеназа

ДСН – додецилсульфат натрия

ГРМ – гидролизат рыбной муки

ИФА – иммуноферментный анализ

КОЕ – колониеобразующие единицы

ЛПС – липополисахарид бактерий (эндотоксин)

ЛСМ – лектинсвязывающий маннан

МАК – мембранатакаяющий комплекс

ПАВ – поверхностно активное вещество

ТЕМЕД – тетраметилэтилендиамин

Трис – трис(оксиметил)аминометан

ФНО – фактор некроза опухоли

ЭДТА – этилендиаминотетраацетат

САРВ – кокоамидопропил бетаин

С2 – компонент С2 системы комплемент

DTAB – бромид додецилтриметиламмония

Fc – константная часть иммуноглобулина G

IgG – иммуноглобулин G

IgM – иммуноглобулин M

LAL – лизат амебоцитов *Limulus polyphemus*

NAD⁺ – никотинамидадениндинуклеотид, окисленный

NADH – никотинамидадениндинуклеотид, восстановленный

NADP⁺ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат, окисленный

NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат, восстановленный

NAG – N-ацетилглюкозамин

NAM – N-ацетилмурамовая кислота

NK-клетки (натуральные киллеры)

TNBS – 2,4,6-тринитробензолсульфоная кислота

II. ВВЕДЕНИЕ

2.1. Актуальность темы исследования

Бактериолитическими называют ферменты, осуществляющие разрушение (лизис) бактерий, а именно гидролизующие связи в полимерном материале клеточных стенок. Чаще всего полимер клеточной стенки бактерии представляет собой муреин, сополимер, содержащий и полисахаридные и олигопептидные фрагменты. Бактериолитические ферменты широко распространены в природе, они синтезируются и используются различными организмами: вирусами-бактериофагами, бактериями, грибами, растениями и животными. Изучение различных факторов, влияющих на свойства бактериолитических ферментов, является исключительно важной задачей, которая может углубить наше понимание особенностей защитных функций организма и дать возможность разрабатывать новые типы лекарств, способных помогать работе иммунной системы. Бактериолитические ферменты широко применяются в биотехнологии и медицине. В биотехнологии такие ферменты используются, например, как консерванты, при препаративном выделении биополимеров из бактерии, а также в генной инженерии при внедрении в бактериальную клетку нового генетического материала. В медицине бактериолитические ферменты используют в противоожоговых повязках, в составе спреев и таблеток для рассасывания, которые применяют при различных заболеваниях. В последние годы во всём мире возрос интерес к бактериолитическим ферментам как альтернативе антибиотикам в борьбе с резистентными микроорганизмами, число которых лавинообразно растёт. Наиболее известным из бактериолитических ферментов является лизоцим. О наличии в молоке и белке куриного яйца ферментов, разрушающих бактерии писал Павел

Николаевич Лащенко ещё в 1909 году. В 1921 году Александр Флеминг установил наличие в различных биологических жидкостях бактериолитического фермента, который и был назван им лизоцимом. В 1965 году, благодаря работам Дэвида Чилтона Филлипса, лизоцим стал первым в истории биохимии ферментом с полностью установленной трёхмерной структурой молекулы на основе данных рентгеноструктурного анализа. Несмотря на длительную историю изучения лизоцима и других бактериолитических ферментов, тем не менее, остаётся много нерешённых вопросов. В реальных условиях субстратом бактериолитического фермента являются целые живые бактериальные клетки. Многие ферментативные свойства лизоцима до сих пор были изучены только на синтетических субстратах или на ограниченном наборе стандартных модельных клеток. Для адекватного понимания особенностей действия бактериолитических ферментов в природе и при биотехнологическом использовании должен быть проработан вопрос исследования их бактериолитического действия на разнообразные реальные живые бактериальные клетки в различных условиях. До настоящего исследования не было единого подхода в интерпретации экспериментальных данных, полученных на реальном субстрате, - живых бактериальных клетках. Существует подход с изучением действия лизоцима на бактериальные клетки с измерением числа живых клеток с помощью прямого метода - микробиологического посева. Такой подход отличается трудоёмкостью, низкой точностью и ограниченными возможностями изучения кинетики процесса в реальном времени. Методически более простой и удобный способ изучения лизиса клеток в реальном времени – это турбидиметрический, по осветлению суспензии клеток. Однако для турбидиметрического способа до настоящего используются «условные единицы активности», не проработан способ корректной интерпретации

экспериментальных результатов в сопоставлении с подсчётом клеток, данными микробиологического посева.

В настоящей работе поставлена задача выработки единого подхода для измерения активности бактериолитических ферментов на живых бактериальных клетках, сопоставления экспериментальных данных, полученных разными методами. Предпринята разработка адекватной математической модели, объединяющей данные разных методов. Предложен способ корректной интерпретации данных турбидиметрического метода, подходящего для изучения кинетики ферментативного лизиса клеток в реальном времени. Новый методический подход необходим для корректного сравнения свойств бактериолитических ферментов в различных условиях на различных субстратах – живых бактериальных клетках, поиска и исследования новых бактериолитических ферментов. Также отдельные вопросы, поставленные в работе, – это исследование сорбции бактериолитического фермента на клетках в условиях протекания ферментативного лизиса бактерий, возможность изготовления и использования иммобилизованного бактериолитического фермента для биотехнологических и медицинских целей.

2.2. Степень разработанности темы исследования

На момент, предшествующий выполнению данной работы, в литературе имелись многочисленные примеры измерения ферментативного лизиса бактерий с помощью турбидиметрии, так как этот метод позволяет следить за кинетикой в реальном времени. Однако ранее не было известно, какое уравнение связывает данные турбидиметрии и параметры эффективности разрушения клеток, измеряемые другими

методами. По сути, до сих пор данные турбидиметрии использовались как некие «условные величины», которые удобно измерять, но сложно полноценно интерпретировать и сравнивать. Также до выполнения данной работы вообще не было известно о бактериолитической активности у интерлейкина-2, серотрансферрина, компонента системы комплемент С2. До выполнения данной работы не было известно, что активность лизоцима на живых бактериальных клетках зависит от присутствия в растворе глицина и заряженных аминокислот. Не было известно о том, что лизоцим способен связываться с иммуноглобулинами. Не было известно о том, что лизоцим способен эффективно связываться с липополисахаридами бактерий (эндотоксинами).

2.3. Цели и задачи исследования

Целями работы было создание единого методического подхода для экспериментального анализа действия бактериолитических ферментов на живые бактериальные клетки, корректной интерпретации экспериментальных данных, исследование действия лизоцима на разные бактериальные клетки в различных условиях, поиск ранее неизученных бактериолитических ферментов, сравнение лизоцима с другими бактериолитическими ферментами, изучение сорбции фермента на клетках, разработка методик химической модификации и иммобилизации фермента для возможного биотехнологического использования. Для достижения этих целей были поставлены следующие задачи:

- Подбор математической модели для описания процесса ферментативного лизиса бактериальных клеток, связывающей параметры, получаемые разными экспериментальными методами: 1) турбидиметрическим, 2) по подсчёту клеток при пересеве на питательную

среду, 3) по веществам-маркерам, которые высвобождаются из цитоплазмы бактериальной клетки во внешнюю среду при разрушении бактерий. Экспериментальное подтверждение выбранной модели для экспериментов с разными клетками и с разными ферментами.

- Сравнение бактериолитических характеристик лизоцима в присутствии разных эффекторов на разных бактериях - субстратах. Сравнение характера действия лизоцима с принципиально иным бактериолитическим фактором на примере интерлейкина-2.

- Исследование сорбции лизоцима на бактериальных клетках в различных условиях ферментативного лизиса клеток.

- Поиск и исследование новых ранее неизвестных бактериолитических факторов.

- Разработка методов химической модификации и иммобилизации лизоцима с целью получения пригодного для медицинского биотехнологического использования сорбента.

2.4. Научная новизна

В данной работе впервые показана возможность взаимного пересчёта данных по ферментативному лизису бактерий, получаемых с помощью пересева клеток, метода турбидиметрии и по измерению внутриклеточных маркеров. В результате теоретических расчётов были получены формулы, подтвердившиеся экспериментально, позволяющие в единых координатах сравнивать данные, полученные разными методами. В работе выработаны единые методические указания для проведения экспериментальных измерений бактериолитической активности, гарантирующие протекание лизиса бактерий в кинетическом режиме с лимитирующей скоростью

ферментативной стадией, что обеспечивает корректность интерпретации получаемых результатов.

В работе впервые получено сравнение бактериолитических свойств лизоцима по отношению к большому числу различных штаммов микроорганизмов. Впервые обнаружено, что интерлейкин-2, серотрансферрин и компонент системы комплемента C2 обладают бактериолитической активностью. Впервые обнаружено, что лизоцим может активироваться в присутствии глицина и заряженных аминокислот, при этом эффект зависит от типа субстрата – вида бактериальных клеток. Обнаружены общие закономерности в изменении активности лизоцима в присутствии различных поверхностно активных веществ.

В результате исследования химической модификации и ковалентной иммобилизации фермента были впервые созданы образцы иммобилизованного лизоцима, которые одновременно и обладают бактериолитической активностью, и совместимы с кровью, что открывает перспективы для их медицинского применения. Впервые показано, что иммобилизованный лизоцим способен эффективно сорбировать липополисахариды бактерий (эндотоксины). В результате исследования свойств иммобилизованного лизоцима впервые показано, что лизоцим способен связываться не только с бактериальными клетками, но и с иммуноглобулинами G, что говорит о наличии у лизоцима помимо ферментативной функции ещё также дополнительной физиологической роли белка-опсонина, усиливающего реакцию иммунных клеток по отношению к антигенам бактерий.

2.5. Теоретическая и практическая значимость работы

Предложенные в работе теоретические и экспериментальные подходы существенно расширяют возможности детальных исследований действия различных бактериолитических ферментов по отношению к разным видам бактерий, что имеет большую ценность как для решения фундаментальных задач изучения кинетики ферментативного лизиса бактериальных клеток, так и для практических задач совершенствования характеристик антибактериальных препаратов.

Обнаруженное в работе усиление бактериолитического действия лизоцима в присутствии миллимолярных концентраций глицина и заряженных аминокислот открывает новые возможности разработки высокоэффективных лекарственных композиций.

Обнаружение бактериолитической активности у интерлейкина-2, серотрансферрина, компонента комплемента C2 открывает новые горизонты для понимания роли этих белков в иммунитете человека, устойчивости к инфекционным заболеваниям.

Получение на основе иммобилизованного лизоцима гемосовместимого сорбента, способного эффективно удалять бактерии и бактериальные токсины (липополисахариды) из крови, открывает новые перспективы для успешного лечения сепсиса в процедурах экстракорпоральной терапии.

Неферментативные свойства лизоцима как опсонина требуют пристального изучения для более глубокого понимания его роли в работе иммунной системы, так как известно, что лизоцим эффективен не только в лечении бактериальных инфекций, но также и при лечении в ряде вирусных и онкологических заболеваний.

2.6. Методология и методы исследования

В данной работе использованы современные методы жидкостной хроматографии белков (эксклюзионная, ионообменная, аффинная хроматографии) для разделения и анализа различных бактериолитических факторов. Для идентификации белков использовались электрофоретические методы, масс-спектрометрия. Для анализа динамики ферментативного лизиса бактерий использовались данные микробиологического подсчёта бактерий, спектрофотометрический турбидиметрический метод, спектрофотометрическое определение активности внутриклеточных ферментов, которые высвобождаются при разрушении бактериальной клетки. Предложена оригинальная методика для определения термодинамических параметров сорбции бактериолитического фермента на поверхности живых бактериальных клеток. Предложены новые подходы для ковалентной иммобилизации и химической модификации лизоцима. Для количественного определения различных компонентов изучаемых систем применялись методы иммуноферментного анализа.

2.7. Положения, выносимые на защиту

1. В работе определены базовые требования к начальным условиям измерения скорости ферментативного лизиса бактериальных клеток для обеспечения протекания процесса в кинетическом режиме и, соответственно, корректности расчётов.

2. Предложенная и экспериментально подтвержденная математическая модель позволяет описывать кинетику ферментативного лизиса бактерий. Выведенные формулы позволяют рассчитать долю и

концентрацию разрушенных клеток в зависимости от изменения оптического поглощения во времени.

3. Разработанная экспериментальная схема изучения кинетики и термодинамики сорбции бактериолитических ферментов на живых бактериальных клетках позволяет различать продуктивную и непродуктивную сорбцию фермента на субстрате.

4. Интерлейкин-2, компонент системы комплемент C2, серотрансферрин обладают бактериолитической активностью.

5. Интерлейкин-2 в отличие от лизоцима имеет более узкий спектр действия, лизируя бактерии, которые имеют диаминопимелиновую кислоту в составе своей клеточной стенки.

6. Глицин и заряженные аминокислоты усиливают бактериолитическую активность лизоцима. Глутамат, аспартат, аргинин, тирамин, тирозин и милдронат усиливают бактериолитическую активность интерлейкина-2. Активирующие добавки могут быть применены для разработки высокоэффективных лекарственных композиций на основе бактериолитических ферментов.

7. Предложенная в работе математическая модель для описания влияния поверхностно активных веществ (ПАВ) на ферментативный лизис бактериальных клеток позволяет рассчитывать константы связывания ПАВ с молекулой фермента.

8. Химическая модификация по одной или двум свободным аминогруппам, экспонированным на поверхности лизоцима, может применяться для улучшения его бактериолитических свойств и также не препятствует дальнейшей ковалентной иммобилизации фермента.

9. Иммобилизованный лизоцим совместим с цельной кровью, эффективно связывает липополисахариды бактерий (эндотоксины), таким образом, может применяться в процедурах экстракорпоральной терапии при лечении.

2.8. Степень достоверности и апробация работы

Достоверность данных, представленных в работе, обеспечена использованием современных подходов и методов, использованием сертифицированного современного оборудования, корректных измерений с использованием отрицательных и положительных контролей, последующим оформлением результатов с применением современных методов статистической обработки данных.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на следующих международных конференциях: II Объединенный научный форум, включающий VI Съезд физиологов СНГ, VI Съезд биохимиков России и IX Российский симпозиум «Белки и пептиды», Дагомыс, Россия, 1-6 октября 2019; 44th FEBS Congress, Краков, Польша, 6-11 июля 2019; Девятая Международная научная конференция «Химическая термодинамика и кинетика», Тверской государственный университет, Тверь, Россия, 20-24 мая 2019; Международный форум «Ключевые тренды в композитах. Наука и технологии.», МГТУ имени Н.Э. Баумана, Россия, 5-8 декабря 2018; Международная научно-практическая конференция «Состояние и перспективы разработки, использования биологически активных соединений в научной и практической деятельности», Брест, Беларусь, 4-5 октября 2018; III Всероссийская научная конференция (с международным участием) «Актуальные проблемы теории и практики гетерогенных катализаторов и адсорбентов», Иваново, Россия, 26-30 июня 2018; Восьмая Международная научная конференция «Химическая термодинамика и кинетика», г. Тверь, Тверской Государственный Университет, Россия, 28 мая - 1 июня 2018; Международная научная конференция «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова», VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды», Москва, Россия, 18-22 сентября 2017; 42nd FEBS Congress «From molecules to cells

and back», Иерусалим, Израиль, 10-14 сентября 2017; Международная конференция «Biocatalysis-2017: Fundamentals and applications», Истра, Россия, 25-30 июня 2017; Седьмая международная научная конференция «Химическая термодинамика и кинетика», Великий Новгород, Россия, 29 мая - 2 июня 2017; IX International congress «Biotechnology: state of the art and perspectives», Москва, Россия, 20-22 февраля 2017; V Съезд физиологов СНГ, V Съезд Биохимиков России, Сочи, Россия, 4-8 октября 2016; Шестая Международная научная конференция «Химическая термодинамика и кинетика» г. Тверь, 30 мая – 3 июня 2016; International Conference «Biocatalysis 2015: Fundamentals and Applications», Московская область, Россия, 21-26 июня 2015.

2.9. Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 19 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus, 5 патентов и 29 тезисов докладов конференций, включая 3 публикации тезисов докладов в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus.

2.10. Структура и объем работы.

Диссертационная работа построена по традиционной схеме, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 195 страницах и содержит 39 рисунков, 10 таблиц, 241 ссылку.

III ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

3.1. Бактериолитические ферменты и их природные субстраты.

Бактериолитическими называются ферменты, которые гидролизуют полимеры клеточной стенки бактерий. Клеточная стенка бактерий находится снаружи от цитоплазматической мембраны и выполняет структурную роль обеспечения целостности и формы клетки [1, 2]. Разрушение клеточной стенки делает бактерию уязвимой к разрыву липидной мембраны клетки вследствие разной осмотической концентрации внешней и внутренней среды клетки [3-5]. Бактерия может продолжать существовать без клеточной стенки, но только при искусственном поддержании состава внешней среды для минимизации осмотического давления на клеточную мембрану. Бактерии, искусственно лишённые клеточной стенки, называют сферопластами или протопластами [4, 5]

3.1.1. Клеточная стенка бактерий и связанные с ней структуры

Клеточная стенка большинства бактерий состоит из пептидогликана, называемого ещё муреином. Муреин представляет собой сшитый сополимер, состоящий из олигосахаридных и пептидных участков, соединённых вместе в разветвлённую сетчатую структуру [6-10].

Полисахаридная часть сополимера представлена чередующимися остатками N-ацетилглюкозамина (NAG) и N-ацетилмурамовой кислоты (NAM), соединёнными β -(1,4)гликозидными связями. N-ацетилмурамовая кислота образует амидную связь с олигопептидным фрагментом из нескольких аминокислот. Пептидная цепь может быть также соединена с

пептидной цепью другой цепи. Чаще всего в состав олигопептидных частей муреина входят остатки L-аланина, D-глутаминовой кислоты, мезо-диаминопимелиновая кислота, L-лизин, D-аланин. Ввиду большого разнообразия бактерий в структуре их муреина иногда также встречаются остатки ряда других сахаров и аминокислот, могут быть разные варианты разветвления полимерной цепи [6, 8]. Кроме того, бактерии сосуществуют в симбиозе со всеми известными животными от червей и насекомых до теплокровных сухопутных животных и птиц и поэтому отдельные особенности структуры пептидогликана могут быть также результатом приспособления симбионта к хозяину [11, 12].

Бактерии по характеру окраски препаратов анилиновыми красителями делятся на грамположительные и грамотрицательные. Состав муреина у обоих типов бактерий в целом схожий, однако, у грамположительных бактерий он имеет сравнительно большую толщину [6-8].

С внешней стороны грамположительной бактерии помимо пептидогликана экспонированы тейхоевые кислоты. Тейхоевые кислоты являются сополимерами со звеньями из фосфатов глицерола, маннита, рибита, где углеводные части связаны через фосфодиэфирные мостики [13, 14]. Тейхоевые кислоты могут быть ковалентно связаны с N-ацетилмурамовой кислотой или концевым остатком D-аланина в тетрапептиде или же они погружены в цитоплазматическую мембрану с помощью гидрофобного фрагмента – «якоря» [13-16]. Состав внешней части тейхоевых кислот влияет на иммуногенные свойства бактерии и доступность её пептидогликана для действия бактериолитических ферментов [14, 17]

Грамотрицательные бактерии также имеют особенности, которых обычно нет у грамположительных бактерий. Они имеют дополнительную внешнюю липидную мембрану снаружи от клеточной стенки.

Пространство между цитоплазматической мембраной и внешней мембраной называется периплазмой [18, 19]. Таким образом, клеточная стенка грамотрицательной бактерии находится в периплазме и дополнительно защищена от действия бактериолитических ферментов внешней мембраной. Бактериолитические ферменты, тем не менее, действуют и на грамотрицательные бактерии. Возможность проникновения бактериолитических ферментов может объясняться их дополнительной функцией катионных белков, способных дестабилизировать липидную мембрану и увеличивать её проницаемость [20-22]. Для лизоцима животного происхождения выделяют в его структуре ту, часть, которая может служить «молекулярным пробойником» липидного слоя внешней мембраны бактерии [21]. Существуют наблюдения, что проницаемость внешней мембраны для лизоцима может меняться в зависимости от среды, в которой выращены бактерии [22]. Некоторые авторы рекомендуют применять ЭДТА (удаление стабилизирующего мембрану Ca^{2+}) и ПАВы для дополнительной дестабилизации внешней мембраны бактериальной клетки [23, 24]. Во внешней мембране грамотрицательной бактерии имеются специальные белки «порины», образующие транспортные каналы для различных веществ [25, 26], однако маловероятно, что какие-либо из этих каналов подходят для проникновения таких крупных объектов, как бактериолитические ферменты. Косвенным свидетельством того, что бактериолитические ферменты легко преодолевают внешнюю мембрану, служит то, что именно в периплазматическом пространстве была обнаружена специальная ловушка лизоцима (белковый комплекс - периплазматический ингибитор) [27-31]. Тем не менее, на сегодняшний день нельзя сказать, что в вопросах механизма проникновения бактериолитических ферментов через внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий наступила полная ясность.

В состав внешней (наружной) мембраны грамотрицательных бактерий дополнительно входят особые вещества липополисахариды (ЛПС, эндотоксины) [32, 33]. Молекулы ЛПС состоят из липида и полисахарида, структура включает три соединенных ковалентными связями блока: 1) О-антиген, 2) основной олигосахарид, 3) липид А. ЛПС защищает внешнюю мембрану, стабилизирует структуру мембраны. О-антиген – это гликановый полимер, где мономеры соединены гликозидной связью, образованной из полуацетальной и гидроксильной групп [33]. О-антиген присоединяется к основному олигосахаридному компоненту, который обычно содержит L-глицеро-D-манногептозу и 2-кето-3-деоксиоктоновую кислоту [34]. Основной олигосахаридный компонент, в свою очередь, присоединяется непосредственно к липиду А [35]. Липид А представляет собой фосфорилированный дисахарид глюкозамина, к которому через сложноэфирные и амидные связи присоединены различные жирные кислоты. Гидрофобные части жирных кислот погружены во внешнюю бактериальную мембрану. ЛПС может присутствовать в растворе как в состоянии, ассоциированном с бактериальной клеткой, так и в свободном виде, вызывая мощную иммунную реакцию у людей с заражением крови (сепсисом) [36, 37]. Экспонированный на поверхности бактериальной клетки ЛПС влияет на связывание клетками бактериолитических ферментов и эффективность их действия [38].

Следует сказать, что при всём разнообразии бактерий, всё же имеется множество сходств в организации клеточной структуры. Деление бактерий на грамположительные и грамотрицательные – это в значительной степени условность, так как, например, у грамположительных бактерий тоже обнаруживаются структуры, присущие организации периплазмы [39], подобные тому, что в явном виде наблюдается у грамотрицательных бактерий.

3.1.2. Ферменты бактерий.

Бактериолитические ферменты бактерий отличаются огромным разнообразием, они сравнительно неплохо изучены. Бактериолитические ферменты необходимы бактериям для собственных нужд, для перестройки собственной клеточной стенки при росте, при делении, при прорастании спор. Также бактериолитические ферменты бактерий могут использоваться микроорганизмами для защиты и нападения [10, 40-41].

Ввиду разнообразия целей, бактериальные ферменты представлены широким списком разновидностей, что обеспечивает умение бактерии «разбирать» клеточные стенки полностью до мономерных звеньев, а не просто до олигомерных фрагментов.

По своему характеру действия бактериолитические ферменты микробного происхождения могут быть эндогликозидазами, трансгликозидазами, амидазами, протеазами [10, 42-45]. При всём разнообразии молекулярная масса микробных бактериолитических ферментов обычно не превышает 30 кДа [43].

К эндогликозидазам микробного происхождения относятся эндо-N-ацетилмурамидазы (лизосимы), которые гидролизуют β -1,4 связи между N-ацетилмурамовой кислотой и N-ацетилглюкозамином с образованием фрагмента полимерной цепи с остатком N-ацетилмурамовой кислоты на восстанавливающем конце. Микробные эндогликозидазы также представлены эндо-N-ацетилглюкозоаминидазой, гидролизующей β -1,4 связи между N-ацетилглюкозамином и N-ацетилмурамовой кислотой с образованием фрагмента полимерной цепи с остатком N-ацетилглюкозамина на восстанавливающем конце.

Трансаминазы гидролизуют связь между N-ацетилмурамовой кислотой и N-ацетилглюкозамином, освобождая фрагмент цепи полимера с N-ацетилмурамовой кислотой на восстанавливающем конце с

последующим переносом O-мурамоильной связи мурамовой кислоты на шестой углеродный атом с образованием (1-6) ангидромурамовой кислоты.

N-ацетилмурамил-L-аланин амидаза гидролизует амидную связь между лактильной группой N-ацетилмурамовой кислоты и α -аминогруппой остатка L-аланина или остатка другой аминокислоты в этом положении.

Различные эндопептидазы бактерий гидролизуют связи между остатками аминокислот в пептидных фрагментах пептидогликана.

С использованием комплекса бактериолитических ферментов микробного происхождения был разработан препарат лизоамидаза, включающий в себя гликозидазную (лизоцим), амидазную (гидролиз связи одигасахаридов с пептидом) и эндопротеазную активности [43]. В состав препарата был также введён олигосахаридный компонент, похожий по структуре на фрагмент муреина, который с одной стороны обеспечивал хранение ферментного препарата как консервант без потери активности и, с другой стороны, являлся иммуностимулирующей добавкой при медицинском или ветеринарном применении. Молекулярная масса всего комплекса составила 1300 кДа [43].

Ввиду наличия самых разнообразных типов специфичности у бактериальных бактериолитических ферментов, на их основе предлагаются препараты медицинского назначения, которые могут быть крайне эффективными по отношению к самым разным патогенным микроорганизмам [41, 43]. Однако, у подобных медицинских препаратов могут быть и некоторые ограничения при практическом применении ввиду иммуногенности бактериальных белков.

3.1.3. Ферменты бактериофагов.

Бактериолитические ферменты бактериофагов в настоящее время активно изучаются. С помощью бактериолитических ферментов бактериофаг проникает в бактериальную клетку, а также бактериолитические ферменты используются фагом для высвобождения из заражённой бактериальной клетки новых синтезированных частиц вируса. Ферменты бактериофагов называют экзолизинами (ферменты для проникновения фага в клетку) и эндолизинами (ферменты для выхода из клетки вирусных частиц) [46-52]. Общее название эндолизинов и экзолизинов – это «лизины», что в русскоязычной литературе может вызывать путаницу из-за одинакового написания названия с одной из аминокислот.

Ферменты бактериофагов имеют свои уникальные особенности. Как правило, лизин или фермент фага имеет в составе отдельно каталитическую и пептидогликан связывающую части со сложной уникальной доменной структурой. Обычно каталитический блок молекулы фермента находится с N-конца пептидной цепи, а пептидогликан связывающий блок – с C-конца [48, 49]. Пептидогликан связывающий блок обеспечивает высокую субстратную специфичность, выражающуюся в высокой избирательной активности на тех или иных субстратах - бактериальных клетках. Каталитические центры ферментов по типу разрушаемых в пептидогликане связей могут быть представлены гидролазами полисахаридной цепи (эндо- β -N-ацетилглюкозаминидазой и N-ацетилмурамидазой (лизоцимом)), или гидролазами пептидных мостиков (эндопептидазами), или гидролазами амидных связей между олигосахаридом и пептидом (N-ацетилмурамил-L-аланиламидазой) [48-51]. По сложности организации фаговые ферменты различны, могут состоять из простого сочетания каталитического и субстрат связывающего блока,

имея молекулярную массу 20-40 кДа. Существуют также примеры очень сложных лизинов, состоящих из нескольких субъединиц. Например, PlyC (The streptococcal C1 bacteriophage lysin) с молекулярной массой 114 кДа имеет в своём составе каталитический блок PlyCA с молекулярной массой 50 кДа с двумя обнаруженными у него активными центрами (глиозидазы и амидазы) и ещё восемь отдельных субстрат связывающих субъединиц PlyCB с молекулярными массами по 8 кДа каждая [50, 52]. PlyC на сегодняшний день считается самым мощным и эффективным из фаговых лизинов, пригодных для медицинского применения и для обеззараживания материалов после воздействия компонентов бактериологического оружия [48, 49].

Фаговые ферменты часто рассматривают в качестве хорошей альтернативы антибиотикам в борьбе с опасными инфекциями, в первую очередь с грамположительными стрептококками и стафилококками, особенно в случае антибиотикрезистентности [48-51]. Исследователей привлекает высокая специфичность подобных ферментов, из которой можно предположить сравнительную безопасность для непатогенной симбиотической флоры, хотя теоретически система «узнавания» самого фага должна быть более избирательна ввиду наличия дополнительных рецепторов [48, 53]. Тем не менее, действительно имеет место феноменальная избирательность действия фаговых ферментов [49]. Исключительная избирательность действия на определённые штаммы бактерий отмечалась также до открытия бактериолитических ферментов фагов, когда исследовали антибактериальную активность вытяжек из лизированных бактерий без фаговых частиц [53]. Можно было бы ожидать, что фаговые ферменты как чужеродные белки будут давать дополнительную иммунную реакцию при лечении животных, тем не менее, этого практически не наблюдается [49, 52], реакция на фаговые ферменты

со стороны иммунной системы животного незначительна в сравнении с реакцией на бактерии и их фрагменты.

3.1.4. Ферменты грибов.

Грибы как одноклеточные, так и многоклеточные, несомненно, обладают огромным потенциалом выработки для собственных нужд самых разнообразных ферментов, которые могут быть крайне полезны для биотехнологии и медицины. На сегодняшний день есть отдельные примеры выделения из грибов бактериолитических ферментов, продукция которых в значительной степени зависит от условий выращивания [54, 55]. Однако в целом грибные бактериолитические ферменты на сегодняшний день являются исторически мало исследованными и, вероятно, ждут новых открытий.

3.1.5. Ферменты растений.

Высшие растения эволюционно развили собственную систему иммунитета, которая не похожа на защитные системы других представителей живой природы. В настоящее время в работе и регуляции иммунитета растений остаётся очень много неизвестных моментов, которые крайне важны для понимания устойчивости растений к внешним факторам и требуют изучения [56, 57]. Исследования показывают, что при заболевании растение начинает вырабатывать множество новых белков, которые отсутствуют у здорового растительного организма, в частности, есть термин PR-белки (pathogenesis-related proteins), которые обладают разнообразными функциями, и часть из них обладает лизоцимной и

протеазной активностью [57]. Есть отдельные примеры выделения и получения очищенных бактериолитических ферментов с молекулярными массами 14 и 20 кДа из растений [58, 59]. Однако в целом можно сказать, что область исследований бактериолитических ферментов растений мало разработана, вероятно, ввиду методических особенностей и сложностей работы с растительным биоматериалом при выделении белков, что является общей проблемой в современной биохимии, вследствие чего общее количество публикаций о ферментах животных и бактерий существенно многократно превышает количество публикаций о ферментах растений.

3.1.6. Ферменты животных.

Бактериолитические ферменты животных представлены в основном мурамидазами – лизоцимами [60-67]. Это белки с массой 14-15 кДа иногда до 18 кДа. Лизоцимы различных животных (включая беспозвоночных и амёб) имеют множество сходных черт и похожих участков в первичной структуре. По наибольшим сходствам в первичной структуре «эволюционно родственные» лизоцимы условно делят на наиболее распространённый куриный (С-тип), гусиный (G-тип), беспозвоночный (I-тип), амёбный тип (E-тип), амёбный слизевиков (Aly-тип) и вирусный (V-тип, тип лизоцима фермент фага T4, схожий с животными лизоцимами). В организме животных одного вида, как правило, присутствуют несколько форм лизоцима. Названия лизоцимов по видам животных носят несколько условный характер, связанный с историей открытия тех или иных типов фермента и преимущественным содержанием тех или иных форм в организме. Различные типы «животных» лизоцимов и лизоцима бактериофага T4L имеют большие совпадения в своей первичной

структуре. Так лизоцим куриного типа совпадает приблизительно на 70% по первичной последовательности с лизоцимом гусиного типа и более чем на 50% с лизоцимом бактериофага. Гусиный тип лизоцима в свою очередь имеет почти 70% совпадения с лизоцимом бактериофага [63]. В лизоцимах также обнаруживается сходство до 30-40 % с лактоальбуминами, что вероятно является результатом наличия общих предшественников при эволюции этих белков [65]. Лизоцимы являются частью врождённого иммунитета животных, они присутствуют в различных биологических жидкостях, участвуют в разрушении бактерий в процессе фагоцитоза при клеточном иммунном ответе.

3.2 Ферментативные и неферментативные свойства лизоцима

3.2.1. Лизоцим как фермент. Особенности измерения активности фермента на живых целых бактериальных клетках. Турбидиметрия в измерении количества бактериальных клеток и скорости их лизиса. Сорбция фермента на субстрате.

Как уже было сказано в предыдущей главе, значительная часть бактериолитических ферментов животных представлена близкими по структуре так называемыми лизоцимами С-типа (chicken-type). У человека лизоцим С-типа также широко представлен в организме [67, 68]. Поэтому доступный для исследований куриный яичный лизоцим (также лизоцим С-типа) является очень удачным выбором стандартного и доступного модельного фермента во многих исследованиях, и исторически он стал первым открытым бактериолитическим ферментом. Ещё в 1909 году Лащенко опубликовал работу о присутствии в яичном белке и в молоке «протеазы» с антибактериальными свойствами [69]. Системное

лавинообразное изучение данного фермента началось после «повторного» открытия в 1922 году Флемингом, который, собственно, и ввёл в оборот название «лизозим» [70]. По сути, после работ Флеминга лизоцим стал одним из самых изучаемых ферментов. Позднее, благодаря работам Филлипса с коллегами, лизоцим стал первым в истории биохимии ферментом с полностью расшифрованной с помощью рентгеноструктурного анализа трёхмерной структурой [71, 72].

Куриный яичный лизоцим представляет собой односубъединичный белок с молекулярной массой 14,3 кДа, имеющий в своём составе одну полипептидную цепь длиной в 129 аминокислотных остатка. Изоэлектрическая точка лизоцима составляет 10,5. В структуре имеются два домена, на границе которых формируется субстрат связывающая щель и активный центр. В целом в структуре лизоцима имеются 5 β -складок, 4 дисульфидных мостика, 5 α -спиралей [73-76]. Лизоцим, как уже было сказано, гидролизует β -1,4 гликозидные связи между N-ацетилмурамовой кислотой и N-ацетилглюкозамином в полимере клеточной стенки бактерии. В активном центре лизоцима выделяют 6 подцентров связывания для взаимодействия с полимером субстрата. В каталитическом акте гидролиза связи участвуют остатки Asp52 и Glu35. Несмотря на очень долгую историю изучения фермента, на сегодняшний день мировое научное сообщество не пришло к единому мнению по точному механизму катализа этим ферментом, расходясь в отдельных деталях [77-82].

При описании кинетики лизиса бактерий в качестве скорости ферментативного процесса можно пользоваться величиной падения оптического поглощения суспензии во времени « v' », что было показано в сравнительно простых случаях, например, при использовании в качестве субстрата клеток *Micrococcus luteus* (или *Micrococcus lysodeikticus*, что является синонимом) [83, 84]. При этом суспензия клеток без добавления лизоцима имеет практически постоянное во времени оптическое

поглощение неоседающей взвеси частиц. При приготовлении такого субстрата, при суспендировании в водном растворе лиофилизированных клеток *Micrococcus luteus* вплоть до их «концентрации» 0,15 мг в мл наблюдается пропорциональность между концентрацией клеток и оптическим поглощением суспензии [83, 84]. После добавления фермента скорость v' линейно зависит от концентрации фермента, а её зависимость от концентрации субстрата хорошо описывается уравнением Михаэлиса-Ментен. Полученные таким образом значения величин кажущихся $k_{\text{кат}}$ и K_m можно использовать для дальнейшей интерпретации данных.

Для понимания особенностей действия бактериолитических ферментов на целых живых бактериальных клетках необходимо измерение бактериолитической активности лизоцима и других бактериолитических ферментов не на синтетических субстратах [85-87], а на субстратах реальных, на целых живых бактериальных клетках, что чаще всего осуществляется аналогично упомянутому ранее примеру с *Micrococcus luteus* с помощью турбидиметрии, по падению оптического поглощения суспензии разрушающихся бактерий [88-90]. Несмотря на длительную историю исследований, интерпретация широко применяемых данных турбидиметрических измерений, по сути, ограничилась лишь такими математическими моделями, которые дают подходящую аппроксимацию кинетики, но без возможности простой практической интерпретации физического смысла измеряемых величин [91]. Имеют место также и нерешённые методические аспекты при выборе условий эксперимента для корректного измерения, так как, например, для многих бактерий в изотоническом растворе действие фермента турбидиметрически не регистрируется, а клетки с повреждённой клеточной стенкой остаются не только целыми, но и жизнеспособными [92-93]. Есть примеры изучения скорости ферментативного лизиса бактерий с помощью прямого метода подсчёта количества живых клеток при микробиологическом пересеве,

однако данный подход не только трудоёмкий, но имеет низкую точность и непригоден для экспрессной регистрации кинетики в режиме реального времени [94-96].

Как уже было сказано, турбидиметрия является методически наиболее удобным методом измерения скорости ферментативного лизиса бактерий [88-91]. Турбидиметрия также является удобным методом контроля концентрации бактерий в суспензии при их росте [97-102], несмотря на то, что для разных бактерий одной и той же концентрации клеток соответствует разное оптическое поглощение ввиду различного размера и формы частиц (бактерий), а также факта нелинейности зависимости оптического поглощения от концентрации. Взаимосвязь между оптическим поглощением частиц в суспензии (не обязательно бактерий), их распределением по размерам и их концентрацией носит сложный характер [103-106]. В литературе отсутствует систематизация данных по остаточному оптическому поглощению разрушенных бактериальных клеток. Обобщение информации по изменению оптического поглощения при лизисе клеток разных бактерий в плане корректного измерения бактериолитической активности является одной из задач в данной работе.

Как уже было сказано, природный субстрат лизоцима является полимером, поэтому также важен вопрос изучения сорбции фермента на субстрате, которая может быть «продуктивной», предшествовать катализу или быть «непродуктивной», препятствовать катализу [83, 84]. Более того, в последние десятилетия были открыты специальные белковые структуры некоторых бактерий, которые целенаправленно сорбируют лизоцим, блокируя его действие и обеспечивая резистентность к нему [107-110]. Тем не менее, до настоящего исследования не было работ по изучению параметров сорбции лизоцима непосредственно на реальных живых

бактериальных клетках, хотя имеется много работ по сорбции лизоцима на других материалах, например, на цеолитах и наноалмазах [111-113]

3.2.2. Антимикробная, противогрибковая, противовирусная, противораковая, иммуномодулирующая активность лизоцима.

Антимикробная активность лизоцима была проверена на различных наиболее распространенных грамположительных и грамотрицательных бактериях, включая устойчивые к антибиотикам штаммы [114-117]. Лизоцим эффективен как сам по себе, так и в составе композиций с другими веществами, например, хитозаном. Отмечается также, что даже денатурированный лизоцим без каталитической активности также проявляет антибактериальное действие по отношению к ряду бактерий, так как способен дестабилизировать и повреждать бактериальную мембрану как положительно заряженный катионный белок. Животные, имеющие генетические проблемы, приводящие к сниженной секреции лизоцима, существенно более подвержены действию патогенных микроорганизмов, особенно грамположительных инфекций дыхательных путей, в частности стрептококков и стафилококков. В целом следует отметить, что в работах разных авторов эффективность лизоцима показана в очень отличающихся условиях и с совершенно разными количествами лизоцима, поэтому количественное сравнение эффективности действия лизоцима на разные бактерии в целом затруднительно.

В настоящее время происходит активное переосмысление возможных физиологических функций лизоцима как белка, имеющего не только антибактериальное действие, но также эффективного в лечении грибковых, вирусных инфекций, рака [68, 118-127]. Если изначально считалось, что при терапии грибковых инфекций лизоцим эффективен

виду наличия хитиназной активности и как катионный белок, то сейчас всё большее внимание смещается на роль лизоцима как иммуномодулятора, влияющего на множество процессов в организме. Одна из гипотез, объясняющая влияние лизоцима на иммунные процессы организма, опирается на то, что образующиеся в результате действия лизоцима фрагменты муреина симбиотической или же патогенной флоры активируют дополнительные иммунные реакции. Однако, судя по всему, ситуация более сложная и более интересная. Например, способность лизоцима тормозить пролиферацию раковых клеток и замедлять репликацию вируса в заражённых клетках вряд ли связана с его антибактериальной каталитической активностью. Получены данные, что потенциально лизоцим не только может внедряться в самые разные клетки, но и способен связываться с нуклеиновыми кислотами, влияя на биосинтез белков. В последние годы также было обнаружено, что лизоцим в присутствии билирубина способен препятствовать связыванию ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) с моноклональными антителами к АПФ, что было объяснено гипотезой о связывании АПФ с лизоцимом [128]. На наш взгляд, также нельзя исключать и того, что лизоцим связывается не с АПФ, а с самими иммуноглобулинами (антителами). Кроме того, есть сведения, что лизоцим усиливает реакцию иммунных клеток на клетки патогена, действуя подобно опсонину, что происходит по непонятному механизму и гипотетически может объясняться тем, что лизоцим может сорбироваться на отрицательно заряженной поверхности патогена с изменением поверхностного распределения заряда [129]. Современные наблюдения за физиологическим действием лизоцима накопили множество сложно объяснимых фактов, которые лежат далеко за гранью его каталитических антибактериальных свойств. Так, с одной стороны, увеличение концентрации лизоцима в крови увеличивает уровни провоспалительных

цитокинов, например, ФНО- α (фактора некроза опухоли) и интерлейкинов -6 и -1 β , но при этом более высокая концентрация лизоцима увеличивает и уровень противовоспалительного интерлейкина-10 [68].

3.2.3. Интерлейкин-2.

Интерлейкин-2 относится к цитокинам. Цитокины – это разновидность белков, которые используются для передачи сигналов между иммунными и неиммунными клетками в организме. Если цитокин производится иммунными клетками и его сигнал принимают также иммунные клетки, имеющие соответствующий рецептор, то такой цитокин называют «интерлейкином». При этом терминологически допускается, что некоторые интерлейкины могут синтезироваться или связываться также и какими-либо неиммунными клетками. Нумерация интерлейкинов условная, обычно связана с порядком их научного открытия.

Интерлейкин-2 или как его ещё называют «фактор роста Т-клеток» представляет собой белок с молекулярной массой 15,4 кДа, состоящий из одной полипептидной цепи [130-138]. Молекула интерлейкина-2 имеет дисульфидный мостик (Cys58/Cys105), наличие которого принципиально важно для обеспечения физиологической активности интерлейкина-2 (функции цитокина). Также имеется свободная сульфгидрильная группа Cys125. Молекула интерлейкина-2 имеет 1 участок гликозилирования. В организме могут присутствовать гликозилированные формы с молекулярными массами 17-22 кДа. Считается, что гликозилирование не оказывает существенного влияния на физиологическую активность интерлейкина-2 (функции цитокина), а необходимо только для увеличения стабильности данного белка в кровотоке, предотвращая его протеолиз.

Интерлейкин-2 производится только клетками Т-лимфоцитов. Данный цитокин как фактор роста и дифференциации воздействует на Т и В-лимфоциты, моноциты, НК-клетки (натуральные киллеры). У моноцитов в присутствии интерлейкина-2 усиливается генерация активных форм кислорода, которая необходима при фагоцитозе для убийства проглоченных фагоцитом клеток патогена, который далее будет переварен, в том числе и с применением лизоцима. Также в присутствии интерлейкина-2 у моноцитов усиливается их противоопухолевая активность. Под действием интерлейкина-2 у В-лимфоцитов усиливается биосинтез иммуноглобулинов классов М, G и А. На тканевом уровне интерлейкин-2 способствует репарации и регенерации.

Различные формы интерлейкина-2, в том числе рекомбинантные белки, широко используются в медицине в терапии различных заболеваний [134-138]. Интерлейкин-2 применяют в комплексе с другими препаратами при тяжёлых заболеваниях, осложнённых патогенными микроорганизмами, например, при сепсисе и гнойно-септических осложнениях в хирургии. Также интерлейкин-2 применяют при лечении туберкулёза и рецидивирующей хламидийной инфекции. Данный цитокин применяется при лечении микозов и различных вирусных заболеваний, в первую очередь гепатита и герпеса. Очень много примеров успешного применения интерлейкина-2 при лечении различных иммунодефицитов, в том числе СПИДа. Интерлейкин-2 применяется при лечении различных форм рака.

3.4. Система комплемента и фактор С2.

Система комплемента [139-152] – это сложный комплекс белков, особый инструмент иммунной системы, который используется для

уничтожения патогенных бактерий, функционируя как автономно, так и с привлечением для своего участия других факторов клеточного и гуморального иммунитета. Комплемент – это комплекс белков, который способен сам разрушать бактериальные клетки или привлекать для этого иммунные клетки. До сборки в единый комплекс в крови присутствуют его «неактивированные» компоненты. Часть компонентов системы комплемент при активации подвергается протеолизу, и некоторые группы белков комплемента образуют комплексы с ферментативной активностью для активации следующих компонентов. По сценарию действия комплемента выделяют «классический», «альтернативный» и «лектиновый» пути.

«Классический» путь начинается с того, что при наличии связанных с поверхностью бактерии иммуноглобулинов класса G и M (IgG и IgM), к ним присоединяется скачала гликопротеин с массой 410-460 кДа гексамер C1q (в случае присоединения к IgG, молекула C1q присоединяет по Fc участкам сразу две молекулы IgG), затем к нему присоединяются C1r (80 кДа) и C1s (77 кДа) компоненты. C1r является протеазой; при присоединении к гексамеру C1q гетеродимера C1r·C1s происходит активация протеазы C1s. Всего к C1q присоединяются два гетеродимера C1r·C1s, образуя активированный комплекс C1 (протеазу), которая активирует молекулу C4 (гетероолигомер из трёх субъединиц, 95 кДа, 78 кДа и 31 кДа), расщепляя её на два фрагмента C4a и C4b. C4a отщепляется и является кинином (относительно небольшой регуляторный пептид, около 8,7 кДа), привлекающим и активирующим нейтрофилы и макрофаги. C4b присоединяется к C1, образуя комплекс C1·C4b (протеазу), которая активирует (расщепляет) C2 (~100 кДа) на фрагменты C2a с молекулярной массой около 75 кДа и C2b с молекулярной массой около 35 кДа. В литературе нередко бывает путаница обозначений C2a и C2b. Фрагмент C2a отщепляется, а C2b входит в состав комплекса комплемента. C2b

является сериновой протеазой. Комплекс C4b·C2b (протеаза) является C3-конвертазой и соответственно активирует C3 (185 кДа), расщепляя его на C3a и C3b. C3a – кинин (около 9,1 кДа), медиатор воспаления, вызывает дегрануляцию тучных клеток. Образовавшийся комплекс C4b·C2b·C3b является C5 конвертазой и далее аналогично расщепляет C5 (196 кДа) на C5a и C5b. C5a – медиатор воспаления, привлекает нейтрофилов и вызывает дегрануляцию тучных клеток. Образуется комплекс C1·C4b·C2b·C3b·C5b, который далее без дополнительного протеолиза присоединяет белковые факторы C6, C7, C8 и C9, образуя «мембрано-атакующий комплекс» (МАК). Комплексы МАК взаимодействует с клеточной мембраной бактерии и погружается в неё, образуя поры, что в итоге приводит к деструкции клетки. Считается, что МАК наиболее эффективен в отношении грамотрицательных бактерий. В случае дефектов образования МАК-комплекса пациенты могут иметь повышенную уязвимость для грамотрицательных патогенных бактерий. При классическом пути формирования комплекса белков комплемента также возможен вариант, когда уже на стадии присоединения C3b на бактерию реагирует нейтрофил, уничтожая патогенную клетку. У нейтрофилов есть рецептор, распознающий C3b.

«Альтернативный» путь активации комплемента не требует наличия антител. В крови в норме присутствует некоторое количество расщеплённого C3. Фрагмент C3b способен связываться с липополисахаридом (эндотоксином) на поверхности грамотрицательных бактерий, становясь конвертазой фактора В (93 кДа). Фактор В расщепляется на Va (30 кДа) и Vb (63 кДа). Va предположительно является кинином. Комплекс C3b·Vb является C3-конвертазой. После расщепления C3 на поверхности бактериальной клетки образуется комплекс C3b·Vb·C3b и отщепляется C3a. C3b·Vb·C3b является C5 конвертазой.

Далее события развиваются по таким же этапам, как в «классическом» пути с образованием МАК, разрушающим бактериальную клетку.

«Лектиновый» путь предполагает, что на первой стадии с поверхностью бактериальной клетки связывается лектин. Лектины – это белки или часто гликопротеины с молекулярной массой 25 - 30 кДа, способные высокоаффинно связываться с остатками сахаров в составе олигосахарида. В частности, в крови человека есть лектин, который хорошо связывается с полисахаридами, имеющими остатки маннозы в своём составе, которые присутствуют на поверхности ряда бактерий. Лектин связывающий маннозу (ЛСМ) далее взаимодействует с комплексом C1r·C1s. Последующие этапы аналогичны «классическому» пути. В случае неправильно регулируемого избыточно активно протекающего лектинового пути активации комплемента возможны патологии у пациента, связанные с постоянной деструкцией части эритроцитов (гемолизом). На эритроцитах большинства людей (кроме группы крови 0) имеются олигосахариды – антигены системы АВ0. В олигосахаридах эритроцитов нет маннозы, однако при патологических состояниях ЛСМ также может с ними связываться с малой аффинностью.

Таким образом, компонент системы комплемент C2 участвует только в «классическом» пути активации комплемента. Система комплемента достаточно сложная и является предметом продолжающихся внимательных исследований.

3.5. Серотрансферрин.

Серотрансферрин – это относительно крупный односубъединичный белок с молекулярной массой 76 кДа, имеющий одну полипептидную цепь [153-160]. В молекуле имеется 38 остатков цистеина, соединённых в 19

дисульфидных мостиков. Серотрансферрин входит в семейство близких по структуре белков трансферринов, которым приписывают в первую очередь транспортную функцию, т. е. перенос ионов железа. К трансферринам также относятся: лактоферрин или лактоферрин (трансферрин молока), овотрансферрин (один из яичных белков), мембранно-связанный меланотрансферрин и множество других родственных белков. Серотрансферрин имеет два центра связывания Fe^{3+} . Также известно, что серотрансферрин способен связывать Cr^{3+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} . Уровень серотрансферрина в крови и других биологических жидкостях организма меняется в различных физиологических состояниях, например, при беременности. Его концентрация зависит от режима работы иммунной системы, может служить диагностическим признаком при некоторых заболеваниях, например, при сепсисе или онкологии.

Давно известно, что серотрансферрин, как и другие трансферрины, имеет свойства противомикробного и противогрибкового препарата. Чаще всего антимикробные свойства серотрансферрина объясняют его способностью создавать дефицит железа в среде, подавляя рост патогенных клеток. Однако также показано, что трансферрины могут повреждать внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий; также трансферрины могут ингибировать работу H^+ АТФаз бактерий, которые являются мембранными протонными насосами. Поэтому можно сказать, что сейчас остаётся много неясного в механизмах возможного действия трансферринов на патогенные клетки.

3.6. Химическая модификация лизоцима, усиливающая эффективность действия фермента

На сегодняшний день лизоцим – это самый изученный и самый коммерчески доступный из бактериолитических ферментов. В последние годы различными авторами было предпринято много попыток химически модифицировать лизоцим с целью улучшения его антимикробных свойств. Имеется хороший пример химической модификации лизоцима с помощью циннамаля (коричного альдегида), когда со свободными вторичными аминогруппами на поверхности белка образуется основание Шиффа, которое затем можно легко восстановить цианборгидридом или боргидридом натрия с получением стабильной ковалентной связи [161]. Было показано, что при подобной модификации существенно повышается активность лизоцима по отношению к энтеробактериям и стафилококкам [161]. Однако, на наш взгляд, в данной методике имеется несколько проблемных моментов, например, низкая водорастворимость коричневого альдегида (~ 1 г на л) и отсутствие контроля за восстановлением в процессе обработки боргидридом натрия алифатической двойной связи коричневого альдегида. Несколько схожий вариант химической модификации лизоцима возможен с использованием кофейной и коричной кислот [162], в котором в отличие от предыдущего примера не образуется вторичного амина в месте присоединения к остатку лизина, а используется активация карбодиимидом с образованием амидной связи. Лизоцим, модифицированный коричной и кофейной кислотой, в целом схож в свойствах с лизоцимом, модифицированным коричневым альдегидом, за исключением того, что последний выигрывает по эффективности лизиса клеток стафилококков [163]. Нужно также отметить важный момент, что коричный альдегид, который успешно используется в кулинарии, косметологии и медицине, сам по себе проявляет бактерицидные свойства

[164]. Бактерицидность коричневого альдегида может быть связана с его способностью нековалентно связываться с поверхностью бактериальной клетки. По аналогии с коричневым альдегидом для модификации лизоцима также может применяться перилловый альдегид [165-167], содержащийся в однолетнем растении перилла семейства яснотковые. В целом результаты модификации лизоцима перилловым альдегидом схожи с вариантом модификации коричневым альдегидом. Модифицированный таким способом лизоцим имеет улучшенную эффективность действия по отношению к энтеробактериям и стафилококкам. С точки зрения химии особенностью конъюгации аминогрупп лизоцима с перилловым альдегидом является возможность использования реакции Майяра с перегруппировкой Амадори [167] (сахароаминной конденсации) в отличие от восстановления основания Шиффа боргидридом в случае коричневого альдегида. Впрочем, следует также отметить, что использование реакции Майяра с последующими молекулярными перегруппировками может приводить к побочным продуктам с неустановленной структурой. Кроме того, скорость реакции Майяра и спектр её продуктов очень зависят от температуры. Также нужно отметить, что и для вариантов модификации перилловым альдегидом, и для вариантов модификации коричневым альдегидом очень важно число модифицированных аминогрупп лизоцима, что драматически влияет на конечные свойства. Для улучшения связывания лизоцима с клетками бактерий и увеличения эффективности действия в отношении грамотрицательных бактерий может также применяться липофилизация лизоцима за счёт присоединения пальмитиновой кислоты [166]. В более поздних работах было предложено присоединение более коротких в сравнении с пальмитиновой кислотой насыщенных жирных кислот [168]. Лизоцим, липофилизированный присоединением коротких насыщенных жирных кислот, несмотря на увеличенную эффективность действия, имеет ограниченную

операционную стабильность. Проблему ограниченной операционной стабильности частично решает одновременная липофилизация с гликозилированием [169]. Липофилизированный и липофилизированно-гликозилированный лизоцим обладают повышенной активностью в отношении энтеробактерий. Ещё один пример модификации лизоцима – это использование реакции Маяра для получения конъюгата лизоцима со сложным эфиром глюкозы и стеариновой кислоты [170]. Несмотря на то, что такая модификация аминогрупп боковых радикалов лизина приводит к снижению активности почти в два раза, тем не менее, получается термостабильный лизоцим, пригодный для длительного хранения и использования в эмульсиях. Для данного варианта модифицированного лизоцима наблюдается заметное снижение изоэлектрической точки (до значений 6-7) по сравнению с нативным лизоцимом. Однако снова нужно отметить, что использование реакции Маяра может приводить к побочным продуктам с неустановленной структурой. Существует вариант модификации лизоцима глюкозамином за счёт присоединения с помощью активации карбодиимидом к карбоксильным группам белка с последующим образованием амида [171]. Лизоцим, модифицированный с помощью глюкозамина, обладает улучшенной стабильностью при различных значениях pH и температурах. На наш взгляд, данный метод требует особой осторожности в выборе условий модификации, так как можно затронуть карбоксильные группы активного центра. Суммируя рассмотрение вышеперечисленных методов химической модификации лизоцима для улучшения его антибактериальных свойств, наиболее простыми и эффективными вариантами видятся способы с применением ароматических альдегидов.

3.7. Методы иммобилизации и свойства иммобилизованного лизоцима.

Получение различных препаратов иммобилизованного лизоцима и, в частности, ковалентно иммобилизованного очень важно для задач медицинского и биотехнологического применения фермента. Отдельной исключительно сложной методической задачей является исследование бактериолитических свойств иммобилизованного лизоцима. Помимо всего вышесказанного о методических проблемах измерения активности растворимого лизоцима, теперь ещё добавляется фактор иммобилизации фермента на нерастворимой полимерной матрице, что может приводить к дополнительным стерическим и диффузионным искажениям, усложнениям интерпретации данных эксперимента. Среди описанных на сегодняшний день вариантов иммобилизации лизоцима – это нековалентное включение фермента в криогель поливинилового спирта на стадии изготовления геля [172]. Включённый в криогель лизоцим сохраняет свою активность и проявляет стабильность свойств при хранении. У включённого в криогель лизоцима наблюдается расширение рН-профиля активности в сравнении с растворимым ферментом. С точки зрения биотехнологического и медицинского применения широкий рН-профиль бактериолитической активности имеет преимущества. Было показано, что лизоцим, включённый в криогель, оказывает литическое действие на *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Впрочем, активное действие такого препарата фермента может отчасти обуславливаться процессом постепенной утечки лизоцима из геля, что накладывает ограничения на области практического применения данного материала. Описан вариант включения лизоцима в силикагель, в поры наночастиц [173]. Показано, что при таком способе иммобилизации увеличивалась активность лизоцима на синтетическом низкомолекулярном субстрате и улучшалась стабильность фермента при

хранении. Однако на реальных клетках бактерий активность такого препарата не проверялась. Опять же следует отметить, что помимо этого для данного препарата также возможна утечка лизоцима. В литературе описан вариант нековалентной иммобилизации (сорбции) лизоцима на хитине. Бактериолитическая активность сорбированного на хитине лизоцима по отношению к *Micrococcus luteus* была в 1.5 раз выше в сравнении с лизоцимом в растворе [174]. Описаны также примеры лизоцима, нековалентно (сорбция) и ковалентно иммобилизованного на хитозане [175]. Ковалентная иммобилизация на хитозане осуществлялась путём случайной перешивки лизоцима и хитозана глутаровым альдегидом с последующей простой отмывкой препарата от избытка сшивающего агента. На наш взгляд такой способ иммобилизации имеет существенный недостаток ввиду не полной ясности в плане структур сшивок между хитозаном и лизоцимом и неопределённой стабильности продуктов. Нековалентно и ковалентно иммобилизованный на хитозане лизоцим показал активность на клетках *S. aureus* и *E. coli*. В литературе описан также метод ковалентной иммобилизации лизоцима, ковалентно на полистироле [176]. Этот метод аналогичен твердофазному синтезу олигопептидов. Сначала на хлорметил-полистирол прививают ϵ -аминокапроновую кислоту с третбутилоксикарбонильной защитой. После этого затем с получением бромацетил производного из аминогруппы присоединяют единственный гистидин лизоцима (His-15). Иммобилизованный на полистироле лизоцим показывает хорошую стабильность и проявляет при действии на клетки *M. luteus* около 15% активности от растворимого лизоцима. Уменьшение активности после иммобилизации авторы связывают со стерическими ограничениями для контакта иммобилизованного фермента с клетками. Несмотря на явную привлекательность точной структуры молекулярного соединения фермента с матрицей, сложность методики синтеза такого

иммобилизованного препарата явно станет ограничением для практического применения.

Мы предполагаем, что области применения иммобилизованного лизоцима можно расширить до способов очистки плазмы крови человека и цельной крови человека. Как мы видели в разделе о свойствах лизоцима, фермент не только способен гидролизовать полимер клеточной стенки бактерий, но также способен связываться с молекулярными структурами на поверхности бактериальных клеток. Таким образом, для иммобилизованного лизоцима возможно применение его как в плане антибактериального фермента, так и в плане сорбента для связывания компонентов бактериальных клеток или даже самих целых бактерий. Практически во всех рассмотренных выше примерах нековалентной иммобилизации за каталитическое действие фермента, по сути, отвечает свободный лизоцим, который высвобождается в результате утечки. Очевидно, что утечка свободного фермента из препарата иммобилизованного лизоцима делает его непригодным для целей очистки плазмы крови и цельной крови. Необходим лизоцим, который иммобилизован ковалентно с получением химически стабильных связей с гарантией отсутствия утечки из препарата. Из методов, которые одновременно дают контролируемую структуру продукта и в то же время могут быть относительно просты и дешёвы в плане технологического масштабирования, нам видятся наиболее привлекательными варианты с модификацией лизоцима ароматическими альдегидами. Но в качестве модификатора кроме коричневого альдегида мы попробуем взять также другие, более растворимые в воде ароматические альдегиды, чтобы минимизировать технологические трудности.

IV. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

4.1. Материалы и основное оборудование.

Реагенты, которые использовались в работе: тирамин, триптамин, таурин (Acros Organics, США), трис(гидроксиметил)аминометан (Трис), 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота (MES) (Amresco, США); бацитрацин (MP Biomedicals, Германия); овальбумин и миоглобин из сердца лошади (MP Biomedicals, США); милдронат (Cridex, Латвия); L-глутамат натрия (Hong Mei 红梅, КНР); бульон Хоттингера и панкреатический гидролизат рыбной муки (ГРМ) (Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии (ГНЦ ПМБ, Россия); NaOH, NaHCO₃, Na₂CO₃, KOH, KH₂PO₄, K₂HPO₄, H₃BO₃, HCl, (NH₄)₂SO₄, дрожжевой экстракт, N, N, N', N'-Тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД), персульфат аммония (Хеликон, Россия); лизоцим из куриного яйца, лизоцим человеческий рекомбинантный, ацетат натрия, трис, NaBH₄, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), полимиксин В, полимиксин М, L-триптофан, L-лизин, L-аспарагиновая кислота, L-тирозин, L-аргинин, L-фенилаланин, 2,4,6-тринитробензолсульфоновая кислота (TNBS), 5% водный раствор), 1,6-диаминогексан, анисовый альдегид, коричный альдегид, сиреневый альдегид, ванилин, салициловый альдегид, бензальдегид, ε-аминокапроновая кислота, диоксан, этаноламин, Кумасси R-250, Кумасси G-250, BrCN, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄ дитиотреитол, 2-меркаптоэтанол, бромфеноловый синий, лимонная кислота, NADP⁺, NAD⁺, NaIO₄, Na₃AsO₄, CsCl (Sigma Aldrich, США); глицин (Fluka, Германия); L-лизин, БСА, MOPS, DOWEX 50W-X8 400, бариевая соль DL-глицеральдегид-3-фосфатдиэтилацетата (Serva, Германия); Tween-85, бромид додецилтриметиламмония DTAB (Merck, Германия); кокоамидопропил бетаин, CAPB (PCC Rokita, Польша); стерильные

фильтры серии Durapore PVDF («Millipore», США); 10% водный раствор додецилсульфата натрия, белки маркеры для электрофореза (фосфорилаза В, бычий сывороточный альбумин (БСА), овальбумин, карбангидраза, ингибитор трипсина из сои, лизоцим) (BioRad, США); этанол (Феррейн, Россия); агар (Ferak, Германия); хроматографическая колонка WorkBeads 40 SEC (8 мм диаметр, 15 мл), полимерная матрица WorkBeads 200 SEC (Bio-Works, Швеция); DEAE-Toyopearl 650M (Toyo Soda, Япония); фосфорная кислота, глутаровый альдегид (25% водный раствор), акриламид, N, N'-метиленисакриламид (Panreac, Испания); уксусная кислота, CuSO₄ (Реахим, Россия); гепарин (фармакологическая субстанция) (Bioiberica, Испания); Sephadex G-10 Superfine, Sephadex G-25 Superfine, Sephadex G-50 Superfine, Sephadex G-75 Superfine, голубой декстран 2000, рибонуклеаза А из поджелудочной железы быка (GE Healthcare, Швеция); человеческий иммуноглобулин (IgG) "Сандоглобулин" (Sandoz, Германия); Эндотоксин кишечной палочки (Charles River Laboratories, США); Ронколейкин (раствор очищенного интерлейкина-2 для внутривенного и подкожного введения (0,5 мг в 1 мл; «Биотех», Россия); эндотоксин синегнойной палочки «Пирогенал» (Медгамал, Россия); набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации общего иммуноглобулина класса G («Вектор Бест», Россия); Хромогенный тест для определения эндотоксина (LAL-тест) (Nucult Biotech, Голландия), вода для LAL-теста (Пиротест, Россия). Все растворы были приготовлены на бидистиллированной воде, если не указано иное.

Оборудование, которое было использовано в работе: спектрофотометры UV-1601PC и UV-1800 (Shimadzu, Япония); водяной термостат LT-105 (ЛОИП, Россия); аналитические весы ОН-РА64 (Ohaus, США); рН-метр Thermo Orion-420 (Thermo Scientific, США); электрический воздушный термостат TV-80-1 (МедЛайф, Россия);

ротатор-качалка Multi Bio RS-24 (BioSan, Латвия); центрифуга MiniSpin (Eppendorf, Германия); центрифуга ОПН-8 (Дастан, Киргизия), ультрацентрифуга L (Beckman, США); камера для электрофореза VE-10 (Helicon, Россия); гематологический счетчик Cell-Dyn 3700, фирмы Abbott (США); гематологический анализатор Elite-3 (Erba Mannheim, Чехия), хроматографическая система Econo (Biorad, США); хроматографическая система LC-500 (Pharmacia, Швеция), хроматограф АКТА Start («GE Healthcare», Швеция). Если не указано иное, измерения проводили в кюветах с длиной оптического пути 1 см и объемом 0,5 мл.

4.2. Методы исследования.

4.2.1. Подготовка субстратов (бактериальных клеток).

В работе использовали лиофилизированные клетки *M. luteus* (Sigma, США). Готовили суспензию клеток *M. luteus*, добавляя 5 мг препарата клеток в 10 мл буфера трис-MES-ацетат (0,01 М, рН 8,8) при 20 °С.

Если не указано иное, то в качестве клеток *E. coli* использовали музейный штамм JM109, который был любезно предоставлен доктором Дж. Мессингом (Waksman Institute, New Jersey, США, США). Рост клеток *E. coli* осуществляли в соответствии со стандартной методикой [177]. Бактериальные клетки, выращенные в стандартных условиях, замораживали в случае необходимости проводить большие серии сравнения бактериолитической активности в разных условиях на одинаковых бактериальных клетках. Суспензию клеток (примерно 10^9 клеток в мл (колониобразующих единиц, КОЕ) замораживали в растворе 0,15 М NaCl погружением пробирок в жидкий азот и хранили при температуре -70 °С в течение не более 3-4 недель. Препараты клеток *E. coli*

размораживали непосредственно перед экспериментом. Начальные скорости измеряемого ферментативного лизиса клеток не отличались в пределах погрешности эксперимента для препарата до заморозки и после заморозки.

При исследовании ферментов бактериофага SPZ7 использовали штамм *E. coli* ATCC 25922, штамм *Salmonella enteritidis* 60 из коллекции Государственного контрольного института медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича. Клетки *S. enteritidis* и *E. coli* выращивали на ГРМ-агаре при температуре 37 °С в течение 14-15 ч. Если не указано иное, в качестве клеток *Bacillus subtilis* использовали штамм 168trpC2, из музея ВНИИ Генетики. Рост клеток осуществляли в соответствии со стандартной методикой [177].

Использовали препарат лиофилизированных бактерий *Lactobacillus plantarum* («Микроген», Россия), из которого перед началом работы готовили суспензию (10 мл воды на одну ампулу). Результаты измерений скорости лизиса для свежевывращенных клеток и лиофилизированного препарата *L. plantarum* совпадают. Свежевывращенные клетки *L. plantarum* получали пересевом из коммерческого препарата. В качестве среды для культивирования *L. plantarum* использовали анаэробные условия и среду MRS [178] с модификацией (замена Tween-80 на Tween-85). Клетки растили 36-38 часов при температуре 37 °С.

Исследовали штаммы микроорганизмов, любезно предоставленные Первым МГМУ им. И. М. Сеченова, выделенные из клинического материала (моча, мокрота, кал, раневое отделяемое и т. д.). Видовая идентификация выделенных микроорганизмов осуществлялась методом прямого белкового профилирования с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF, на масс-спектрометре серии FLEX (Bruker Daltonic GmbH, Германия). В качестве среды для культивирования микроорганизмов использовали твердую агаризованную среду – 5 % кровяной

колумбийский агар (Oxoid, Великобритания) pH 7,3. Культуру клеток выращивали в течение 22-24 часов при температуре 35-37°C в атмосфере 5% CO₂.

Исследовали штаммы микроорганизмов из музейной коллекции кафедры микробиологии МГУ имени М.В.Ломоносова (эти штаммы обозначены как КМ МГУ). *Lactobacillus acidophilus* КМ МГУ 146, *Lactobacillus casei* - КМ МГУ 153 и *Lactococcus lactis* КМ МГУ 165 выращивали на жидкой среде MRS при 37°C в анаэробных условиях [178]. *Clostridium butiricum* КМ МГУ 19 выращивали на среде следующего состава: 10 г на л глюкоза; 10 г на л пептон; 1 г на л K₂HPO₄; 5 г на л CaCO₃; водопроводная вода, при температуре 37°C в анаэробных условиях [179]. *Pseudomonas fluorescens* КМ МГУ 71, *Alcaligenes faecalis* КМ МГУ 82, *Bacillus cereus* КМ МГУ 9, *Bacillus megaterium* КМ МГУ 17, *Bacillus mycoides* КМ МГУ 31, *Pseudomonas aeruginosa* КМ МГУ 47, *Staphylococcus aureus* КМ МГУ 144 и *Serratia marcescens* КМ МГУ 208 выращивали на мясо-пептонном бульоне при температуре 30°C в аэробных условиях [180].

В работе использовали лиофилизированные бифидобактерии *Bifidobacterium bifidum* лиофилизированный препарат (Микроген, Россия), из которого перед началом работы готовили суспензию (10 мл воды на одну ампулу). Лиофилизированный препарат бактерий в эксперименте по измерению скорости лизиса мало отличается от препарата свежевывращенных клеток по аналогии с препаратом лиофилизированных клеток *L. plantarum*.

Препарат клеток *Thermus aquaticus* был любезно предоставлен к.б.н. А.А. Белогуровым. Клетки выращивали при температуре 75°C в аэробных условиях по стандартной для данной культуры методике [181].

Все выращенные клетки перед работой или хранением обрабатывали следующим образом: суспендировали в 0,9%-ном растворе NaCl, центрифугировали 5 мин при 2000 g, затем снова ресуспендировали в

0,9%-ном растворе NaCl. Концентрацию клеток в данной суспензии подбирали такой, чтобы при разведении в 50 раз оптическое поглощение при длине волны 650 нм составляло 0,5–0,6. Для измерений использовали свежевывращенные клетки или клетки, однократно замороженные жидким азотом, которые хранились при -70° не более 1 мес. В течение эксперимента (до 1 ч) препараты клеток субстратов хранили при 5° . Перед непосредственным использованием или после размораживания бактериальные клетки дополнительно промывали. Суспензии клеток центрифугировали 5 мин при 2000 g при 5° C и ресуспендировали в 0,01 М трис-MES-ацетат-карбонатном буфере, pH 8,8.

4.2.2. Определение общего белка.

Концентрацию общего белка в препаратах определяли по методике Мэрион Брэдфорд с красителем Кумасси G250 [182] и микробиуретовым методом [183, 184] с модифицированным реактивом Бенедикта [185].

4.2.3. Определение бактериолитической активности растворимого фермента на бактериальных клетках.

Бактериолитическую активность ферментов определяли турбидиметрическим методом [83, 84, 91] на длине волны 650 нм. Если не указано иное, то при измерении температура была 37° C. В качестве начальной скорости лизиса клеток принимали изменение оптического поглощения в интервале от 5 до 25 секунд с начала лизиса, если не указано иное. В отсутствие ферментов фоновый самопроизвольный лизис клеток в условиях эксперимента не наблюдался, если не указано иное. В случае наличия фонового самопроизвольного лизиса бактерий в отсутствие бактериолитических ферментов, его величину вычитали из значения

активности. При измерении скорости ферментативного лизиса бактерий, если не указано иное, использовали суспензию клеток с начальным оптическим поглощением A_{650} равным 0,5 -0,6. Измерение проводили в буфере 10 мМ MES-Трис-ацетат-карбонат при разных значениях pH, если не указано иное. В качестве показателя активности в работе приведены значения начального изменения оптического поглощения.

4.2.4. Определение скорости ферментативного лизиса бактериальных клеток в присутствии дополнительных эффекторов.

До добавления фермента измеряли течение 5-6 мин фоновое изменение оптического поглощения, которое может иметь место при самопроизвольном оседании бактерий или их лизисом без фермента. Затем добавляли растворы эффекторов и в течение 5-7 мин измеряли фоновое изменение поглощения для проверки отсутствия лизиса в присутствии эффектора без фермента. После этого добавляли фермент. В качестве начальной скорости лизиса клеток определяли изменение поглощения в интервале 5–25 секунд с момента добавления фермента. При наличии фонового лизиса без фермента вычитали эту величину из суммарного значения скорости лизиса. Фоновое изменение поглощения не превышало величины погрешности измерения скорости лизиса в присутствии фермента, если не указано иное. pH растворов всех добавляемых веществ доводили с помощью растворов NaOH или HCl до того значения, при котором измеряли активность. Описанные в работе эффекты влияния на скорость ферментативного лизиса от добавок не сводились к влиянию на активность за счет изменения ионной силы при увеличении концентрации эффектора.

4.2.5. Определение бактериолитической активности иммобилизованного лизоцима на бактериальных клетках.

Как и в случае растворимого лизоцима, измеряли падение оптического поглощения суспензии клеток при длине волны 650 нм. Измерения проводились в том же буфере и той же температуре, если не указано иное. Начальное оптическое поглощение суспензии клеток также подбирали равным 0.5–0.6. Добавляли в смесь 35 мкл препарата иммобилизованного лизоцима на 1 мл раствора. Реакционную смесь в объёме 10 мл инкубировали в пробирках в термостате на качалке-вращателе при скорости 10 оборотов в минуту. При скоростях вращения более 15 оборотов в минуту имеет место эффект разрушения клеток с полимерной матрицей без фермента, вероятно из-за механического перетиранья клеток гранулами. Каждые 2 минуты из смеси отбирали образцы по 1 мл, оставляя дальше остальную смесь инкубироваться дальше. Отобранные образцы помещали в кюветы, давая осесть частицам иммобилизованного фермента течение 40-50 секунд, затем измеряли оптическое поглощение надосадочной жидкости (суспензии клеток без иммобилизованного фермента). Строили зависимости изменения оптического поглощения во времени в течение 7-10 минут. По наклону кривой определяли скорость изменения оптического поглощения во времени. Ставили контрольные эксперименты для учета поправки скорости лизиса на фоновое изменение оптического поглощения (если таковое наблюдалось), добавляя в смесь матрицу без фермента вместо препарата иммобилизованного лизоцима. Скорость ферментативного лизиса бактерий пропорциональна количеству иммобилизованного фермента в диапазоне от 0 до 80 мкл на мл смеси.

4.2.6. Подсчёт количества клеток (КОЕ) и измерение внеклеточного уровня активности ГАФД для сопоставления с данными турбидиметрии.

При проведении эксперимента по турбидиметрическому измерению скорости лизиса бактерий в определенные промежутки времени отбирали пробы из реакционной смеси для посева на чашки Петри с твердой агаризованной средой. Подсчет числа колониеобразующих единиц (КОЕ) проводили через 30-35 ч инкубации при 37°C.

Для измерения активности ГАФД отобранные пробы центрифугировали 3-5 минут при 2500-3500 g. Измеряли ферментативную активность цитоплазматического фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) в надосадочной жидкости после отделения клеток центрифугированием. Активность ГАФД измеряли по стандартной методике [186], по увеличению оптического поглощения раствора при длине волны 340 нм (накоплению продукта реакции восстановленной формы кофермента NADH). Коэффициент поглощения для NADH принимали равным $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [187]. Измерения активности ГАФД проводили в буферной смеси 50 mM глицин-KOH, pH 8,5, 1 mM ЭДТА, 3 mM Na_3AsO_4 . Начальная концентрация NAD^+ (или NADP^+ в случае *B. subtilis*) была 1 mM. Начальная концентрация глицеральдегид-3-фосфата была 4 mM. Измерения проводили при температуре 37 °C.

Для сопоставления данных измерения лизиса клеток по значениям подсчёта КОЕ, активности ГАФД, данных турбидиметрии, были использованы соотношения для величины степени лизиса $\Theta_{\text{кое}} = 1 - (\text{КОЕ}/\text{КОЕ}_0)$, $\Theta_{\text{ГАФД}} = [\text{ГАФД}]/[\text{ГАФД}_0]$, $\Theta_{\text{А(турбидиметрии)}} = (A_0 - A)/(A_0 - A_\infty)$, где A –это текущее значение оптического поглощения при длине волны 650 нм, A_0 –это начальное значение, A_∞ остаточное оптическое поглощение, которое соответствует 100% разрушенным бактериям в препарате.

4.2.7. Изучение сорбции лизоцима на бактериальных клетках.

Готовили суспензию бактерий в буфере с определённой концентрацией клеток (обычно до 10^9 КОЕ/мл). Добавляли к суспензии лизоцим и инкубировали на качалке в термостате в течение заданного времени и при заданной температуре. После инкубации препарата, отделяли клетки центрифугированием при скорости 2500-3000 оборотов в минуту в течение 3-4 минут. Определяли разницу между исходным и оставшемся в надосадочной жидкости количеством лизоцима. Концентрацию лизоцима определяли по калибровочной зависимости по активности на препарате клеток *M. luteus*.

4.2.8. Выделение ферментов бактериофага SPZ7.

В работе использован бактериофаг SPZ7 из коллекции Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии» (ФБУН ГНЦ ПМБ). Первичные препараты неочищенных ферментов фага были подготовлены сотрудниками ФБУН ГНЦ ПМБ.

Для получения препарата экзолизина использовали препарат частиц бактериофага. Репродукцию бактериофага осуществляли на культуре *S. enteritidis*, растущей на плотной среде ГРМ (гидролизаты рыбной муки). Лизированный газон смывали бульоном ГРМ. Для каждой порции неочищенного фермента получали до 500 мл неочищенного фаголизата с титром бактериофага 10^{11} – 10^{12} БОЕ (бляшкообразующих единиц) в мл. Титр бактериофага в препаратах определяли методом Грация путём подсчёта стерильных пятен [53]. Очищенный препарат бактериофага получали методом дифференциального центрифугирования 2 ч при 27000 g в градиенте хлорида цезия. Процедуру дифференциального центрифугирования препарата проводили 3–4 раза. Частицы бактериофага

разрушали многократным (25 раз) замораживанием (до температуры -25°) и оттаиванием [188]. Раствор фермента фильтровали с помощью микробиологических фильтров с последовательно уменьшающимися диаметрами пор 0,45, 0,22 и 0,1 мкм. Препарат проверяли на бактериолитическую активность и наличие или отсутствие свободного фага. Растворы неочищенных ферментов хранили (не более 1 сут) в замороженном виде при -20° . Далее растворы ферментов размораживали и осаждали белок добавлением $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 100% насыщения при 0° . Если препараты имели концентрацию общего белка менее 1 мг в мл, то перед осаждением добавляли дополнительно бычий сывороточный альбумин (БСА). Привнесённый БСА практически полностью отделяется от активных фракций бактериолитических ферментов на стадии эксклюзионной хроматографии. Сульфат-аммонийный осадок белка растворяли в 6–8 мл буфера 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, с 0,15 М NaCl и 1 мМ ЭДТА. Раствор фермента вносили в хроматографическую колонку с сечением 5 см² и высотой 33 см с Sephadex G-75 superfine, уравновешенную с буфером 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, с 0,15 М NaCl и 1 мМ ЭДТА. Разделение проводилось при температуре 5 °С и скорости подачи элюента 24 мл в час. Фермент подвергали дальнейшей очистке с помощью ионообменной хроматографии с DEAE-Toyopearl 650M на колонке диаметром 2 см² и длиной 12 см, уравновешенной буфером 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, с 1 мМ ЭДТА. Элюцию белков осуществляли градиентом концентрации NaCl 0,0–0,5 М. Разделение проводилось при температуре 5 °С и скорости подачи элюента 35 мл в час.

Для выделения эндолизина вносили в 3 л бульона Хоттингера 30 мл 18-часовой культуры *S. enteritidis* (10^{10} КОЕ/мл). Клетки растили при температуре 37 °С с аэрацией в течение 2–3 ч до концентрации 10^{15} КОЕ в мл. 300 мл очищенного фаголизата (взвеси частиц бактериофага в физиологическом растворе) с концентрацией 10^{14} БОЕ в мл добавляли в

приготовленную культуру и культивировали с аэрацией 25 мин. Затем инфицированные бактериофагом клетки отделяли на центрифуге при 6500 g 15 мин. Бактериальные клетки ресуспендировали в 100 мл 0.05 М буфере Трис-НСl, рН 7.0 и добавляли 7.5 мг рибонуклеазы. Затем культивировали смесь при температуре 37° в течение 60 мин. В результате такой обработки клетки разрушались, высвобождая фермент бактериофага. Затем добавляли в смесь ЭДТА до концентрации 5 мМ и центрифугировали препарат при 27 000 g в течение 2-3 часов при температуре 5°С. Супернатант отделяли от осадка, фильтровали через фильтры с последовательным уменьшением диаметров пор 0.45, 0.22 и 0.1 мкм. Супернатант, содержащий эндолизин, исследовали на бактериолитическую активность и наличие свободного фага.

4.2.9. Выделение бактериолитических ферментов из плазмы крови барана.

Образцы плазмы крови барана были любезно предоставлены научно-производственной фирмой “Покард” (Россия). Плазму крови барана (15 мл) разбавляли до 150 мл с помощью буфера 30 мМ $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$, рН 7.0, затем при температуре 0-5 °С на ледяной бане на магнитной мешалке медленно небольшими порциями в течение 15 минут добавляли $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 60%, выдерживали ещё 20 мин. Отделяли осадок центрифугированием при 8000 g. Осадок растворяли в буфере 30 мМ $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$, рН 7.0, с 0.15М NaCl. Вносимый на эксклюзионную хроматографическую колонку Sephadex G-75 superfine (2.6 на 30 см) препарат не диализовали, так как его объем составлял не более 5% от объема колонки. Было проверено, что остаточное содержание $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в условиях эксперимента не оказывает влияния на объемы элюции целевых белков. Препарат дважды фракционировали на хроматографической колонке, уравновешенной буфером 30 мМ $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$, рН 7.0, с 0.15М NaCl при скорости

подачи элюента 10 мл/ч. Перед второй хроматографией белок из фракций с наибольшей бактериолитической активностью (препарат фракций с молекулярными массами 13-15 кДа, активный по отношению к *E. coli*, и препарат фракций с молекулярными массами 33-37 кДа, активный по отношению и к *E. coli* и к *M. luteus*) концентрировали осаждением добавлением $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% от насыщения. Осадок растворяли в буфере 30 мМ Трис-НСl, рН 7.4. Перед стадией ионообменной хроматографии препарат диализовали против буфера 30 мМ Трис-НСl, рН 7.4. Препараты ферментов подвергали дальнейшей очистке с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-Toyorearl 650M на колонке с сечением 2 см² и высотой 7.5см, уравновешенной буфером 30 мМ Трис-НСl, рН 7.4. Внесение образцов в колонку проводили при скорости подачи раствора 0.25 мл в мин, элюцию проводили при скорости подачи раствора 0.5 мл в мин. Элюцию белков осуществляли с помощью раствора NaCl в буфере 30 мМ Трис-НСl, рН 7.4 в градиенте концентрации от 0 до 0.5 М (общий объем 60 мл). Хроматографию проводили при температуре 4–5°C.

4.2.10. Выделение бактериолитического фактора из плазмы крови человека.

Образцы плазмы крови человека, полученные от здоровых доноров, были любезно предоставлены НПФ Покард. Замороженную плазму крови хранили при температуре -20 °С не более недели, перед работой ее размораживали и центрифугировали в течение 15 минут при 12500 g, затем работали с супернатантом.

Стадия 1. Эксклюзионная хроматография на колонке с сечением 20 см² и высотой 20см с Sephadex G-50 superfine, уравновешенной буфером 10мМ KH_2PO_4 –NaOH, 0.15M NaCl, рН 7.0 при скорости подачи элюента 1.5 мл в мин.

Стадия 2. Эксклюзионная хроматография на колонке с сечением 5 см² и высотой 32 см с Sephadex G-75 superfine, уравновешенной буфером 10 мМ КН₂РO₄-NaOH, 0.15 М NaCl, рН 7.0 при скорости подачи элюента 0.3 мл/мин.

Стадия 3. Замена буфера препарата на колонке с сечением 3 см² и высотой 20 см с Sephadex G-25 superfine, уравновешенной буферной смесью 10 мМ Трис-НСl, рН 8.0 при скорости подачи элюента 1.5 мл/мин. Ионообменная хроматография на колонке с сечением 1 см² и высотой 2.5 см с Toyopearl DEAE 650M, уравновешенная буфером 20 мМ Трис-НСl, рН 8.0, при скорости подачи элюента 0.5 мл в мин и градиенте концентраций 0 - 0.5 М NaCl.

4.2.11. Определение молекулярной массы и чистоты выделенных ферментов.

Молекулярную массу очищенных ферментов определяли в нативном неденатурированном виде методом эксклюзионной хроматографии [189, 190] и с помощью электрофореза в 12% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях [191].

Хроматографию проводили при температуре 20°С на колонке с сечением 0.53 см² и высотой 27 см с Sephadex G-75 superfine со скоростью подачи элюента 5.8 мл в час. Элюент: 20 мМ Трис-НСl буфер, рН 7.5, с 0.15 М NaCl. Для калибровки колонки использовали маркеры молекулярной массы: голубой декстран 2000 (2000 кДа), БСА (67 кДа), овальбумин (43 кДа), миоглобин (17.8 кДа) и рибонуклеазу А (13.7 кДа). Для определения объемов элюции белков в ходе хроматографического разделения на колонке измеряли оптическое поглощение раствора фракций при длине волны 280 нм. Строили калибровочную зависимость

десятичного логарифма молекулярной массы белка стандарта от объёма элюции (положения хроматографического пика). При разделении препаратов изучаемых ферментов использовали элюент с тремя разными значениями ионной силы (буфер 0,02 М Трис-НСl, рН 7,5, с 1 мМ ЭДТА и 0,075 или 0,15 или 0,3 М NaCl) для доказательства корректности получаемых результатов (отсутствия эффекта дополнительного удержания белков за счёт электростатических или гидрофобных взаимодействий).

4.2.12. Масс-спектрометрия при идентификации ферментов.

4.2.12.1. Бактериолитические ферменты барана.

Идентификация бактериолитических ферментов барана проводилась Семёновой М.В. в Институте биохимии имени А. Н. Баха РАН по стандартной методике [192]. После проведения электрофореза в денатурирующих условиях фрагменты геля размером 2 на 5 мм с целевыми белками вырезали, обрабатывали трипсином, концентрации 5-10 нг в мл в летучем буфере 0,05 М NH₄HCO₃. Пептидные фрагменты экстрагировали 20 % водным раствором ацетонитрила с 0,1% трифторуксусной кислотой. Масс-спектроскопию MALDI-TOF полученных фрагментов проводили на приборе Ultraflex II TOF/TOF (Bruker Daltoniks, Германия).

Масс-спектры были сопоставлены с данными, полученными из баз данных UniProtKB/SwissProt и UniProtKB/TrEMBL при помощи сервиса Aldente (<http://kr.expasy.org/tools/aldente/>). При сопоставлении анализировали белки вида *Ovis aries*.

4.2.12.2. Бактериолитические ферменты человека.

Идентификацию бактериолитических ферментов человека проводила Серебрякова М. В. в НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ. После проведения электрофореза белков в денатурирующих условиях, кусочек полиакриламидного геля размером 3-4 мм³ с целевым белком дважды промывали (для удаления красителя) в 100 мкл 40% раствора ацетонитрила в 0.1 М NH₄HCO₃, после удаления раствора (для дегидратации геля) добавляли 100 мкл ацетонитрила. Удалив ацетонитрил и высушив кусочек геля, прибавляли к нему 5 мкл раствора модифицированного трипсина (Promega) в 0.05М NH₄HCO₃ с концентрацией 15 мкг/мл. Гидролиз проводили в течение 4 ч при 37°C, затем к раствору добавляли 10 мкл 0.5 % трифторуксусной кислоты в 10 % растворе ацетонитрила в воде и перемешивали. Раствор над осадком геля использовали для получения MALDI-масс-спектров. При подготовке образцов на мишени смешивали по 1 мкл раствора образца и 0.5 мкл раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (30 мг/мл в 30 % водном ацетонитриле, 0.5% ТФУ), полученную смесь высушивали на воздухе. Исследование проводилось на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II Bruker фирмы Bruker Daltoniks (Германия), оснащенный УФ лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона; точность измеренных моноизотопных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0.003 % (30ppm). Спектры получали в диапазоне масс 600-6000 m/z, выбирая мощность лазера оптимальную для достижения наилучшего разрешения. Полученные масс-спектры были использованы для идентификации белков, которую осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Масс-спектры были обработаны с помощью программного пакета FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, Германия), созданы

пик-листы htm формата. При помощи программы Mascot (опция «пептидный фингерпринт») провели поиск в базе данных Uniprot (SwissProt) среди белков всех организмов с указанной выше точностью, с учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха и возможной модификации цистеинов акриламидом геля или их окисления в S-S мосты. Кандидатные белки, имеющие параметр достоверности score >70, считали определенными надежно ($p < 0.05$).

4.2.13. Химическая модификация лизоцима.

Растворы лизоцима (2 мг в мл) и альдегида (1.5 мг в мл) были приготовлены в буфере $\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3$ (50 мМ, pH 8,0). Молярные соотношения лизоцим /альдегид молярные реакционной смеси составили: 1/0 (контроль), 1/3, 1/7 и 1/15. Реакционную смесь инкубировали при температуре 25 °С в течение 3 ч. на качалке-вращателе (10 оборотов в мин). Затем по окончании инкубации добавляли свежеприготовленный 2% водный раствор NaBH_4 до конечной концентрации 0,1% и инкубировали смесь при 25 °С в течение 30 мин при перемешивании. Начиная с добавления раствора NaBH_4 , процедуру повторяли дважды. Лизоцим отделяли от низкомолекулярных компонентов с помощью эксклюзионной хроматографии на колонке с Sephadex G-25 с сечением 5 см² и высотой 7 см, уравновешенной буфером 20 мМ $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KOH}$ pH 8,0, скорость потока 2 мл в минуту, объём образца до 15% от объёма колонки.

4.2.14. Определение степени модификации лизоцима.

Уменьшение количества свободных аминогрупп лизоцима определяли с использованием TNBS (тринитробензолсульфоновой кислоты) [193, 194]. Измерения проводились при температуре 37 °С в буфере 0,1 М $\text{H}_3\text{BO}_3\text{-NaOH}$, pH 9.5. Добавляли раствор TNBS был добавлен в кювету с раствором белка до концентрации 0,04%, рост поглощения регистрировали при 420 нм до достижения плато (около 50 мин). Величина поглощения на плато (D_{420}) была использована для построения калибровочных кривых с использованием данных для немодифицированного лизоцима (0,7–4,0 мкМ) и ϵ -аминокапроновой кислоты (2–16 мкМ). Степень модификации лизоцима рассчитывали из соотношения значения D_{420} для растворов с равными концентрациями белка для модифицированного и нативного фермента. При расчётах учитывали, что общее количество свободных аминогрупп складывается из 6 боковых радикалов лизина и 1 концевой аминогруппы [195].

4.2.15. Исследование размеров внутренних пор матрицы, предназначенной для иммобилизации фермента.

Исследование размеров пор хроматографической матрицы проводили методом эксклюзионной хроматографии [189, 190] на хроматографической колонке с сечением 0.5 см² высотой 28.5 см. Хроматографический материал был уравновешен буфером 0.01 М $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ pH 7.0 с 0.15 М NaCl. Скорость потока 0.11 мл в мин. Температура 25°C. Определяли коэффициент доступности как $K_{av} = (V_x - V_0)/(V_k - V_0)$, где V_x – объем элюции образца, V_k – объем колонки, V_0 – мертвый объем (объем элюции голубого декстрана). Строили

калибровочную зависимость для десятичного логарифма молекулярной массы белка $\lg(Mr)$ от K_{av} . По точке пересечения оси $\lg(Mr)$ с линейной экстраполяцией калибровочной зависимости (точка $K_{av}=0$) определяли размер глобулярного белка, не способного проникать во внутренние поры матрицы.

4.2.16. Иммуобилизация лизоцима.

4.2.16.1. Иммуобилизация лизоцима при помощи активации матрицы BrCN (метод 1).

За основу была взята методика активации агарозной матрицы с помощью BrCN [196]. 30 мл матрицы сшитой агарозы WorkBeads 200SEC промывали на стеклянном фильтре при температуре 5°C сначала 150 мл воды, а затем 150 мл раствора, содержащего 4 М КОН и 1.6 М KH_2PO_4 . Гель переносили в закрывающуюся емкость, добавляли 30 мл раствора 4 М КОН и 1.6 М KH_2PO_4 , туда же добавляли 3.6 мл раствора 1 г в мл BrCN в диоксане. Смесь выдерживали на ледяной бане в течение 10 мин при помешивании. Активированную матрицу помещали на стеклянный фильтр, промывали с помощью 150 мл воды и затем 150 мл буфера 0.2 М H_3BO_3 -NaOH, pH 8.0 при температуре 5°C. Затем матрицу переносили в заранее подготовленную закрытую емкость, добавляли 30 мл раствора лизоцима с концентрацией 10 мг в 1 мл в буфере 0.2 М H_3BO_3 -NaOH, pH 8.0. Смесь выдерживали в течение 3 ч при температуре 20 °C при помешивании на качалке-вращателе (5 оборотов в мин). Препарат иммуобилизованного лизоцима промывали на стеклянном фильтре 150 мл воды. Затем для блокировки непрореагировавших групп добавляли раствор 1 М этаноламина (30 мл, pH 8.0 доведен с помощью 4 М раствора HCl) и

выдерживали при температуре 20 °С в течение 2 часов. Препарат промывали на стеклянном фильтре 150 мл воды, затем 150 мл буфера 10 мМ KH_2PO_4 - K_2HPO_4 pH 7.0, с 130 мМ NaCl.

4.2.16.2. Иммуобилизация лизоцима на матрицу, активированную с помощью периодата натрия (метод 2); получение аминированной матрицы для метода 3.

За основу брали стандартную методику активации матрицы окислением с части vicинальных –ОН групп остатков сахара с образованием альдегидных групп [197]. Матрицу промывали водой, затем добавляли двукратный объем 2% раствора NaIO_4 , инкубировали 2 часа при температуре 20°C на качалке-вращателе (5 оборотов в минуту), затем промывали 20ти кратным объемом дистиллированной воды. К активированной матрице добавляли либо раствор лизоцима (для метода 2) в буфере 30 мМ NaHCO_3 -NaOH, pH 10.0 (15 мг фермента на 1 мл геля) либо однократный объем 2 М раствора 1,6-диаминогексана (аминирование матрицы для метода 3). Смесь инкубировали 2 часа при температуре 25 °С на качалке-вращателе (5 оборотов в минуту). К полученному препарату добавляли двукратный объем свежеприготовленного 0.5% водного раствора NaBH_4 и инкубировали 30 мин, при перемешивании. Обработку с помощью NaBH_4 повторяли дважды. Далее препарат промывали 5ти кратным объемом 1 М раствора NaCl и 10ти кратным объемом буфера 10 мМ KH_2PO_4 - K_2HPO_4 pH 7.0, с 130 мМ NaCl.

4.2.16.3. Иммуобилизация лизоцима на аминированную матрицу с использованием глутарового альдегида (метод 3).

К 10 мл 50% суспензии (содержащей 50% осадка по объему) аминированной матрицы в буфере 30 мМ $\text{NaHCO}_3\text{-NaOH}$, pH 10.0, добавляли 0.56 мл 25% раствора глутарового альдегида и перемешивали в течение 30 мин на качалке-вращателе (5 оборотов в минуту) при температуре 25°C. Затем гель промывали на стеклянном фильтре с помощью 50 мл исходного буферного раствора, затем переносили в отдельную емкость, добавляли 10 мл раствора лизоцима в том же буфере (концентрация лизоцима 7.5 мг в мл). Смесь инкубировали в течение 1 часа на качалке-вращателе (5 оборотов в мин) при температуре 25 °С. К полученному сорбенту добавляли 10 мл 0.5% водного раствора NaBH_4 , выдерживая после добавления в течение 20 минут, повторяя операцию дважды. После каждой блокировки с NaBH_4 (восстановления основания Шиффа) сорбент промывали 200 мл дистиллированной воды. По окончании препарат промывали 150 мл буфера 10 мМ $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ pH 7.0, с 130 мМ NaCl .

4.2.17. Определение количества иммуобилизованного лизоцима.

Количество иммуобилизованного лизоцима определяли по разнице между добавленным количеством и количеством в надосадочной жидкости после процедуры иммуобилизации.

4.2.18. Хранение препарата иммобилизованного лизоцима.

Иммобилизованный лизоцим хранили при температуре 5 °С в виде 50% суспензии (содержащей 50% осадка по объему) в буфере 10 мМ $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ рН 7.0, с 130 мМ NaCl. Перед экспериментами препарат промывали на стеклянном фильтре 10-кратным объемом того же буфера. При хранении препарата более 2-3 недель, добавляли в буферную смесь NaN_3 до массовой концентрации 0.3%. Активность иммобилизованного лизоцима не изменялась в пределах погрешности эксперимента в течение 2 месяцев хранения.

4.2.19. Исследование смыва иммобилизованного лизоцима (контроль утечки фермента).

В колонку с сечением 1 см² и высотой 5 см помещали 2 мл 50 % суспензии сорбента. Собирали смыв с сорбента, выходящий самотеком. Измеряли активность растворимого лизоцима в смыве на бактериальных клетках *M. luteus*. По калибровочной зависимости активности от концентрации лизоцима определяли концентрацию фермента.

4.2.20. Изучение лизиса бактериальных клеток при пропускании их через колонку с иммобилизованным лизоцимом при физиологических значениях ионной силы и рН.

Использовали 10 мл суспензии клеток *M. luteus* в буфере 10 мМ $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ рН 7.0, с 130 мМ NaCl и колонку высотой 5 см и сечением 0.8 см², с 4 мл иммобилизованного лизоцима, промытого тем же

буфером. Через колонку многократно пропускали суспензию клеток, после каждого пропускания остатки препарата суспензии клеток вытесняли из колонки с помощью раствора буфера объемом 4-5 мл. Измеряли оптическое поглощение раствора, содержащего клетки. Рассчитывали остаточную концентрацию неразрушенных клеток с учётом разведения, с учётом того, что оптическое поглощение суспензии клеток при значениях менее 1 пропорционально концентрации бактерий. Единице оптического поглощения для суспензии *M. luteus* соответствует при длинах волн при 600–650 нм $\sim 5 \cdot 10^7$ клеток в мл [198].

4.2.21. Измерение сорбции эндотоксина на иммобилизованном лизоциме методом сорбции в объеме (batch chromatography).

В пробирки вносили по 100 мкл влажного геля иммобилизованного лизоцима, затем промывали водой для LAL-теста 20 объемами. В буфер 10 мМ KH_2PO_4 - K_2HPO_4 pH 7.0 с 130 мМ NaCl или плазму крови вносили концентрированный раствор эндотоксина до конечной концентрации 20 и 50 нг в мл. Полученный раствор эндотоксина добавляли в пробирки с иммобилизованным лизоцимом в расчёте 10 объемов раствора на 1 объем осадка и инкубировали 30 и 60 мин при температуре 20 или 37 °C на качалке-вращателе. По окончании отбирали образцы надосадочной жидкости, разводили их в 200 раз водой для LAL-теста. Определяли концентрацию эндотоксина по его активности с помощью LAL-теста [199]. Для отрицательного контроля использовали вместо иммобилизованного лизоцима исходную агарозную матрицу.

4.2.22. Исследование сорбции IgG на иммобилизованном лизоциме методом сорбции в объёме (batch chromatography).

Раствор IgG предварительно очищали от сахарозы (содержится в стандартном коммерческом препарате SandoGlobulin) с помощью эксклюзионной хроматографии на колонке с сечением 1 см² и высотой 10 см с сефадексом G-25, уравновешенной буфером 10 мМ КН₂РО₄-К₂НРО₄ рН 7,0, с 130 мМ NaCl со скоростью потока 1 мл в мин. Иммобилизованный лизоцим промывали 10 объемами буфера 10 мМ КН₂РО₄-К₂НРО₄ рН 7,0, с 130 мМ NaCl. 0,9 мл плазмы крови или раствора IgG с концентрацией 10 мг в мл в 10 мМ КН₂РО₄-К₂НРО₄ рН 7,0, с 130 мМ NaCl добавляли к 200 мл 50%-ной суспензии сорбента. Полученную смесь инкубировали в течение 30 мин при 37 °С на качалке-вращателе (5 оборотов в минуту) и затем осадок отделяли центрифугированием (3 минуты при 5000 g). Количество адсорбированного иммуноглобулина рассчитывали по разнице до и после инкубации с сорбентом с учётом поправки на разведение. Поправка на разведение буфером из пор влажного геля сорбента измерялась отдельно в контрольном эксперименте с раствором триптофана.

4.2.23. Исследование связывания белков плазмы крови сорбентом методом колоночной хроматографии и электрофореза элюатов в денатурирующих условиях.

Хроматографию проводили при температуре 20 °С при скорости подачи раствора 0,5 мл в мин. Использовали колонку с сечением 1 см² и высотой 1 см. Сорбент промывали 15 мл буфера 10 мМ КН₂РО₄-К₂НРО₄, рН 7,0, с 130 мМ NaCl. Пропускали 10 мл плазмы крови человека. Затем

колонку промывали 15 мл буфера 10 мМ $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$, pH 7,0, с 130 мМ NaCl. Плазму крови после пропускания через колонку собирали. При промывке колонки контроль осуществляли по фотометрическому детектору при длине волны 280 нм. Элюцию белков проводили сначала 10 мл буфера 0,2 М глицин-HCl, pH 2,5, после этого промывали сорбент 20 мл буфера 10 мМ $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$, pH 7,0, с 130 мМ NaCl. Затем проводили элюцию 10 мл буфера 0,1 М $\text{NaHCO}_3\text{-NaOH}$, pH 10. В полученных фракциях элюата и в плазме до и после хроматографии измеряли концентрацию общего белка и иммуноглобулинов. Белковый состав элюатов исследовали методом электрофореза в полиакриламидном геле [189, 191] без восстанавливающих реагентов с градиентом концентрации акриламида 4–22%.

4.2.24. Автоклавирование сорбентов.

Автоклавирование проводили в буфере 0.01 М $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ pH 7.0 с 0.15 М NaCl в автоклаве 2340 МК (Tuttnauer, Израиль).

4.2.25. Проверка гемосовместимости (совместимости с кровью человека) материалов для определения возможности создания сорбционного материала медицинского назначения.

На различных этапах изучения совместимости материалов с кровью человека в работе принимали участие Коткина Т. И., Овчинникова Е.Д. Дмитриева О. А., Афанасьева М. И. - сотрудники Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения

Российской Федерации и Покровский Н. С. - сотрудник Межотраслевого инжинирингового центра «Композиты России» МГТУ имени Н.Э. Баумана.

4.2.25.1. Проверка гемосовместимости матрицы.

Эксперимент с кровью проводили следующим образом: 1 мл матрицы помещали в колонку сечением 0.5 см^2 и высотой 2 см уравнивали буфером 0.01 М $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{--NaOH}$ pH 7.0 с 0.15 М NaCl. Через колонку пять раз пропускали 10 мл крови со скоростью 0.5 мл в мин, повторяя цикл каждого прохождения через сорбент всей порции. Показатели крови определяли на гематологическом счётчике.

4.2.25.2. Гемолиз в присутствии свободного лизоцима (проверка возможности использования иммобилизованного лизоцима в качестве гемосорбента).

Кровь доноров брали в пробирки объемом 50 мл с предварительно добавленным гепарином до конечной концентрации 2.5 ед в мл. К крови добавляли по раствор лизоцима разной концентрации в физиологическом растворе. Образцы выдерживали при слабом покачивании 120 мин в термостате при температуре 37°C . По окончании разделяли плазму и форменные элементы крови осаждением на центрифуге при 2500 g. Определяли степень гемолиза по Ягеру [200].

4.2.25.3. Исследование гемосовместимости иммобилизованного лизоцима.

Кровь доноров брали в пробирки объемом 50 мл с предварительно добавленным гепарином до конечной концентрации 2,5 ед в мл. Операции с сорбентом проводили при температуре 20°C. Помещали 0,2 мл сорбента в микроколонку с фильтром, имеющем поры размером 133 мкм, сорбент промывали 2 мл физиологического раствора (0,15 М NaCl), снизу на колонку надевали силиконовый шланг диаметром 0,5 мм для увеличения времени контакта крови с сорбентом. Проводили предобработку сорбента гепарином путем инкубации сорбента с двукратным объемом физиологического раствора с добавленным гепарином 100 ед на 1 мл сорбента, перемешивали 10 мин. Предобработка гепарином рекомендуется для систем, используемых в процедурах экстракорпоральной терапии [201]. Проводили хроматографию каждой порции сорбента с 4 мл крови самотеком, время контакта составляло 25–30 мин. Кровь после хроматографии собирали в пробирки по 15 мл. В качестве отрицательного контроля использовали колонку без сорбента. В кровь после колонки добавляли ЭДТА до конечной концентрации 10 мМ. Проводили измерения на гематологическом анализаторе, определяя количество эритроцитов, тромбоцитов, лимфоцитов, концентрацию гемоглобина и гематокрит.

V. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

5.1. Методические особенности измерения скорости ферментативного лизиса бактериальных клеток. Выбор условий эксперимента для протекания ферментативной стадии расщепления клеток как скорость лимитирующей.

Использованы данные из списка публикаций [С6, С18, С19].

Суть экспрессного и удобного метода измерения активности бактериолитических ферментов, а именно турбидиметрического, состоит в том, что измеряют оптическое поглощение суспензии клеток, которое зависит от их концентрации. Затем добавляют фермент и следят за скоростью изменения (падения) оптического поглощения, которое в свою очередь зависит от активности фермента [83, 84, 88, 91]. Несмотря на большую популярность турбидиметрического метода измерения активности среди разных авторов, до сих пор, по сути, не вкладывалось ясного физического смысла в измеряемые таким образом величины, оставляя их в роли «неких эффективных параметров в условных единицах». Чаще всего используют длины волн в диапазоне 550-700 нм, где практически нет дополнительного оптического поглощения от метаболитов, которые могут высвободиться из разрушенных клеток. Зависимость оптического поглощения суспензии нелинейно зависит от концентрации клеток [98-101]. На рисунке 1-1 приведён пример такой зависимости для промытых клеток *Escherichia coli*. Бактериальные клетки имеют сравнительно малый размер, поэтому в такой суспензии обычно не наблюдается самопроизвольного оседания, если нет посторонних включений или крупных агрегатов клеток. Если фоновое оседание или лизис без фермента присутствует, то его необходимо также учитывать в расчётах начальных скоростей, вычитая из величины скорости лизиса

(скорости падения оптического поглощения) после добавления фермента (рисунок 1-1 врезка). Несмотря на то, что функция зависимости исходного оптического поглощения суспензии клеток от их концентрации нелинейная, мы, тем не менее, можем отметить тот факт, что её участок при оптической плотности менее 0,8-1,0 является практически линейным, где величина оптического поглощения (A_{650}) прямо пропорциональна концентрации клеток. Нами это было проверено для различных видов бактерий, и мы можем утверждать, что для всех изученных нами в данной работе микроорганизмов участок зависимости до оптического поглощения 1.0 (при длине оптического пути 1 см) является близким к линейному. Поскольку бактерии различных видов отличаются по размеру и форме клеток, то 1 единица оптического поглощения для каждого микроорганизма соответствует разной концентрации бактерий, что, тем не менее, всегда можно при необходимости учитывать, вводя соответствующие коэффициенты. Таким образом, работая с суспензиями с оптическим поглощением менее 1 единицы, мы, по сути, можем точно контролировать по оптическому поглощению начальную концентрацию клеток, подобно тому, как по оптическому поглощению обычных растворов мы определяем концентрацию растворённых компонентов, используя закон Бугера-Ламберта-Бера. Ранее в литературе отмечалось наличие линейного участка на зависимости оптического поглощения от концентрации бактериальных клеток для частных примеров [83, 84], однако для различных бактериальных клеток не проводилось полноценного сравнения и поиска общих закономерностей в рамках данного вопроса.

Теперь рассмотрим, как, через какие стадии идёт ферментативный лизис бактериальных клеток. На рисунке 1-2 изображена упрощённая схема. Сначала с помощью фермента происходит нарушение целостности

структуры клеточной стенки. Затем клетка под влиянием тех или иных факторов, например осмотического давления, подвергается разрыву с

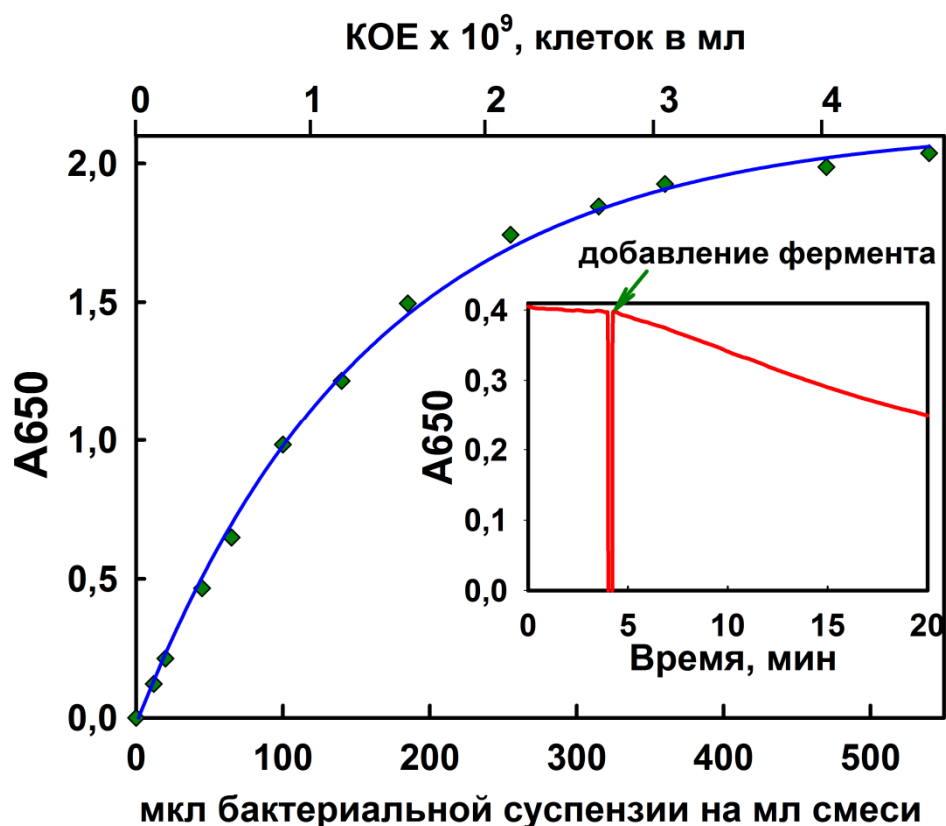


Рисунок 1-1. Клетки *Escherichia coli* суспендированы в буферной смеси 0,02 М Трис-НСl рН 8,5. Добавляемый препарат клеток имеет концентрацию КОЕ= $7,8 \cdot 10^9$ живых клеток в мл. Длина оптического пути 1 см.



Рисунок 1-2. Общая схема лизиса бактериальной клетки.

высвобождением внутреннего содержимого во внешнюю среду. Логично сразу предположить, что наиболее существенные изменения в оптических свойствах происходят на второй стадии, при разрыве клетки. В принципе известно, что само по себе действие бактериолитического фермента не является достаточным условием для разрушения бактериальной клетки. Бактериальная клетка, лишённая целостной клеточной стенки, далее может продолжать жить и даже размножаться в виде «сферопласта» или «протопласта», а со временем может восстановить свою клеточную стенку [92, 93]. В экспериментах разрушение клеток происходит обычно за счёт осмотического шока, когда ионная сила или в общем случае осмимольярность в растворе существенно меньше таковой внутри клетки [3, 92]. Известный факт, что внутренняя ионная сила для большинства клеток как прокариотов, так и эукариотов на этой планете имеет практически одинаковую величину в пределах небольших вариаций, соизмеримую с ионной силой физиологического раствора. Соответственно, например, морские животные и бактерии имеют внутри клеток ионную силу меньше, чем ионная сила окружающей среды, а пресноводные животные и бактерии, наоборот, внутри клеток имеют ионную силу выше таковой у окружающей среды. Таким образом, нам видится важным определить, как измеряемая величина бактериолитической активности (скорости лизиса клеток) будет зависеть от ионной силы. Если наши рассуждения верны, то при возрастании ионной силы до величин физиологического раствора (0,15 М) скорость лизиса клеток должна существенно уменьшиться, несмотря на высокую каталитическую активность фермента. То есть фермент будет «работать», но экспериментально лизис наблюдаться не должен, так как клетки перестанут разрушаться, оставаясь на стадии «живого сферопласта». Систематических исследований ферментативного лизиса клеток в подобном ключе до сих пор не проводилось. На рисунке 1-3 приведена трёхмерная зависимость скорости лизиса клеток (скорости

падения оптического поглощения) от ионной силы и рН среды. Как видим, действительно наблюдается существенное изменение скорости лизиса клеток при изменении ионной силы среды. При возрастании ионной силы клетки перестают разрушаться и «действие фермента» практически не регистрируется. Также мы обнаруживаем здесь интересный феномен, что разрушение клеток несколько замедляется и при очень малых значениях ионной силы, что мы связываем с неспецифической «непродуктивной» сорбцией фермента на клетке в этих условиях и соответственно с уменьшением эффективности работы активного центра. Таким образом, видим, что для обеспечения корректной регистрации действия бактериолитического фермента как катализатора, гидролизующего клеточную стенку, кроме выбора для эксперимента оптимума рН, ещё необходим также выбор некоего оптимального уровня ионной силы в пределах 0,02-0,03 М.

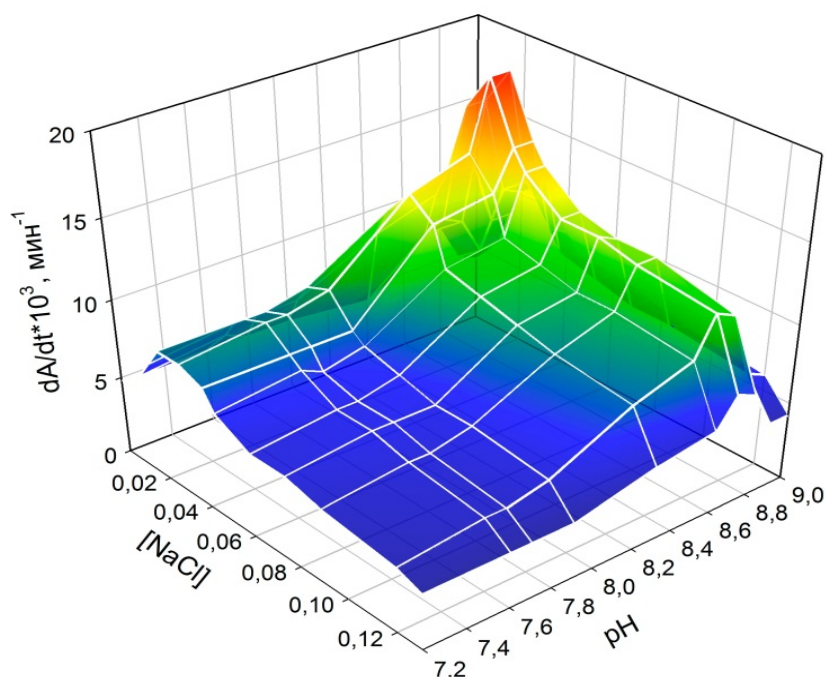


Рисунок 1-3. Зависимость скорости лизиса клеток *Echerichia coli* в присутствии куриного яичного лизоцима от концентрации NaCl и рН. Буферная смесь 20 мМ Трис-НСl. Начальная оптическая плотность суспензии клеток 0,6. Концентрация лизоцима 0,15 мкг в мл. Температура 37°C.

Для других бактериолитических ферментов и других видов клеток – как грамотрицательных, так и грамположительных – картина оказалась в целом схожей, хотя оптимальные значения ионной силы в каждом конкретном случае могли быть несколько смещены или в сторону более высокой концентрации соли или, наоборот, в сторону меньшей концентрации соли. Пример аналогичной трёхмерной зависимости для грамположительного *Lactobacillus plantarum* приведён на рисунке 1-4. Для лизиса клеток *L. plantarum* лизоцимом рН-оптимум смещён в область нейтральных и слабокислых значений, снижение активности при уменьшении ионной силы менее выражено, а более высокая устойчивость клеток к действию лизоцима требует больших концентраций фермента в эксперименте.

Таким образом, мы видим, что кроме выбора правильного оптимального рН (что необходимо для большинства любых не только бактериолитических ферментов), чтобы «увидеть активность», для бактериолитического фермента ещё крайне важно обращать внимание на правильный выбор значения ионной силы раствора. В литературе можно найти многочисленные примеры того, что для различных бактериолитических ферментов имеет место сложная зависимость активности от ионной силы раствора, в том числе и с уменьшением активности как в случае снижения ионной силы, так и в случае повышения ионной силы [202-205]. Делаются предположения об изменении параметров сорбции фермента на заряженной поверхности клетки, что должно зависеть от ионной силы, однако не проводится полноценного сопоставления картины для разных ферментов и разных бактерий для выявления общих закономерностей.

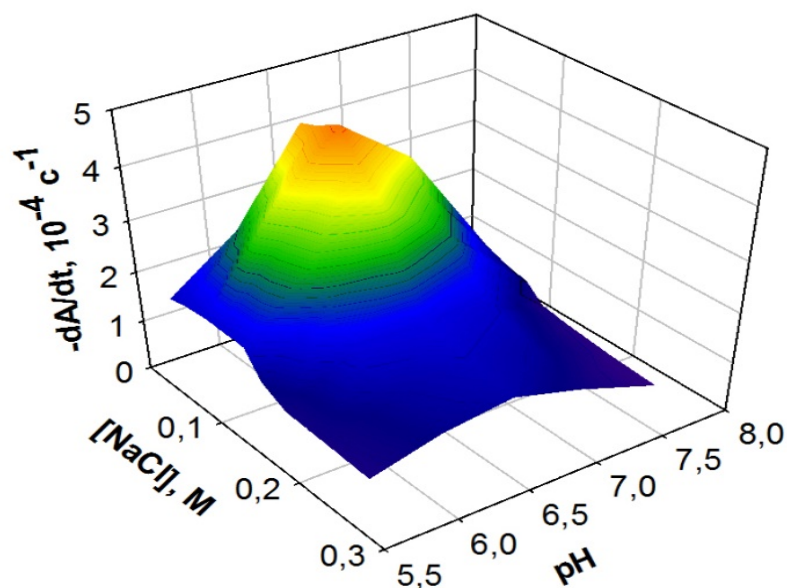


Рисунок 1-4. Зависимость скорости лизиса клеток *L. plantarum* в присутствии куриного яичного лизоцима от концентрации NaCl и pH. Буферная смесь 0,01М Трис-MES-ацетат. Начальная оптическая плотность суспензии клеток 0,6. Концентрация лизоцима 5 мкг/мл. Температура 37°C.

Ещё одним важным методическим моментом, на который необходимо сразу обратить пристальное внимание при планировании эксперимента по измерению бактериолитической активности на живых клетках, является концентрация фермента. Мы предполагаем, что, если в систему добавлять слишком много фермента, то может реализоваться ситуация, когда будет одновременно образовываться много клеток с повреждённой клеточной стенкой, которые не успеют разрушиться вследствие осмотического шока, ферментативная стадия лизиса перестанет быть скоростью лимитирующей, а значит и определяющей скорость всего сложного процесса разрушения клетки в целом. Действительно, на рисунке 1-5 мы видим зависимость скорости лизиса клеток от концентрации фермента, которая подтверждает нашу гипотезу. При добавлении слишком большого количества фермента скорость лизиса

перестаёт зависеть от концентрации фермента. Как видим, для двух разных ферментов наблюдается схожая картина с одним и тем же «пороговым» максимальным уровнем скорости лизиса, когда скорость осмотического разрыва становится лимитирующей. Эффект отсутствия зависимости скорости лизиса от концентрации фермента в случае высоких концентраций фермента наблюдается аналогично и для других ферментов, и для других бактериальных клеток. Абсолютные значения на осях зависят от особенностей конкретного фермента и субстрата. Для адекватного анализа бактериолитической активности необходимо проверять, что выполняется условие пропорциональности скорости лизиса концентрации фермента. В случае неправильного выбора концентрации фермента будут вырождаться зависимости скорости лизиса клеток от pH и различных эффекторов. Например, добавляя слишком большое количество фермента,

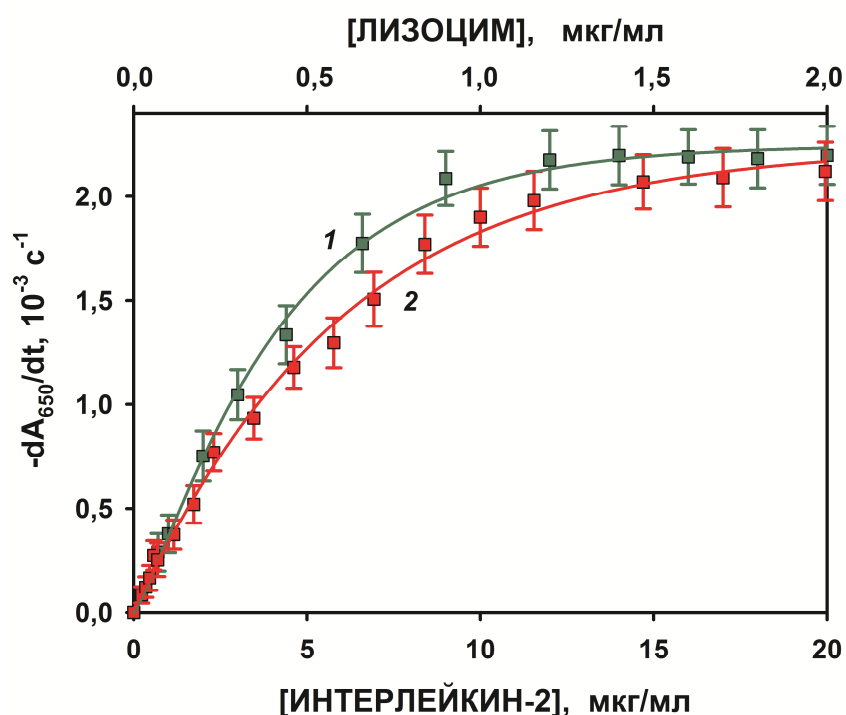


Рисунок 1-5. Зависимость скорости ферментативного лизиса *E. coli* от концентрации ферментов. **1** – куриный яичный лизоцим. **2** -интерлейкин-2 человека. Начальное поглощение суспензии 0.4. Буферная смесь 20 мМ Трис-НСl pH 8.8. Температура 37°C.

можно прийти к ложным выводам, получив картину с отсутствием существенной зависимости скорости лизиса клеток от рН, так как явный рН оптимум для осмотической стадии разрыва клеток отсутствует. В литературе имеются примеры удачного применения формально кинетического анализа к ферментативному лизису бактерий, когда для конкретных частных условий, в которых скорость лизиса (скорость изменения оптического поглощения) также пропорциональна концентрации фермента, а зависимость скорости лизиса от концентрации субстрата (клеток) удовлетворительно описывается уравнением Михаэлиса-Ментен [83-84]. Однако до сих пор не было проведено обобщающего анализа адекватности выбора условий эксперимента для корректного измерения бактериолитической активности.

Таким образом, мы видим, что для дальнейшей корректной экспериментальной работы по измерению бактериолитической активности необходимыми условиями должны быть как минимум соблюдение следующих условий: выбора начальной оптической плотности суспензии клеток менее 0,8-1,0, правильного выбора оптимальных ионной силы и рН, выбора правильной малой концентрации фермента, когда скорость лизиса клеток ей пропорциональна.

5.2. Турбидиметрический метод измерения активности. Разработка математической модели для описания кинетики ферментативного лизиса бактериальных клеток.

Использованы данные из списка публикаций [С6, С18, С19].

Теперь, когда мы разобрались с условиями, в которых необходимо проводить измерения бактериолитической активности, рассмотрим интерпретацию величин, получаемых методом турбидиметрии. На рисунке 2-1 приведена упрощённая типичная схема протекания ферментативного лизиса во времени. Предполагаем соблюдение методических указаний из предыдущего раздела по условиям эксперимента при регистрации ферментативного лизиса. Начальное оптическое поглощение $A_{нач}$ (или A_0) пропорционально исходной концентрации клеток. Логично предположить, что $A_{мин}$ (или A_{∞}) соответствует некому остаточному уровню поглощения, когда все клетки разрушены. Для разрушенных клеток также логично предположить, что их оптическое поглощение пропорционально их количеству. Для некоторых видов микроорганизмов величина $A_{мин}$ равна 0, для других она не равна 0. Введём безразмерный параметр Θ - долю разрушенных клеток или «степень лизиса». Θ равна 0, когда все клетки целы, и равна 1, когда все клетки разрушены. Таким образом, доля целых клеток равна величине $(1-\Theta)$, а доля разрушенных Θ . Логично предположить, что изменение оптических свойств отдельно взятой клетки происходит резко в момент разрушения бактерии, превращения в её из целой в разрушенную. Соответственно, в данной ситуации составляющая оптического поглощения за счёт оставшихся целых клеток будет равна величине $A_{нач} \cdot (1-\Theta)$, а составляющая оптической плотности за счёт разрушенных клеток $A_{мин} \cdot \Theta$. Если наши рассуждения верны, то в любой момент времени:

$$A(t) = A_{нач} \cdot (1 - \Theta(t)) + A_{мин} \cdot \Theta(t) \quad (1)$$

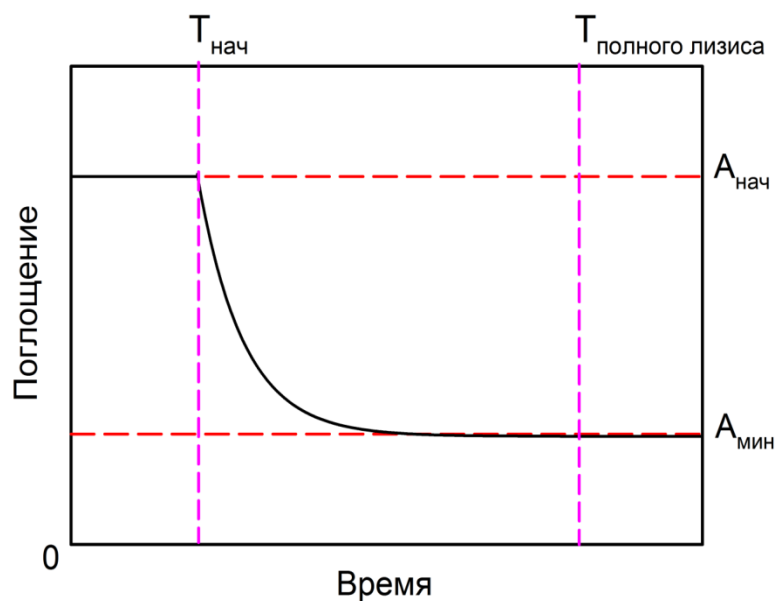


Рисунок 2-1. Упрощённая типичная схема протекания ферментативного лизиса во времени.

Откуда получаем, что:

$$\Theta(t) = \frac{A_{нач} - A(t)}{A_{нач} - A_{мин}} \quad (2)$$

С другой стороны величину степени лизиса (Θ) мы можем также получить методом прямого подсчёта доли жизнеспособных клеток, для чего через определённые интервалы времени можно отбирать образцы из суспензии, где идёт лизис, и делать пересев отобранного материала на чашки Петри, на питательную среду. Концентрацию клеток в мл суспензии обозначим как КОЕ (число колониеобразующих единиц). Из прямого подсчёта числа живых клеток степень лизиса по определению будет выражаться как:

$$\Theta(t) = 1 - \frac{KOE(t)}{KOE_0}, \quad (3)$$

где KOE_0 - начальная концентрация клеток в системе.

Сопоставляя уравнения (2) и (3), получаем:

$$1 - \frac{KOE(t)}{KOE_0} = \frac{A_{нач} - A(t)}{A_{нач} - A_{мин}} \quad (4)$$

Дифференцируя уравнение (4) по времени, получаем:

$$-\frac{dKOE(t)}{dt} = -\frac{KOE_0}{A_{нач} - A_{мин}} \cdot \frac{dA(t)}{dt} \quad (5)$$

Таким образом, если наши рассуждения верны и верна математическая модель, то мы получаем, что скорость убыли концентрации клеток пропорциональна скорости убыли оптического поглощения (оптической плотности) с точностью до множителя. Если это так, то скорость изменения оптической плотности действительно можно использовать как корректную меру для измерения скорости лизиса клеток.

Рассмотрим теперь реальные экспериментальные примеры ферментативного лизиса для разных ферментов и разных субстратов – бактериальных клеток. Условия, рекомендованные в предыдущем разделе по выбору оптимальной ионной силы и рН, начальному оптическому поглощению суспензии клеток соблюдены. Скорость изменения оптического поглощения во времени пропорциональна концентрации фермента. На рис. 2-2 (А) представлены полные турбидиметрические кривые лизиса *E. coli*, *Lactobacillus plantarum* и *Bacillus subtilis* под действием лизоцима и интерлейкина-2. Интерлейкин-2 на *B. subtilis* не действует, поэтому для этого микроорганизма дана зависимость только

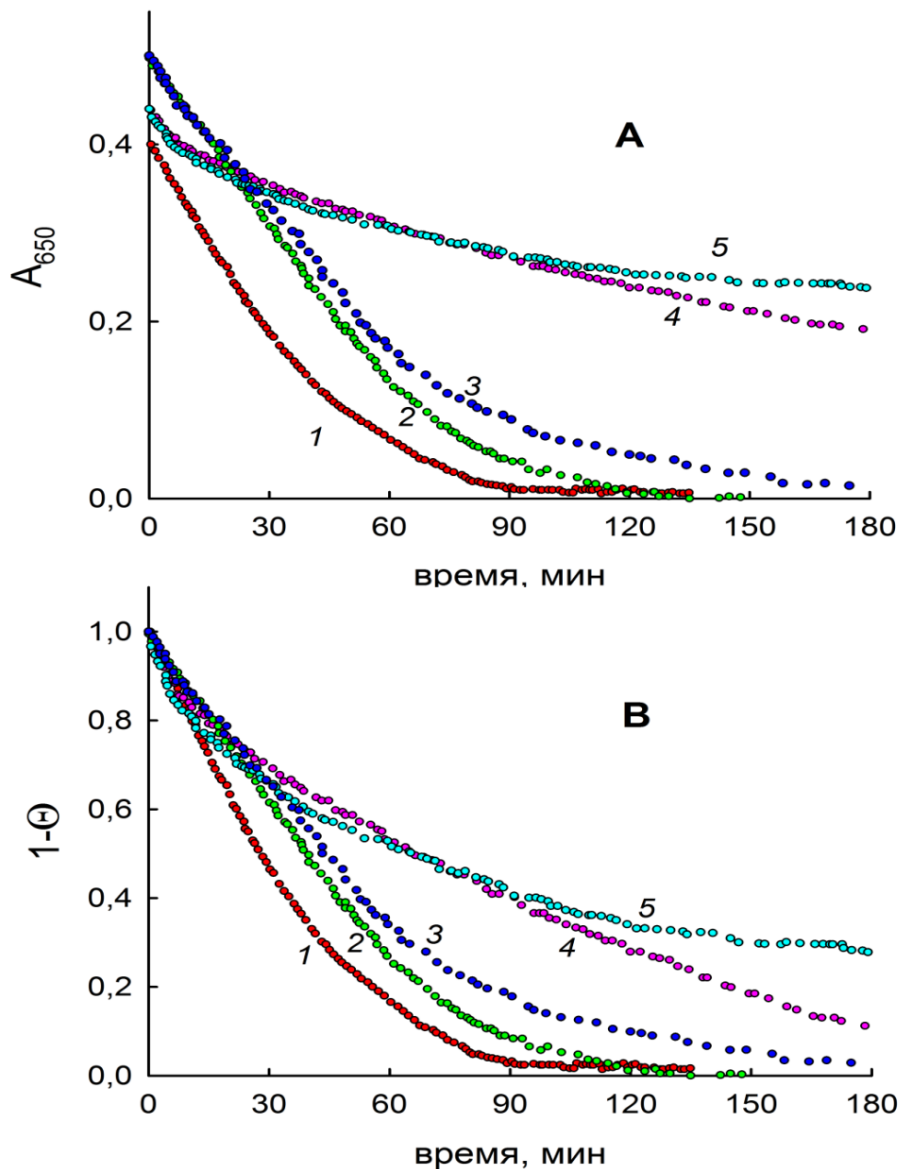


Рисунок 2-2.

А. Турбидиметрические кривые лизиса клеток. **1.** *B. subtilis* под действием лизоцима $E=0.4$ мкг/мл, рН 8.1; **2.** *E. coli* под действием лизоцима $E=0.1$ мкг/мл, рН 8.5; **3.** *E. coli* под действием интерлейкина-2 $E=2.1$ мкг/мл, рН 8.5; **4.** *L. plantarum* под действием лизоцима $E=2.5$ мкг/мл, рН 7.0; **5.** *L. plantarum* под действием интерлейкина-2 $E=1.7$ мкг/мл, рН 7.0

В. Относительное изменение концентрации нелизированных клеток ($1-\Theta$). Обозначения зависимостей такие же, как на рисунке 2-2 А.

для лизоцима. Для удобства сравнения начальные концентрации ферментов подобраны такими, чтобы скорости лизиса различных бактерий были соизмеримы по величине. Для *L. plantarum* и *B. subtilis* требуются бóльшие концентрации лизоцима в сравнении с *E. coli*, что в дальнейшем можно дополнительно учесть в расчётах. Суспензии клеток *E. coli* и *B. subtilis* просветляются практически полностью после полутора часов, однако для *L. plantarum* мы наблюдаем принципиально иную картину, когда оптическое поглощение суспензии выходит на «плато» после 100 минут реакции, что вероятно свидетельствует о ненулевом остаточном поглощении разрушенных клеток ($A_{\text{мин}}$ или A_{∞}).

В таблице 2-1 приведены результаты микробиологического подсчёта КОЕ (после пересева на чашки Петри) в клеточных суспензиях в ходе лизиса. Для клеток *B. subtilis* и *E. coli* после 100 минут лизиса, когда оптическое поглощение падает практически до нуля, при этом также не остаётся живых клеток. В случае *L. plantarum* концентрация живых клеток к трем часам реакции падает почти на порядок, однако остаточное оптическое поглощение к этому моменту сохраняет до 43% от исходной величины. Таким образом, суспензия разрушенных клеток *L. plantarum* действительно обладает ненулевой величиной оптического поглощения раствора.

Пересчёт значений $A(t)$ в $(1-\Theta(t))$ приведён на рисунке 2-2 (Б). Величину $A_{\text{мин}}$ принимаем равной нулю для *B. subtilis* и *E. coli*. В случае клеток *L. plantarum* вычисляем $A_{\text{мин}}$ по формуле, полученной преобразованием (2):

$$A_{\text{мин}} = \frac{A(t) - (1 - \Theta_t) A_{\text{нач}}}{\Theta(t)} \quad (6),$$

куда подставляем $\Theta_{180\text{минут}} = [\text{КОЕ}]_{180}/[\text{КОЕ}]_0 = 0,114$, экспериментальное значение, полученное экспериментально по микробиологическим данным для 180 минут при лизисе. Имея экспериментальные значения оптического поглощения $A_{\text{нач}}=0,44$ и $A_{180}=0,19$, получаем $A_{\text{мин}}=0,16$.

В таблице 2-1 приведены для сравнения величины Θ , полученные из данных микробиологического подсчёта клеток по формуле (3) и полученные из данных турбидиметрии по формуле (2). Как видим, совпадение величины Θ для методов турбидиметрии и микробиологии очень хорошее, что подтверждает справедливость выбранной нами математической модели, доказывает правильность выведенных формул.

Таблица 2-1. Изменение концентрации бактериальных клеток в ходе лизиса (КОЕ), 10^7 клеток/мл и степень лизиса, рассчитанная из данных микробиологического подсчёта КОЕ ($\Theta_{\text{КОЕ}}$) и из турбидиметрических данных по изменению A_{650} (Θ_A).

Использованы данные из списка публикаций автора с соавторами [С6, С19]

	<i>E.coli</i> + лизоцим			<i>E.coli</i> + интерлейкин-2			<i>L.plantarum</i> + лизоцим			<i>L.plantarum</i> + интерлейкин-2			<i>B.subtilis</i> + лизоцим		
	КОЕ	$\Theta_{\text{КОЕ}}$	Θ_A	КОЕ	$\Theta_{\text{КОЕ}}$	Θ_A	КОЕ	$\Theta_{\text{КОЕ}}$	Θ_A	КОЕ	$\Theta_{\text{КОЕ}}$	Θ_A	КОЕ	$\Theta_{\text{КОЕ}}$	Θ_A
0 мин	37	0	0	37	0	0	8,8	0	0	8,8	0	0	4,0	0	0
30 мин	22	0,41	0,39	23	0,38	0,33	6,1	0,31	0,31	5,7	0,35	0,34	1,8	0,55	0,54
60 мин	10	0,73	0,73	12	0,68	0,66	4,5	0,49	0,47	4,4	0,50	0,48	0,6	0,85	0,83
90 мин	3,0	0,92	0,92	6,0	0,84	0,82	3,3	0,63	0,60	3,2	0,64	0,60	0,1	0,98	0,97
120 мин	0,4	0,99	0,99	1,0	0,97	0,90	2,1	0,76	0,72	2,7	0,69	0,66	0,0	1	0,98
150 мин	0,0	1	1	0,0	1	0,94	1,6	0,82	0,81	2,0	0,77	0,70	0,0	1	1
180 мин	0,0	1	1	0,0	1	0,97	1,0	0,89	0,89	1,7	0,81	0,71	0,0	1	1

Правильность модели также была подтверждена ещё другим независимым методом, а именно определением Θ по количеству (по суммарной активности) цитоплазматического фермента глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (ГАФД), которая высвобождается в раствор при разрушении бактериальных клеток. Мы использовали НАД-зависимую ГАФД в случае *E. coli* и *L. plantarum*, НАДФ-зависимую ГАФД в случае *B. subtilis*.

На рисунке 2-3 представлена взаимосвязь между изменениями величин оптического поглощения A (турбидиметрических данных) и числом живых клеток КОЕ (микробиологических данных) в ходе лизиса бактерий. В процессе лизиса величина оптического поглощения суспензии линейно изменяется (уменьшается) в зависимости от концентрации жизнеспособных клеток. Для *B. subtilis* и *E. coli* зависимости проходят через начало координат (точку $A=0$, $[КОЕ]=0$). Для *L. plantarum* зависимость не проходит через ноль, отсекая при $[КОЕ]=0$ от оси ординат величину, приблизительно равную рассчитанному ранее значению $A_{мин}$ (A_{∞}).

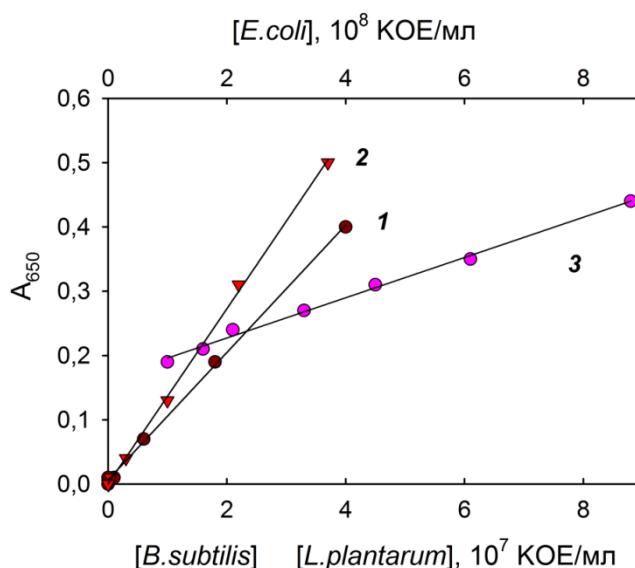


Рисунок 2-3. Изменение оптического поглощения и концентрации жизнеспособных клеток в ходе лизиса лизоцимом. 1: *B. subtilis*, 2: *E. coli*, 3: *L. plantarum*.

Теперь также вспомним, что при примерно равной начальной величине поглощения суспензий начальная концентрация клеток ($[KOE]_0$) существенно отличается для разных бактерий ввиду их различного размера и формы. Для *B. subtilis* величина оптического поглощения $A_0 \sim 0,45$ соответствует концентрации клеток $4,0 \cdot 10^7$ КОЕ/мл, для *L. plantarum* $8,8 \cdot 10^7$ КОЕ/мл, для *E. coli* $3,7 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Сравнивая эффективности лизиса разных бактерий с разной начальной концентрацией, можно разделить всё выражение (5) на величину $[KOE]_0$. Соответственно в качестве «меры сравнения» мы получаем производную по времени от безразмерной степени лизиса (Θ), которая по нашему предположению должна также подчиняться уравнению Михаэлиса - Ментен. Эту величину мы назовём «эффективностью лизиса»:

$$\frac{d\Theta}{dt} = -\frac{1}{[KOE]_0} \frac{d[KOE]}{dt} = \frac{V_{\max}}{K_M + [KOE]_0} = -\frac{1}{A_0 - A_\infty} \frac{dA}{dt} \quad (7)$$

Обращаем здесь внимание, что эффективность лизиса $d\Theta/dt$ с точностью до множителя $-1/(A_0 - A_\infty)$ соответствует величине dA/dt . Таким образом в случае одинаковых экспериментальных начальных условий и соизмеримых величин $(A_0 - A_\infty)$, использование значений $-dA/dt$ вполне корректно для сравнения эффективности лизиса различных бактериальных клеток.

Теперь также вспомним, что скорости лизиса прямо пропорциональны концентрации бактериолитических ферментов в наших условиях. Для учёта разницы в концентрации ферментов, вводим величину «удельной эффективности лизиса».

$$\Lambda = \frac{1}{[E]} \frac{d\Theta}{dt} = -\frac{1}{[E]} \frac{1}{A_0 - A_\infty} \frac{dA}{dt} \quad (8)$$

В таблице 2-2 приведены полученные нами скорости лизиса, эффективности лизиса и удельные эффективности лизиса клеток. Удельная эффективность лизиса (Λ) клеток *E. coli* лизоцимом в 141 раз выше удельной эффективности лизиса клеток *E. coli* интерлейкином-2. Удельная эффективность лизиса клеток *L. plantarum* лизоцимом в 13,5 раз выше, чем удельная эффективность лизиса клеток *L. plantarum* интерлейкином-2. Удельная эффективность лизиса клеток *E. coli* лизоцимом в 15,1 раз выше удельной эффективности лизиса клеток *L. plantarum* лизоцимом. Удельная эффективность лизиса клеток *E. coli* интерлейкином-2 в 1,45 раз выше удельной эффективности лизиса клеток *L. plantarum* интерлейкином-2.

Таким образом, мы показали, что, когда мы для одних бактериальных клеток сравниваем активность одного бактериолитического фермента в разных условиях, мы действительно можем пользоваться как относительной мерой скорости лизиса клеток условной величиной $-dA/dt$, которая при необходимости может быть пересчитана в величину $-[KOE]/dt$ с помощью нормировочного множителя. В случае использования разных клеток и разных концентраций различных бактериолитических ферментов можно при необходимости также сравнивать величины удельных эффективностей лизиса Λ .

В итоге нами экспериментально доказана справедливость предложенной математической модели и правомерность использования турбидиметрически определяемых величин $-dA/dt$ ($-\Delta A/\Delta t$). Показано, что эти величины пропорциональны $-dKOE/dt$ ($-\Delta KOE/\Delta t$), выведены формулы взаимного пересчёта данных величин. Впервые получены универсальные формулы для пересчёта в истинные величины скоростей ферментативного лизиса бактериальных клеток экспериментальных данных, полученных методом турбидиметрии. При этом мы используем феноменологический подход, описывая процесс в целом, вне зависимости от типа фермента и

индивидуальных химических особенностей полимера клеточной стенки бактерии. Подобный универсальный феноменологический подход идеологически аналогичен классическим примерам описания кинетики самых разных ферментативных реакций с помощью уравнения Михаэлиса-Ментен, когда вне зависимости от типа конкретных химических превращений и типа катализа, система описывается с помощью единых эффективных параметров, как, например, K_m , которая при необходимости может быть дискретизирована через константы скоростей элементарных стадий в зависимости от конкретного механизма. В литературе есть примеры попыток обработки турбидиметрических данных для ферментативного лизиса бактерий с помощью уравнений, учитывающих константы скоростей отдельных элементарных стадий предполагаемых моделей [91], авторы при этом ссылаются на наши работы. Однако, данные примеры усложнения расчётов, на наш взгляд недостаточно оправданы, так как, по сути, превращают обработку экспериментальных кинетических кривых в сложный подбор удачной аппроксимации с неустойчивыми параметрами в случае экспериментальной погрешности более 10-15%, которая является обычным явлением при изучении таких сложных систем, как суспензия лизирующихся ферментом бактерий.

Таблица 2-2. Сводные данные по сравнению начальных скоростей изменения измеряемых величин и различных параметров эффективности лизиса различных клеток лизоцимом и интерлейкином-2

Использованы данные из списка публикаций [С6, С19]

	<i>E. coli</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>B. subtilis</i>
$A_{нач}$	0.49	0.44	0.4
$A_{мин}$	0	0,16	0
$[КОЕ]_{нач}$, КОЕ/мл	3.7×10^8	8.8×10^7	4.0×10^7
Лизис бактерий в присутствии лизоцима			
$-dA/dt$, 10^{-4} с^{-1}	2.0	1.9	1.5
$dКОЕ/dt$, $10^5 \text{ КОЕ}^* \text{ мл}^{-1} \text{ с}^{-1}$	1.5	0.60	0.15
$d\Theta/dt$, 10^{-4} с^{-1}	4.08	6.8	3.75
$[E]$, 10^{-3} г/л	0.1	2.5	0.4
$\Lambda_{\text{лизоцим}} = (1/[E])^* d\Theta/dt$, $\text{л}^* \text{г}^* \text{с}^{-1}$	4.08	0.27	0.94
Лизис бактерий в присутствии интерлейкина-2			
$-dA/dt$, 10^{-4} с^{-1}	2.1	1.7	-
$dКОЕ/dt$, $10^5 \text{ КОЕ}^* \text{ мл}^{-1} \text{ с}^{-1}$	1.6	0.54	-
$d\Theta/dt$, 10^{-4} с^{-1}	4.3	6.1	-
$[E]$, 10^{-3} г/л	15	30	-
$\Lambda_{\text{интерлейкин-2}} = (1/[E])^* d\Theta/dt$, $\text{л}^* \text{г}^* \text{с}^{-1}$	0.029	0.020	-
Сравнение эффективности лизиса различных бактерий лизоцимом и интерлейкином-2			
$\Lambda_{\text{лизоцим}}/\Lambda_{\text{интерлейкин-2}}$	141	13.5	-
$\Lambda_{\text{лизоцим}}/\Lambda'_{\text{лизоцим}}$	$\frac{\Lambda_{\text{лизоцим}}^{E.coli}}{\Lambda'_{\text{лизоцим}}^{L.plantarum}} = 15.1$		-
$\Lambda_{\text{интерлейкин-2}}/\Lambda'_{\text{интерлейкин-2}}$	$\frac{\Lambda_{\text{интерлейкин-2}}^{E.coli}}{\Lambda'_{\text{интерлейкин-2}}^{L.plantarum}} = 1.45$		

5.3. Сорбция бактериолитического фермента на субстрате.

Сопоставление равновесных параметров сорбции и кинетических данных скорости лизиса клеток в одинаковых условиях.

Использованы данные из списка публикаций [С10, С16]

В литературе нередко обсуждается вопрос, что в функционировании бактериолитических ферментов важное место занимает процесс сорбции фермента на субстрате [83-84]. Как и любой другой биокаталитический процесс, бактериолитическая эффективность фермента характеризуется как физической сорбцией биокатализатора на клетках субстрата, так и способностью к трансформации, другими словами, эффективностью действия катализатора. Физическая сорбция фермента на поверхности макромолекулы субстрата представляет собой процесс, который зависит от условий, в которых работает система, например, температура, рН и ионная сила. Регулируя эти параметры, можно оптимизировать сорбцию фермента и бактериолитический процесс в целом. Связывание фермента или сорбция может быть так называемой «продуктивной» и предшествовать катализу и соответственно лизису [83-84]. Также возможен вариант «непродуктивной» сорбции, при которой фермент связывается молекулярными структурами поверхности клетки и далее не участвует в лизисе. Такое явление также обсуждается в литературе как один из способов защиты бактериальной клетки от действия бактериолитических ферментов [107-110]. Выделяются специальные белки («ингибиторы лизоцима») бактерий, которые потенциально способны связывать лизоцим и быть такими «молекулярными ловушками» для фермента. Несмотря на актуальность проблемы, до сих пор не проводилось изучения кинетики и термодинамики сорбции фермента непосредственно на целых живых клетках. Мы предложили схему, по которой можно проводить эксперимент с определением параметров

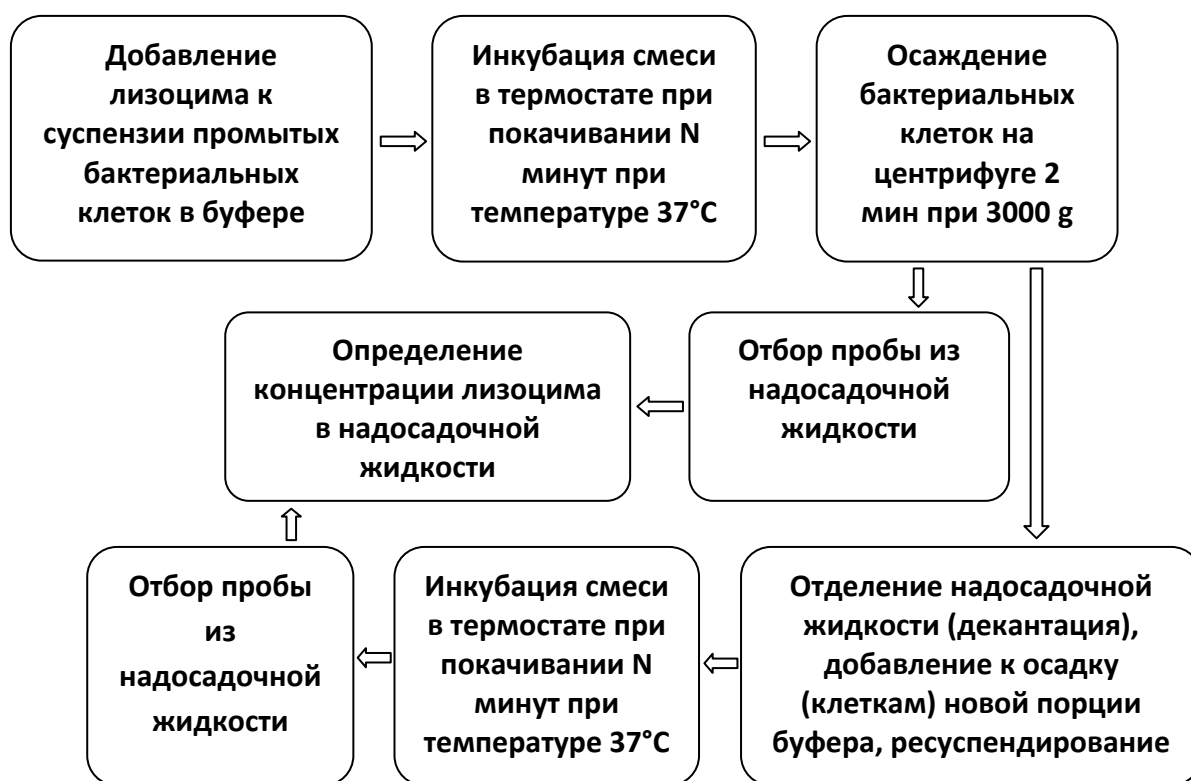


Рисунок 3-1. Принципиальная схема эксперимента по изучению параметров сорбции лизоцима на бактериальных клетках. Такие условия как время, температура, состав буфера могут варьироваться.

сорбции фермента непосредственно на живых клетках (рисунок 3-1).

Для оценки того, сколько фермента сорбируется на поверхности бактерии, следует подобрать метод измерения количества свободного несвязанного фермента в растворе (надосадочной жидкости). Относительно точно количество несвязанного с клетками лизоцима можно определять по его каталитической активности с его стандартным и наиболее удобным для работы субстратом - клетками *M. luteus*. Использование измерения концентрации лизоцима по его активности имеет преимущество по сравнению с методами определения общего белка, так как концентрация общего белка нестабильна в препарате

лизирующихся (разрушающихся) бактериальных клеток, что осложняет анализ. Кроме того, предел обнаружения лизоцима по активности ниже предела обнаружения большинства методов определения общего белка. «Калибровочная» зависимость каталитической активности от концентрации фермента представлена на рисунке 3-2.

Как видно из рисунка, калибровочная кривая является линейной в диапазоне концентраций фермента 0,5-3,5 мкг / мл. Следует отметить, что в случае использования субстрата *M. luteus* ионная сила не оказывает заметного влияния на каталитическую активность фермента при концентрациях NaCl до 60 мМ. Чтобы определить количество фермента, адсорбированного на поверхности *E. coli*, каталитическую активность лизоцима с клетками *M. luteus* измеряли в растворе до инкубации лизоцима с клетками *E. coli* и сразу после инкубации и осаждения клеток центрифугированием препарата.

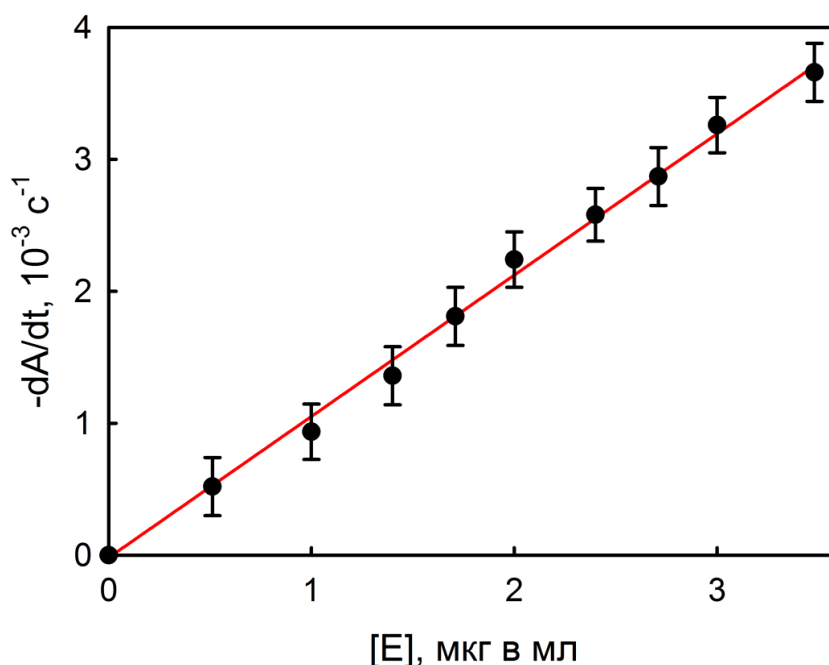


Рисунок 3-2. Калибровочная зависимость для определения концентрации свободного куриного яичного лизоцима в растворе по его активности на субстрате *M. luteus*. 20 мМ Трис-НСl Н 8.5 NaCl 30 мМ, $A_0 = 0.4$.

Данные по адсорбции лизоцима на клетках *L. plantarum* для разного времени инкубации смеси приведены на рисунке 3-3. Далее константы десорбции лизоцима на клетках в различных условиях определялись путем построения данных в координатах изотермы Ленгмюра, которое хорошо описывает экспериментальные данные. Мы установили, что сорбционное равновесие устанавливается при инкубации смеси 4-5 минут, параметры перестают меняться. Также отметим, что сорбционные параметры остаются практически такими же и после 10, 15 и 20 минут инкубации смеси. Вероятно, несмотря на уже идущий лизис, лизоцим практически одинаково связывается как с целыми клетками, так и с фрагментами (обломками) уже разрушенных клеток. Мы также проверили обратимость процесса сорбции. После 5 минут инкубации смеси и центрифугирования, отделяли осадок клеток от надосадочной жидкости, добавляли к осадку клеток новую порцию буферной смеси без лизоцима, ресуспендировали, снова инкубировали 5 минут, определяли концентрацию лизоцима в новой надосадочной жидкости. Сводили баланс, зная, сколько добавлено лизоцима изначально, сколько было в растворе и связано в осадке после первой инкубации, сколько вышло в раствор после второй инкубации, сколько осталось связанного лизоцима после второй инкубации. Значения {свободный лизоцим в растворе, связанный лизоцим в осадке} наносили на один график рисунок 3-4. С новой порцией буфера в раствор выходит такая доля изначально связанного количества лизоцима, которую можно было рассчитать из получаемых констант десорбции. Таким образом, можно утверждать, что связывание носит обратимый равновесный характер.

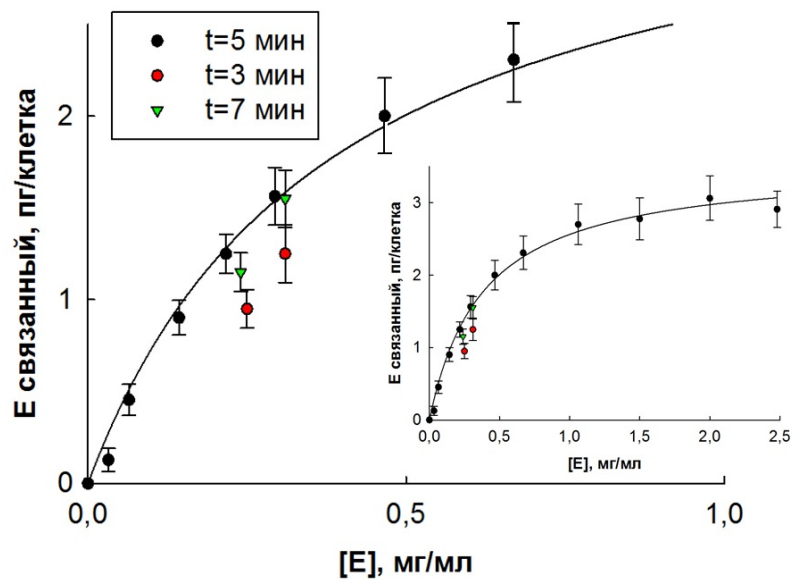


Рисунок 3-3. Изотерма адсорбции лизоцима на клетках *L. plantarum* при различных временах инкубации, более широкий диапазон концентраций лизоцима на врезке. 0,01М Трис-MES-ацетат; pH= 6,7; [NaCl]= 50 мМ

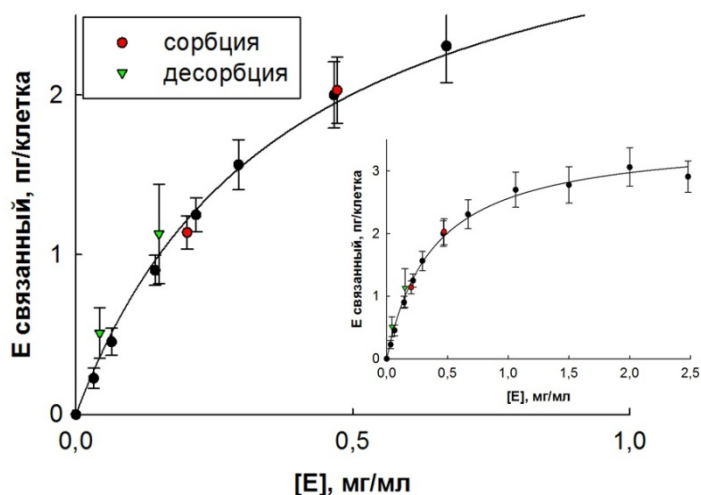


Рисунок 3-4. Сорбция и десорбция лизоцима на клетках *L. plantarum*, на врезке более широкий диапазон концентраций лизоцима. 0,01М Трис-MES-ацетат; pH= 6,7; [NaCl]= 50 мМ

Как мы видели в разделе 1 (рисунок 1-4), для лизиса клеток *L. plantarum* в присутствии лизоцима характерно значение рН-оптимума, равное 6,7 и отсутствие выраженной зависимости скорости лизиса от ионной силы в диапазоне концентраций NaCl в диапазоне 0-0.1 М. Мы изучили сорбцию лизоцима на клетках *L. plantarum* при разных значениях рН, результаты представлены на рисунке 3-5. Были рассчитаны константы десорбции лизоцима и сорбционная ёмкость клеток по лизоциму (таблица 3-1). Как видим из таблицы, константа десорбции практически не изменяется, а меняется сорбционная ёмкость. Максимальная сорбционная ёмкость соответствует по условиям рН - оптимуму активности. Вероятно, в случае *L. plantarum* мы имеем дело с примером преимущественно «продуктивной сорбции», когда улучшение связывания фермента сочетается с более высокой скоростью лизиса.

На рисунке 3-6 приведены данные по сорбции лизоцима на клетках *E. coli*. Аналогично, как и в случае *L. plantarum*, сорбция достигает равновесия к 5 минут инкубации смеси, имеет обратимый характер. Как видно, экспериментальные данные также хорошо согласуются с уравнением изотермы адсорбции Ленгмюра, которое позволяет определить константу десорбции K_d и сорбционную ёмкость клеток. Полученные значения K_d и доли фермента, связанного на поверхности клеток при различной ионной силе системы приведены в таблице 3-2 и на диаграмме на рисунок 3-7.

При увеличении концентрации NaCl от 0 до 60 мМ, как видно из таблицы и диаграммы, K_d увеличивается более чем в 10 раз, изменяясь с 0,12 до 1,60 мкМ. Зависимость скорости лизиса от ионной силы, в отличие от константы десорбции, демонстрирует иной характер изменения, имея ярко выраженный колоколообразный профиль с оптимумом при концентрации 30 мМ NaCl в системе. Скорость лизиса бактериальных клеток уменьшается с увеличением концентрации соли до 60 мМ.

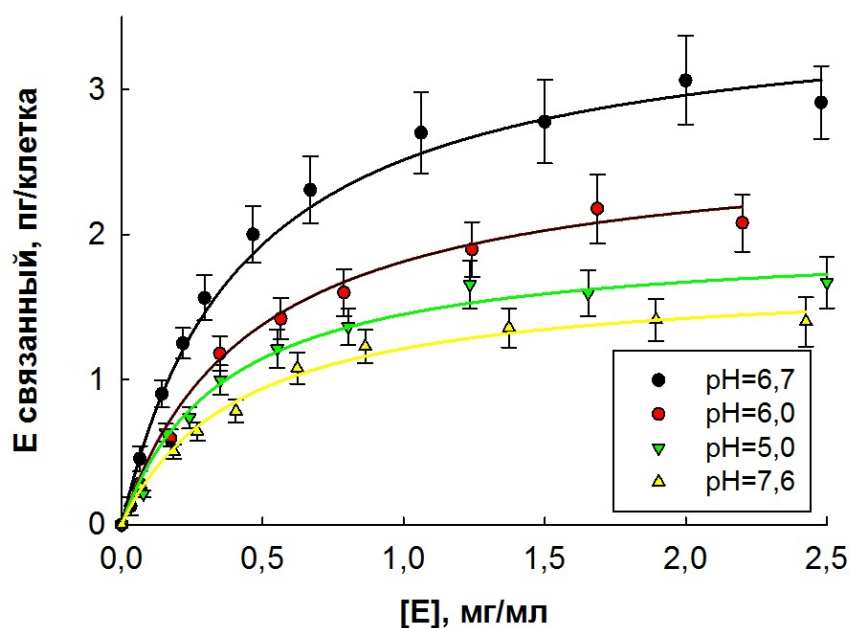


Рис. 3-5. Изотермы адсорбции лизоцима на клетках *L. plantarum*. 0,01М Трис-MES-ацетат; pH=5,0; 6,0; 6,7; 7,6; [NaCl]= 50 мМ

Таблица 3-1. Сорбционные характеристики лизоцима при связывании с клетками *L. plantarum* при различных значениях pH.

pH	$K_m, 10^7 \text{ КОЕ/мл}$	$V_{max}, 10^{-4} \text{ с}^{-1}$	$K_d, 10^{-5} \text{ М}$	Γ_{max} (сорбционная емкость), пг/клетка
5,0	$6,8 \pm 1,0$	$1,4 \pm 0,9$	$2,5 \pm 0,4$	$2,0 \pm 0,2$
6,0	$5,7 \pm 0,6$	$3,3 \pm 0,6$	$3,2 \pm 0,5$	$2,6 \pm 0,3$
6,7	$4,6 \pm 0,4$	$4,4 \pm 0,4$	$2,9 \pm 0,4$	$3,6 \pm 0,3$
7,6	$4,7 \pm 0,7$	$2,7 \pm 0,5$	$2,8 \pm 0,4$	$1,7 \pm 0,2$

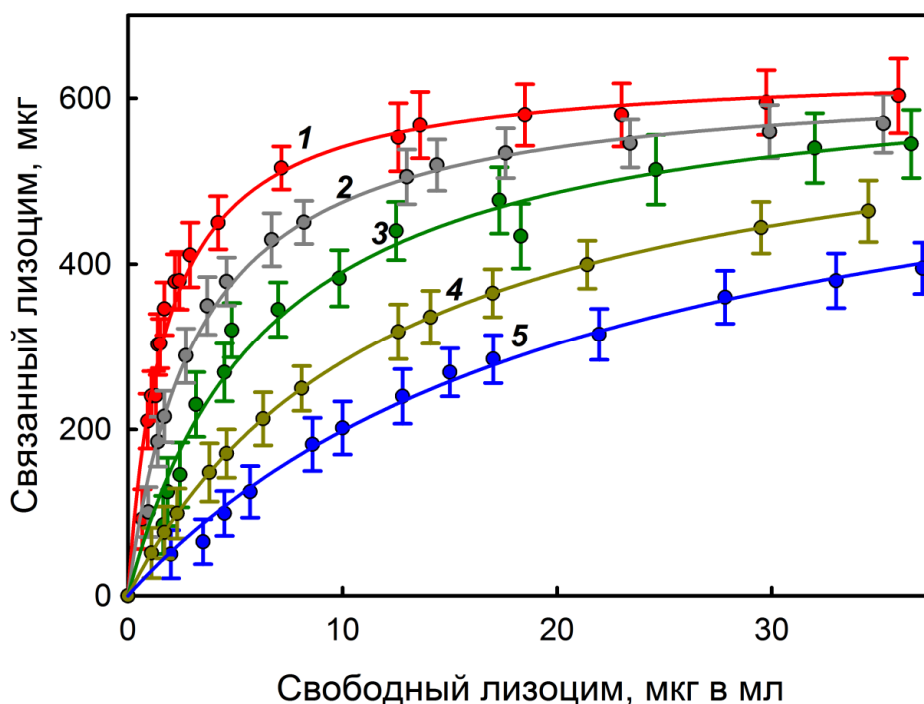


Рисунок 3-6. Изотермы адсорбции куриного яичного лизоцима на клетках *E. coli*. 5 минут инкубации смеси при температуре 37 °С. 30 мМ Трис-НСl, буфере, рН 8,6, содержащем различные концентрации NaCl: 1 - 0 мМ, 2 - 15 мМ, 3 - 30 мМ, 4 - 45 мМ, 5 - 60 мМ. Значения связанного лизоцима рассчитаны для 1 мл клеточной суспензии ($KOE = 1,0 \times 10^9$).

Увеличение ионной силы отрицательно влияет на скорость лизиса, вероятно, из-за снижения осмотического давления и, соответственно, уменьшения скорости разрушения клеток *E. coli*. Малое значение K_d при низком значении ионной силы, видимо, объясняет тот феномен, что скорость лизиса максимальна при некотором оптимальном значении концентрации соли, снижаясь как при увеличении концентрации соли, так и при снижении, когда минимально соотношение свободного фермента к

связанному и соответственно в данном случае для *E. coli*, вероятно, имеет место непродуктивная сорбция. Несмотря на то, что с увеличением концентрации NaCl значения K_d и скорости лизиса заметно изменяются, общая адсорбционная ёмкость клеток, как видно, практически не зависит от изменения ионной силы раствора.

В случае *E. coli* можно предположить, что с увеличением ионной силы общее количество сайтов адсорбции остается неизменным, однако энергия адсорбции в системе фермент-клетка уменьшается. Адсорбция лизоцима, вероятно, происходит преимущественно через электростатические взаимодействия между поверхностью клетки и фермента. Также возможна ситуация, что не все связанные молекулы лизоцима каталитически активны. Из литературы известно, что клетки ряда бактерий, в том числе и *E. coli*, могут содержать «молекулярные ловушки-ингибиторы лизоцима», которые могут связываться с ферментом и образовывать неактивные комплексы [107-110, 206]. При низкой ионной силе десорбция лизоцима является определяющим фактором увеличения

Таблица 3-2. Данные по адсорбции лизоцима на клетках *E. coli*.

[NaCl], мМ	K_d , мкМ	Сорбционная ёмкость, нмоль ^a	Скорость лизиса ^b , с ⁻¹	Свободный фермент ^c , %
0	0.12±0.04	45±4	0.92±0.08	0.69±0.08
15	0.23±0.08	44±4	1.91±0.21	1.3±0.1
30	0.46±0.18	44±5	2.46±0.17	2.6±0.3
45	0.87±0.31	44±5	2.29±0.17	4.8±0.5
60	1.60±0.37	45±6	1.86±0.15	6.5±0.6

^a в расчёте на 1 мл суспензии клеток (КОЕ=1.0*10⁹ клеток в мл),

^b $-(dA_{650}/dt) 10^4$,

^c суммарная концентрация лизоцима 1 мкг/мл (68.5 нМ), КОЕ =1.0*10⁹ клеток в мл

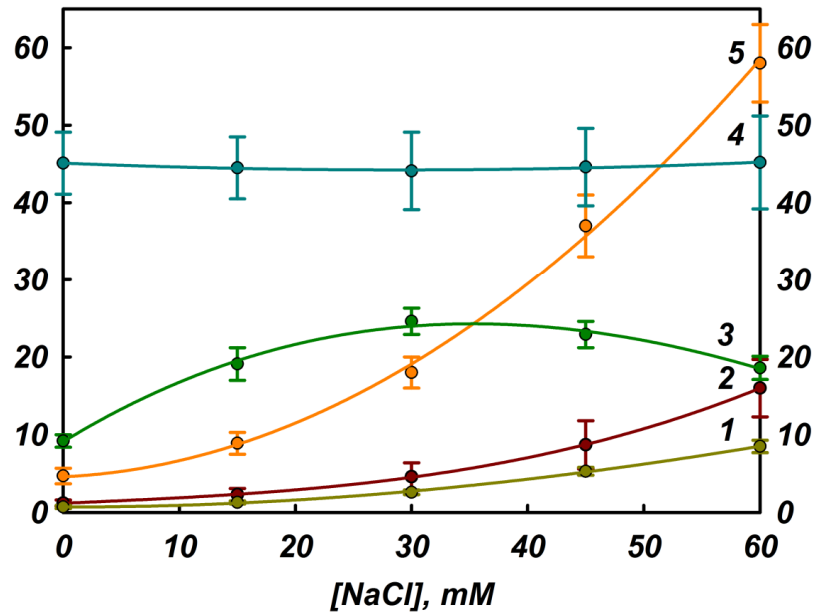


Рисунок 3-7. Зависимость основных термодинамических и кинетических параметров взаимодействий лизоцим - *E.coli* при различной концентрации NaCl в системе: 1 - отношение свободного / общего фермента,%; 2 - $K_d \times 10$, мкМ; 3 - скорость лизиса $\times 10^4$, с^{-1} ; 4 - максимальная адсорбционная емкость, нмоль и 5 - концентрация свободного фермента $\times 10$, нМ.

скорости реакции лизиса, тогда как при высокой ионной силе осмотический лизис клеток становится лимитирующим фактором, который замедляет весь процесс. Как видим из таблицы 3-2, минимальное значение K_d составляет 120 нМ. Есть упоминание в литературе, что из одного из штаммов *E. coli* был удачно выделен периплазматический ингибитор лизоцима, для которого экспериментально оценили K_d с лизоцимом как 1 нМ [109], что на два порядка ниже нашего минимального значения. Такая разница вряд ли может быть сведена к небольшим различиям условий эксперимента и к тому, что в цитируемой работе эксперимент ставился на очищенном выделенном ингибиторе, а у нас измерения непосредственно сделаны на целых живых клетках. Вероятно,

мы имеем дело с отличиями для разных штаммов *E. coli*. При изучении адсорбции лизоцима на клеточной поверхности *E. coli* мы видим ключевые факторы, влияющие на скорость ферментативного лизиса бактерий в системе. Для данного микроорганизма ионная сила оказывает двойное влияние на систему: K_d увеличивается с увеличением ионной силы, что сначала приводит к лучшей производительности фермента, а затем скорость лизиса клеток уменьшается с увеличением ионной силы системы за счет осмоса. Таким образом, рН 8,6 и 30 мМ NaCl являются оптимальными условиями для лизиса клеток *E. coli* лизоцимом.

В таблице 3-3 для сравнения приведены данные по адсорбции лизоцима на клетках *B. subtilis* при оптимальном значении рН и при различных значениях ионной силы. Как видим, при уменьшении концентрации соли от некоторого оптимального уровня (40 мМ) наблюдается уменьшение величины K_d , означающее более прочное связывание лизоцима и соответствующее снижению активности. Таким образом, и для *B. subtilis*, как и для *E. coli* имеет место непродуктивная сорбция лизоцима, которая может повышать резистентность бактерий к действию фермента. Для *B. subtilis* также известно, что отдельные штаммы могут иметь особый ингибитор лизоцима, отличающийся от таковых у других микроорганизмов. Ингибитор лизоцима *B. subtilis* представляет собой комплекс пальмитиновой кислоты и пептида массы порядка 12 кДа с аномальным содержанием остатков аспарагиновой и глутаминовой кислоты, валина и лейцина [206].

Таким образом, мы видим различные тенденции в изменениях параметров сорбции лизоцима и скорости лизиса на различных бактериальных клетках как грамотрицательных, так и грамположительных. Так, например, грамположительные спорообразующие *B. subtilis* и

Таблица 3-3. Данные по адсорбции и активности лизоцима на клетках *B. subtilis*. Буферная смесь 0,02М трис-НСl рН 8,1 с различной концентрацией NaCl. Концентрация лизоцима при определении активности 0,3 мкг/мл.

[NaCl], mM	$K_M \cdot 10^{-6}$, КОЕ/мл	$V_{max} \cdot 10^{-5}$ КОЕ/мин	K_d , мкМ
0	56±5	6,0±1,5	0,26±0,07
20	27±4	7,7±1,7	0,70±0,23
40	3,1±0,3	8,6±2,0	1,37±0,38
60	9,2±0,8	7,4±1,6	1,05±0,36
80	11±1	5,9±1,5	0,83±0,28

грамотрицательные *E. coli* при лизисе лизоцимом демонстрируют признаки наличия непродуктивной сорбции фермента, когда скорость лизиса возрастает в случае более высокой доли десорбированного лизоцима. Грамположительные *L. plantarum* демонстрируют продуктивную сорбцию лизоцима, усиливающую лизис клеток.

Данный подход в исследовании сорбции фермента на бактериальных клетках также может успешно использоваться для анализа действия других бактериолитических ферментов на различные клетки. С помощью данного подхода могут выявляться штаммы микроорганизмов, которые используют непродуктивную сорбцию лизоцима для блокировки его действия, при этом предложенный нами метод для целых живых клеток прост в исполнении, в отличие от предложенных другими авторами подходов с выделением ингибитора из клеток, что и более трудоёмко, и

даёт больше рисков получить артефактные результаты. Также кроме использования для определения концентрации несвязанного фермента калибровочной зависимости по активности на *M. luteus*, могут при необходимости применяться и другие методы, например, иммуноферментный анализ.

5.4. Поиск и исследование новых бактериолитических ферментов. Выделение и исследование ферментов сальмонелльного бактериофага SPZ7. Обнаружение и исследование бактериолитической активности компонента системы комплемент С2. Обнаружение и исследование бактериолитической активности интерлейкина-2. Обнаружение и исследование бактериолитической активности серотрансферрина.

5.4.1. Бактериолитические ферменты сальмонелльного бактериофага SPZ7.

Использованы данные из списка публикаций по работе [С18, П4].

Разработанные подходы в измерении активности на живых клетках позволяют корректно отслеживать уровень бактериолитической активности, что необходимо, в частности, при выделении и очистке препаратов бактериолитических ферментов. Таким образом, мы получаем возможность и лучше контролировать процесс очистки ферментов из препаратов, где они, по нашим сведениям, точно есть, и также выявлять в биологических материалах новые бактериолитические ферменты, которые не были обнаружены ранее в виду непроработанности методик измерения активности на разных субстратах.

Бактериолитические ферменты бактериофагов (бактериальных вирусов) называют «лизинами». Лизины делятся на экзолизины и эндолизины. Экзолизины нужны для проникновения фага в бактериальную клетку, а эндолизины нужны для выхода из заражённой фагом бактериальной клетки новых вирусных частиц. На рисунке 4-1 приведен пример хроматограммы разделения препарата фермента эндолизина фага SPZ-7, полученного из разрушенных клеток *Salmonella enteritidis*. По активности фермента на клетках *Salmonella enteritidis* можно

определить фракции, содержащие фермент. Так как эта хроматография эксклюзионная, то по объёму элюции для максимума пика также можно сразу определить молекулярную массу этого ранее неизученного белка. Аналогично эксклюзионной хроматографии был подвергнут препарат экзолизина фага, полученный разрушением вирусных частиц. В результате измерений молекулярной массы ферментов эндолизина и экзолизина фага мы получили значения 18.5 ± 2.2 кДа и 17.8 ± 4.4 кДа соответственно. На основании этих данных мы можем с уверенностью говорить, что экзолизин и эндолизин имеют одинаковую молекулярную массу в пределах погрешности эксперимента.

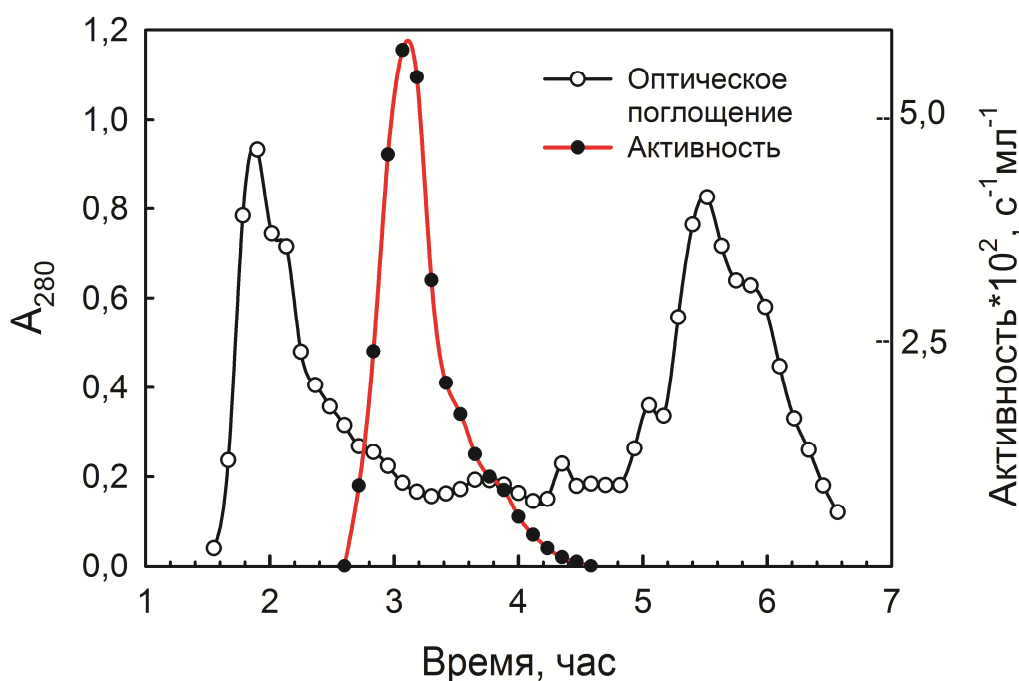


Рисунок 4-1. Хроматографическое разделение производилось при температуре $10-12^\circ \text{C}$. Скорость потока была 24 мл/час . 8 мл препарата вносили в хроматографическую колонку $5 \text{ см}^2 \times 33 \text{ см}$ с Sephadex G75 superfine, уравновешенную буферной смесью 0.02 M трис- HCl с $\text{pH}=7.5$ с 0.15 M NaCl и 0.001 M ЭДТА. Для подтверждения объёма элюции фермента хроматографию также проводили ещё при двух значениях концентрации NaCl , 0.075 M и 0.3 M .

Мы сравнили субстратную специфичность эндолизина, экзолизина и куриного яичного лизоцима. В качестве субстратов нами были взяты: *Micrococcus luteus*; *Salmonella enteritidis* и *Escherichia coli*. Результаты сравнения специфичности ферментов экзолизина, эндолизина и яичного лизоцима приведены на рисунке 4-2. Отметим, что специфичность изучаемых фаговых ферментов весьма заметно отличается от специфичности яичного лизоцима. Также следует заметить, что данные фаговые ферменты действуют не только на своего хозяина сальмонеллу, но также лизируют клетки кишечной палочки *E.coli*, которая является «близкородственным организмом» для *Salmonella enteritidis*, входя в тоже семейство Энтеробактерий (Enterobacteriaceae). Таким образом, фаговые ферменты могут иметь избирательность действия, отличную от избирательности действия самого фага, который способен заражать только определённые штаммы бактерий. Не исключено, что экзолизин и эндолизин могут оказаться гликозидазой подобной лизоциму, но обладающей иной специфичностью. Препараты экзолизина и эндолизина дают практически идентичную картину соотношений скоростей лизиса клеток сравниваемых микроорганизмов, аналогично эти два фермента дают сходные результаты в других экспериментах, поэтому далее приведены результаты только для «эндолизина».

Была обнаружена добавка, которая существенно влияет на скорость лизиса бактерий в присутствии сравниваемых ферментов. На рисунке 4-3 приведены данные по влиянию пептидного антибиотика полимиксина-М на ферментативный лизис клеток. Антибиотик, добавленный в микромолярной концентрации, существенно усиливает ферментативный лизис клеток. При этом сам антибиотик не вызывает лизиса бактерий в отсутствии фермента.

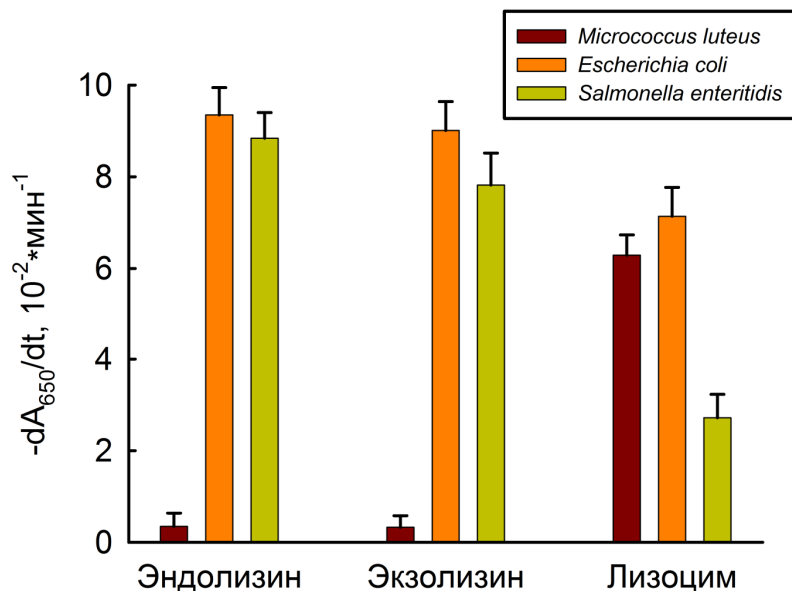


Рисунок 4-2. Субстратная специфичность эндолизина, экзолизина и куриного яичного лизоцима. Начальное оптическое поглощение суспензии клеток 0,65-0,70. Концентрации ферментов 0,7 мкг/мл. 0,02М Трис-НСl, рН 8,5

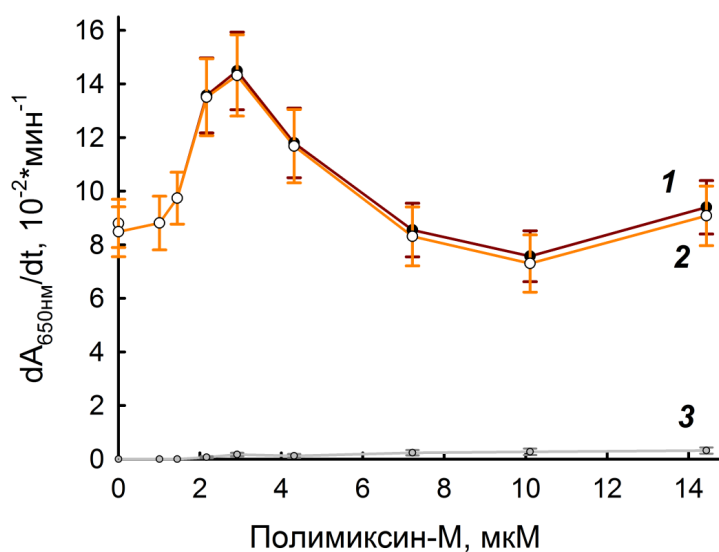


Рисунок 4-3. Влияние добавки полимиксина М на лизис клеток *S. enteritidis* эндолизином. Начальное оптическое поглощение суспензии клеток 0,8. Фермент в конечной концентрации 0,7 мкг/мл добавляли через 5 мин после инкубации клеток с остальными компонентами. 1 скорости ферментативного лизиса клеток. 2 скорость ферментативного лизиса клеток с вычетом фонового лизиса без фермента. Фонový лизис клеток в присутствии полимиксина-М.

Действие полимиксина-М на клетки может иметь сложный характер. Данный антибиотик является высокотоксичным для бактерий и может драматическим образом влиять на процессы, проходящие в клетках. [207, 208].

5.4.2. Интерлейкин-2 и компонент системы комплемент С2.

Использованы данные из списка публикаций по работе [С14, С15].

Мы исследовали плазму крови барана на предмет наличия ранее не изученных бактериолитических факторов. В процессе разделения белков с помощью эксклюзионной хроматографии было обнаружено, что фракция белков с молекулярными массами 30-38 кДа активна по отношению к клеткам *E. coli* и *M. luteus*. Фракция белков 13-17 кДа была активна в отношении *E. coli*, но не действовала на *M. luteus*. Фракций, активных по отношению *V. subtilis*, не обнаружилось. Из фракции 30-38 кДа в результате дальнейшего разделения с помощью ионообменной хроматографии был получен единственный фактор, в присутствии которого лизируются как клетки *E. coli*, так и клетки *M. luteus*. Далее этот фактор обозначаем М34-ЕМ. Из фракции 13-17 кДа при разделении с помощью ионообменной хроматографии были получены два бактериолитических белковых фактора, активных в отношении только клеток *E. coli*. Эти два фактора обозначаем М15-Е1 и М15-Е2. Из плазмы крови барана, таким образом, были выделены три бактериолитических белковых фактора. Методами электрофореза в денатурирующих условиях и эксклюзионной хроматографии были определены молекулярные массы: для М15-Е1 и М15-Е2 15 ± 2 кДа, для М34-ЕМ 34 ± 4 кДа. Все выделенные

белковые факторы были проверены на гомогенность в условиях электрофоретического разделения в присутствии SDS.

Бактериолитическая активность выделенных факторов в сравнении с лизоцимом была проверена по отношению к бактериям *E. coli*, *M. luteus* и *B. subtilis*. Как видим из рисунка 4-4, найденные бактериолитические факторы не проявляют активности по отношению к клеткам *B. subtilis* в отличие от лизоцима. M15-E1 и M15-E2 проявляют более строгую специфичность в сравнении с M34-EM. M34-EM по специфичности схож с лизоцимом.

Выделенные бактериолитические факторы были подвергнуты трипсинолизу с последующим масс-спектрометрическим анализом пептидных фрагментов. M34EM был идентифицирован как компонент системы комплемент C2 (AC A5YBU8, Mw 38 кДа), M15E-1 и M15E-2 были идентифицированы как интерлейкин-2 (AC P19114, Mw 16 кДа) [209, 210]. Вероятно, M15E-1 и M15E-2 могут отличаться посттрансляционной модификацией, которая отражается на поверхностном заряде и приводит к разделению в процессе ионообменной хроматографии.

Существование бактериолитических ферментативных свойств у одного из интерлейкинов (M15E-1 и M15E-2) является особенно интересным фактом. Можно предположить, что некоторые бактериолитические ферменты могут выполнять дополнительную функцию цитокинов, так как подобные факторы помимо своей прямой ферментативной функции вполне могут быть одновременно и белками регуляторами в иммунной и эндокринной системах. О наличии бактериолитической активности у интерлейкина-2 ранее не было известно [211].

Наличие бактериолитической активности у интерлейкина-2 является особенно интересным фактом. Интерлейкин-2 является ключевым регуляторным фактором в иммунном ответе, но о его дополнительной

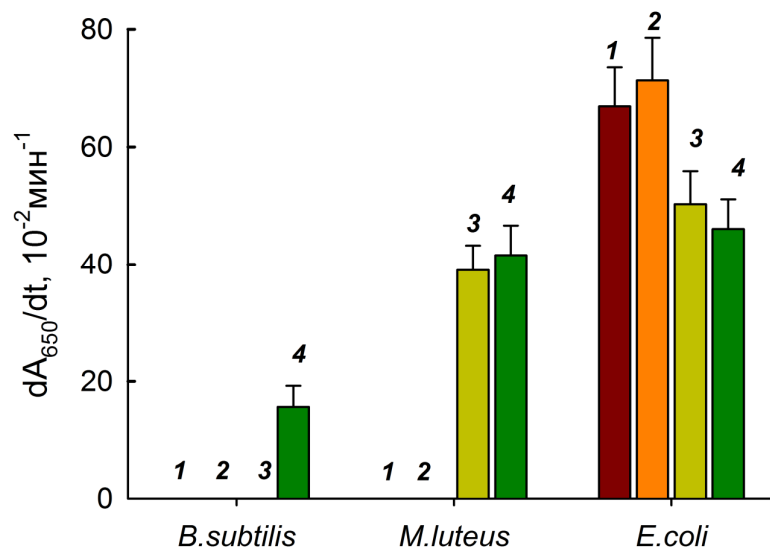


Рисунок 4-4. Субстратная специфичность ферментов по отношению к субстратам *Escherichia coli* и *Micrococcus luteus* и *Bacillus subtilis*. 1, — M15E-1, 2 — M15E-2, 3 — M34EM, 4 — куриный яичный лизоцим. При определении активности использовалась суспензия клеток с A650, равным 0.4, в 20 мМ Трис-НСl буфере, рН 8.8, для *E. coli* и при рН 8.2 и 7.7 для *B. subtilis* и *M. luteus* соответственно. рН буфера соответствует оптимуму для каждого случая. Концентрация ферментов при определении активности составляла 0.4 мкг/мл.

ферментативной функции до сих пор не было известно. Бактериолитическая активность интерлейкина-2 также была нами подтверждена для генно-инженерного препарата интерлейкина-2 человека (Ронколейкина). Препараты рекомбинантного интерлейкина-2 в настоящее время применяется при лечении рака и сепсиса [134-138].

В литературе предсказано, что рассматриваемый компонент системы комплемента С2 (фактор М34-ЕМ) может быть протеазой серинового типа, так как имеет в своём составе структуры, похожие на активный центр

сериновых протеаз [147, 210]. Можно предположить, что данный фактор как эндопротеаза гидролизует амидные связи в поперечных олигопептидных сшивках пептидогликана клеточной стенки бактерий.

Таким образом, в работе обнаружены новые бактериолитические факторы, которые помимо непосредственно ферментативных свойств, вероятно, обладают также регуляторными функциями в иммунной системе.

5.4.3. Серотрансферрин.

Использованы данные из списка публикаций [Т1].

В работе была исследована плазма крови человека на предмет наличия бактериолитических ферментов. Из человеческой плазмы крови нам не удалось выделить препараты интерлейкина-2 и компонента системы комплемент С2 в количествах, достаточных для полноценного исследования. Вероятно, эти факторы у человека в плазме крови присутствуют в более низкой концентрации в сравнении с плазмой барана либо они находятся в комплексах с другими белками, что затрудняет измерение их активности. Однако в плазме крови человека была обнаружена белковая фракция с молекулярным весом от 60 до 80 кДа, которая проявляла бактериолитическую активность как в отношении *E. coli*, так и *M. luteus*. В результате нескольких стадий эксклюзионной и ионообменной хроматографии активный белок был получен в гомогенном виде по данным SDS-электрофореза. Трипсинолиз выделенного белка с последующим масс-спектрометрическим анализом позволил нам идентифицировать этот белок как серотрансферрин [212].

Очищенный серотрансферрин демонстрирует бактериолитическую активность в отношении клеток *E.coli*, *M. luteus*, *Bacillus subtilis* и *Bacillus megaterium* (рисунок 4-5). Зависимость бактериолитической активности

серотрансферрина от рН на клетках *E.coli* характеризуется узким максимумом при рН 8.7-8.9. Для других использованных в работе бактерий рН-зависимости характеризуются более широкими оптимумами (рН 8.4-8.8 для *M. luteus* и 7.8-8.2 для *B. subtilis* и *B. megaterium*). При оптимальных значениях рН скорость лизиса клеток *E. coli* серотрансферрином была в 4.5 раза выше, чем скорости лизиса клеток *M. luteus* и *B. subtilis*, и в 3 раза выше, чем у *B. megaterium*. Чувствительность различных бактерий к действию серотрансферрина отличается от чувствительности лизоцима. В присутствии лизоцима яичного белка скорость лизиса клеток *E. coli* в 1,3 раза выше, чем скорость лизиса клеток *M. luteus* в тех же условиях, а также соответственно в 5,2 раза выше, чем у *B. subtilis*.

Наличие бактериолитической активности серотрансферрина было нами подтверждено также для коммерческих препаратов серотрансферрина лошади и генноинженерного серотрансферрина человека. Также было выяснено, что активность серотрансферрина максимальна в отсутствии ионов железа. Серотрансферрин со связанными ионами железа практически не проявляет бактериолитической активности. По литературным данным ранее не было известно о наличии у серотрансферрина бактериолитической активности [213]. Было известно, что серотрансферрин подавляет рост бактерий, однако это явление связывали только с прочным связыванием ионов железа этим белком, что должно приводить к дефициту данного микроэлемента для бактерий.

Таким образом, в настоящей работе была впервые обнаружена бактериолитическая активность серотрансферрина (способность вызывать бактериальный лизис). Открытие бактериолитической активности серотрансферрина в плазме крови расширяет горизонты понимания его иммунной роли и раскрывает возможные механизмы естественной устойчивости к инфекционным заболеваниям. Тщательное исследование

бактериолитической функции серотрансферрина может быть полезным при разработке лекарств для борьбы с устойчивыми к антибиотикам патогенными микроорганизмами.

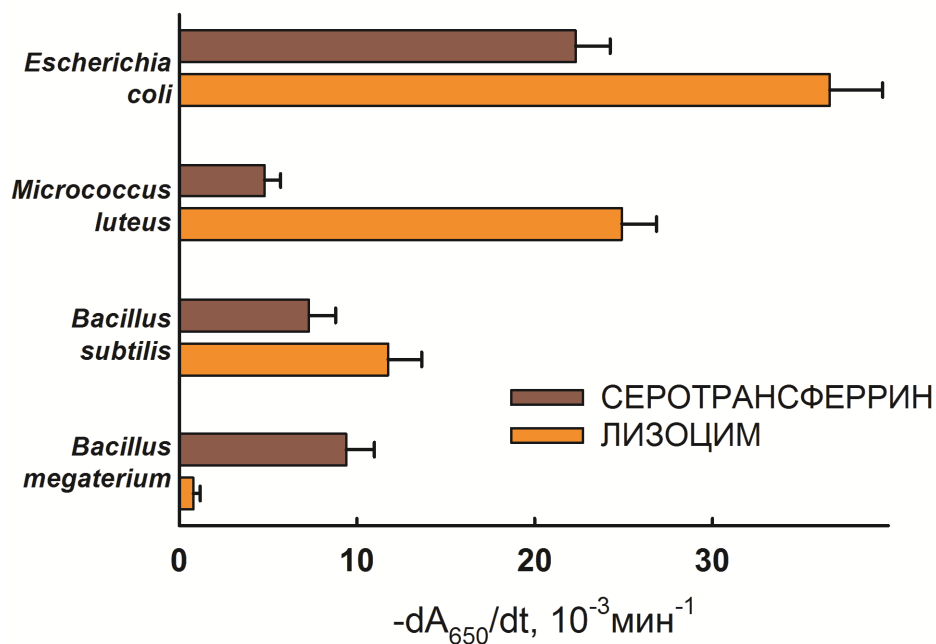


Рисунок 4-5. Субстратная специфичность серотрансферрина (5 мкг/мл) и лизоцима (0,3 мкг/мл) по отношению к бактериям *E. coli* (музейный штамм JM109), *M. luteus* (лиофилизированный препарат Sigma-Aldrich), *B. subtilis* (музейный штамм КМ МГУ 2), *B. megaterium* (музейный штамм КМ МГУ 17)

5.5. Специфичность действия бактериолитических ферментов в отношении различных субстратов – бактериальных клеток.

Сравнение действия куриного яичного лизоцима и интерлейкина-2 человека, общие закономерности и различия.

Использованы данные из списка публикаций по работе [С8].

Имея новый методический подход, позволяющий корректно измерять активность бактериолитических ферментов мы сравнили активность лизоцима и интерлейкина-2 на широкой панели субстратов живых клеток. До этой работы сведения об активности лизоцима на разных клетках были крайне ограничены, а про бактериолитическую активность интерлейкина-2 вообще ничего не было известно.

Мы провели сравнение бактериолитической активности лизоцима и интерлейкина-2 (рекомбинантный препарат человеческого белка «Ронколейкин») на различных бактериях. В работе исследовали штаммы микроорганизмов, любезно предоставленные Первым МГМУ имени И. М. Сеченова, выделенные из клинического материала (моча, мокрота, кал, раневое отделяемое и т.д.). Также работе исследовали штаммы микроорганизмов из музейной коллекции кафедры микробиологии МГУ имени М. В. Ломоносова (обозначены как КМ МГУ). В работе также использован препарат лиофилизированных бифидобактерий *Bifidobacterium bifidum* («Микроген», Россия). Препарат клеток *Thermus aquaticus* был любезно предоставлен А. А. Белогуровым. Для сравнения мы также исследовали лизис бактериальных клеток в присутствии ПАВ - додецилсульфата натрия, который может входить в состав отдельных медицинских препаратов.

В таблице 5-1 приведены данные по действию лизоцима и интерлейкина-2 на клетки 37 штаммов 34 различных видов бактерий. 12 видов бактерий лизировались в присутствии лизоцима, 16 видов

лизировались в присутствии ДСН. Только 6 видов лизировались в присутствии интерлейкина-2: *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus cereus*, два штамма *Bacillus megaterium*, *Enterobacter aerogenes* и *Serratia marcescens*. На *B. mycoides* и *L. acidophilus* действует и лизоцим, и интерлейкин-2, и ДСН. На *S. marcescens*, *B. cereus* и *B. megaterium* действуют и лизоцим и интерлейкин-2, однако не действует ДСН. На *E. aerogenes* же действует только интерлейкин-2. В целом спектры действия лизоцима и интерлейкина-2 на различные микроорганизмы хоть и имеют пересечение, но не совпадают. Можно предположить, что механизм действия и интерлейкина-2 и лизоцима различен.

рН-зависимости для скоростей лизиса клеток в присутствии лизоцима и интерлейкина-2 представлены на рисунках 5-1 и 5-2. Интересен факт, что для *B. megaterium* рН-оптимумы активности интерлейкина-2 и лизоцима имеют одинаковое значение 8.7. Также близки по значениям рН оптимумы активности лизоцима и интерлейкина-2 для *L. acidophilus*, соответственно 6.5-7.0 и 6.7-7.3. Оптимумы активности интерлейкина-2 и лизоцима и близки и в случае *B. mycoides* и *B. cereus* (на рисунке эти зависимости не приведены, так как они аналогичны таковым для *B. megaterium*). Схожее смещение оптимумов активности, зависящее от выбора бактерий, также наблюдалось для *E. coli* и *L. plantarum* (раздел 5.2).

На рисунке 5-3 приведены рН-зависимости скорости лизиса бактерий в присутствии ДСН. Показаны данные только для 5 из 16 чувствительных к действию ДСН микроорганизмов. Для остальных 11 бактерий, которые чувствительны к действию к ДСН, зависимости имеют аналогичный вид. Просматривается общая тенденция, что в присутствии ДСН бактерии лизируются в щелочной среде. Действие ДСН обнаруживается при рН выше значений 7.5-8.0, что возможно связано с

Таблица 5-1. Лизис бактерий в присутствии интерлейкина-2, лизоцима и ДСН.

№	Микроорганизм	Скорость лизиса в присутствии добавки		
		Лизоцим	Интерлейкин-2	ДСН
1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	0	0
2	<i>Alcaligenes faecalis</i> КМ МГУ 82	3.2/2.0/6.4	0	1.1/100/8.0
3	<i>Bacillus megaterium</i>	5.2/0.8/8.7	6.1/15/8.7	0
4	<i>Bacillus megaterium</i> КМ МГУ 17	2.2/2.0/8.5	2.6/30/8.5	0
5	<i>Bacillus mycoides</i> КМ МГУ 31	4.5/4.0/8.0	3.6/10/8.0	0.7/100/8.0
6	<i>Bacillus cereus</i> КМ МГУ 9	4.5/4.0/8.5	0.9/30/8.5	0
7	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	0	0	0
8	<i>Citrobacter braakii</i>	0	0	0
9	<i>Clostridium butiricum</i> КМ МГУ 19	0	0	2.5/400/8.0
10	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	0	0	0
11	<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	7.8/2.0/6.4	0
12	<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	0.9/200/8.0
13	<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	1.9/50/8.0
14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	0
15	<i>Lactobacillus acidophilus</i> КМ МГУ 146	3.2/0.8/7.0	2.9/5.0/7.0	2.4/50/8.0
16	<i>Lactobacillus casei</i> КМ МГУ 153	0	0	0
17	<i>Lactococcus lactis</i> КМ МГУ 165	0	0	0
18	<i>Morganella morganii</i>	0	0	2.0/40/8.0
19	<i>Neisseria perflava</i>	0	0	0
20	<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	2.9/50/8.0
21	<i>Proteus vulgaris</i>	3.6/2.0/8.7	0	2.2/60/8.0
22	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4.2/0.2/8.7	0	5.8/50/8.0
23	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> КМ МГУ 47	7.3/0.4/7.7	0	1.1/100/8.0
24	<i>Pseudomonas fluorescens</i> КМ МГУ 71	3.5/0.5/8.4	0	0
25	<i>Pseudomonas putida</i>	0	0	2.5/200/8.0
26	<i>Rothia mucilaginosa</i>	0	0	0
27	<i>Serratia marcescens</i> КМ МГУ 208	3.7/0.2/8.4	4.7/30/8.0	0
28	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	6.2/50/8.0
29	<i>Staphylococcus aureus</i> КМ МГУ 144	1.6/1.0/7.7	0	0
30	<i>Staphylococcus capitis</i>	0	0	0
31	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0
32	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1.4/0.4/8.7	0	4.9/20/8.0
33	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	0	0	0
34	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	0	3.3/150/8.0
35	<i>Streptococcus agalactiae</i>	4.6/5.0/7.0	0	4.1/50/8.0
36	<i>Streptococcus pyogenes</i>	0	0	0
37	<i>Thermus aquaticus</i>	0	0	3.6/125/8.0

Значения скоростей лизиса даны в виде "скорость лизиса, ед.погл., $10^{-3} \cdot \text{мин}^{-1}$ " / "концентрация добавки, мкг·мл⁻¹" / "рН измерения (оптимум)". Нули означают, что вплоть до концентраций 5 мкг/мл лизоцима, 50 мкг/мл интерлейкина-2, 0.5 мг/мл ДСН не наблюдалось изменения поглощения в течение 3 мин.

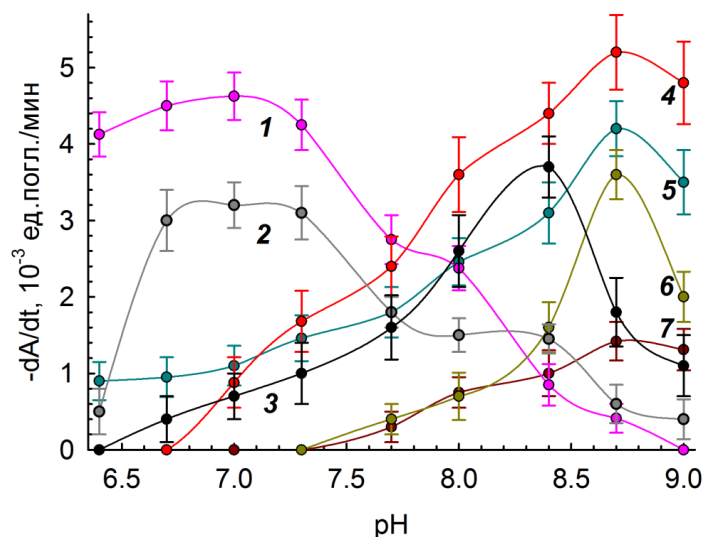


Рисунок 5-1. Зависимость скорости лизиса клеток от рН в присутствии лизоцима. **1** *Streptococcus agalactiae*, лизоцим 5.0 мкг/мл. **2** *Lactobacillus acidophilus* КМ МГУ 146, лизоцим 0.8 мкг/мл. **3** *Serratia marcescens* КМ МГУ 208, лизоцим 0.2 мкг/мл. **4** *Bacillus megaterium*, лизоцим 0.8 мкг/мл. **5** *Pseudomonas aeruginosa*, лизоцим 0.2 мкг/мл. **6** *Proteus vulgaris*, лизоцим 2 мкг/мл. **7** *Staphylococcus haemolyticus*, лизоцим 0.4 мкг/мл.

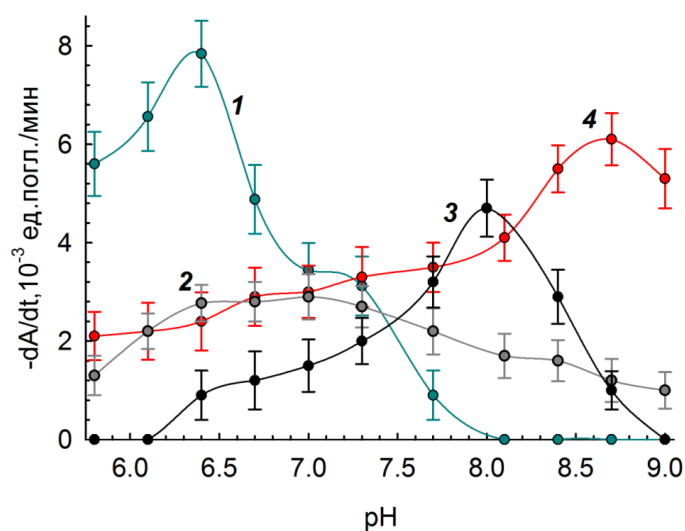


Рисунок 5-2. Зависимость скорости лизиса клеток от рН в присутствии интерлейкина-2. **1** *Enterobacter aerogenes*, интерлейкин-2 2.0 мкг/мл. **2** *Lactobacillus acidophilus* КМ МГУ 146, интерлейкин-2 5.0 мкг/мл. **3** *Serratia marcescens* КМ МГУ 208, интерлейкин-2 30 мкг/мл. **4** *Bacillus megaterium*, интерлейкин-2 15 мкг/мл.

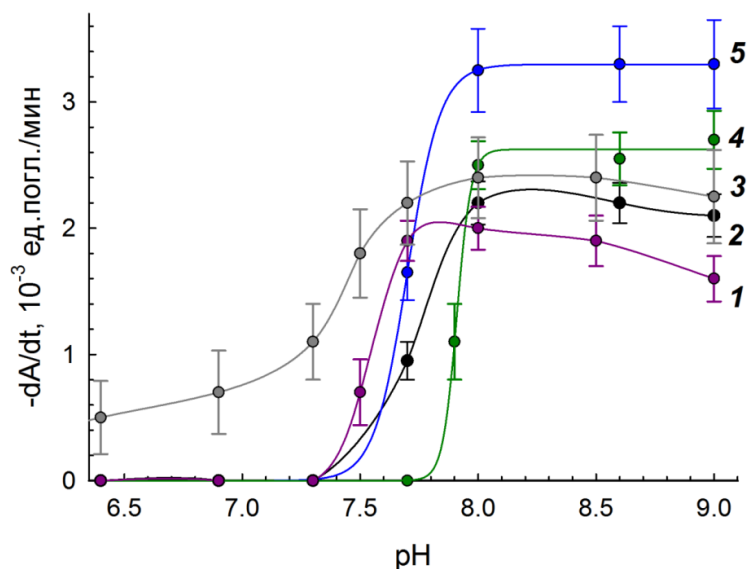


Рисунок 5-3. Зависимость скорости лизиса клеток от рН в присутствии ДСН. 1 *Morganella morganii*, ДСН 40 мкг/мл. 2 *Proteus vulgaris*, ДСН 60 мкг/мл. 3 *Lactobacillus acidophilus* КМ МГУ 146, ДСН 50 мкг/мл. 4 *Pseudomonas putida*, ДСН 0.2 мг/мл. 5 *Stenotrophomonas maltophilia* ДСН 0.15 мг/мл.

диапазоном значений рК фосфатных групп фосфолипидов клеточных мембран.

Таким образом, видим, что интерлейкин-2 действует на некоторые бактерии семейства Enterobacteriaceae, к которым принадлежат *E. aerogenes* и *S. marcescens* (из данного сравнения) и *E. coli* (по информации из разделов 5.2 и 5.6). Также интерлейкин-2 действует на некоторые бактерии семейства Lactobacillaceae, к которым относится *L. acidophilus* и *L. plantarum* (из раздела 5.2). Кроме того интерлейкин-2 действует на микроорганизмы *B. megaterium*, *B. mycoides* и *B. cereus* которые принадлежат семейству Bacillaceae, которое отличается по составу и строению клеточной стенки от представителей и семейства Lactobacillaceae и семейства Enterobacteriaceae. Логично предположить,

что у *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *E. coli*, *E. aerogenes*, *S. Marcescens*, *B. mycooides*, *B. megaterium* и *B. cereus* всё же есть похожие особенности строения клеточной стенки. По литературным данным известно, что у *L. plantarum*, *B. megaterium* и *B. cereus* в составе клеточной стенки имеется диаминопимелиновая кислота [214-217], присутствие которой также характерно для бактерий семейства Enterobacteriaceae [217, 218]. Для *L. acidophilus* не показано наличие значительного количества диаминопимелиновой кислоты в составе клеточной стенки [219], однако, можем всё-таки предположить её наличие у отдельных штаммов этого микроорганизма по аналогии с *L. plantarum*. Отсутствуют точные данные о присутствии диаминопимелиновой кислоты у *B. mycooides*, однако данный микроорганизм может быть схож в строении с *B. megaterium* и *B. cereus*, у которых диаминопимелиновая кислота присутствует в структуре клеточной стенки. Наличие общих структур в клеточной стенке, содержащих в себе диаминопимелиновую кислоту, может объяснять сходства в восприимчивости к интерлейкину-2 у таких неродственных микроорганизмов. Как мы помним по предыдущему разделу, интерлейкин-2 не лизирует *B. subtilis*, который также входит в семейство Bacillaceae. В литературе имеется информация, что, в отличие от других представителей этого семейства, у *B. subtilis* диаминопимелиновая кислота представлена амидированной формой [220]. Поэтому отсутствие бактериолитического действия интерлейкина-2 по отношению *B. subtilis* по сути подтверждает нашу гипотезу о роли диаминопимелиновой кислоты. В целом, на данном этапе исследования преждевременно делать точные выводы относительно того, какие типы микроорганизмов чувствительны к интерлейкину-2. Кроме того, чувствительность к бактериолитическим агентам может также меняться в зависимости от наличия и состава капсулы у бактерии, что может различаться даже у разных штаммов одного и того же вида микроорганизма [221]. Ко всему прочему, на сегодняшний день даже для

давно изучаемого лизоцима продолжаются научные дискуссии относительно вариантов его действия на различные микроорганизмы. Существуют основания полагать, что лизоцим может действовать на бактериальные клетки не только как фермент, но и как антибактериальный катионный белок [222]. В результате данной работы, по крайней мере, прояснился некий спектр микроорганизмов, чувствительных к интерлейкину-2, что поможет последующим исследованиям молекулярных механизмов восприимчивости или невосприимчивости микроорганизмов к данному бактериолитическому фактору.

Можно предположить, что у интерлейкина-2 активный центр по аналогии с лизоцимом имеет также участвующие в катализе экспонированные снаружи белковой глобулы карбоксильные группы. У лизоцима в активном центра участвующие в катализе Glu35 и Asp52 расположены так, что расстояние между карбоксильными кислородами боковых радикалов этих аминокислотных остатков расположены на расстоянии около 6Å (рисунок 5-4) в среднем с небольшими вариациями в зависимости от вращения групп [223-226]. Рядом с карбоксильными группами располагается полость (углубление) для специфического связывания субстрата.

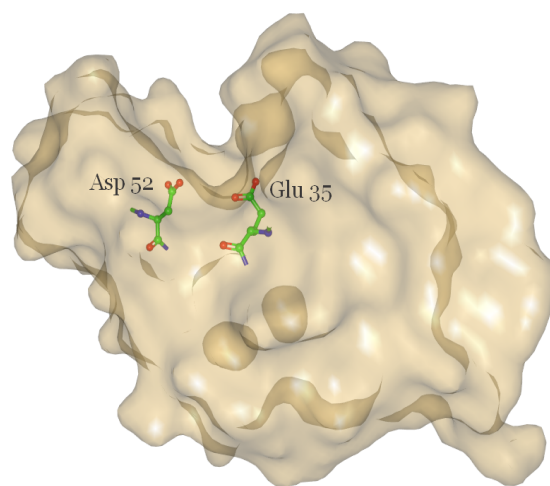


Рисунок 5-4. Структура лизоцима. Взаимное расположение карбоксильных групп в активном центре.

Нами был проведён анализ расстояний и взаимной ориентации карбоксильных групп 12 остатков глутаминовой и 3 остатков аспарагиновой кислот с структуре интелейкина-2 [227, 228] в сравнении с лизоцимом. Автор благодарит Федорчука В.В. за помощь в анализе структур. Все возможные пары аминокислотных остатков, которые могут являться основной частью каталитического центра были отсортированы по минимальному расстоянию между кислородами экспонированных карбоксильных групп (таблица 5-2). Рассмотрим подробнее 5 пар аминокислотных остатков, в которых расстояния между карбоксильными группами минимальны (не превышают 8.2 Å, рисунок 5-5). Аминокислотные остатки Glu 61 и Glu 62 (расстояние 6.1Å) расположены с разных сторон от небольшой канавки на поверхности белковой глобулы и, вероятно, потенциально могут являться остатками активного центра. Пара аминокислотных остатков Glu 60 и Glu 61 (расстояние 6.2Å) расположена на поверхности фермента, но, несмотря на небольшое расстояние между карбоксильными группами этих остатков, ориентированы они весьма не оптимально. Боковые радикалы остатков Asp 109 и Glu 110 (расстояние 7.3Å) экспонированы в раствор, но развёрнуты в разные стороны друг от друга. Аминокислотные остатки Glu 67 и Glu 68 (расстояние 7.3Å), как и первая из рассмотренных пар, расположены по разные стороны от углубления на поверхности белка и ориентированы навстречу друг другу. Карбоксильные группы аминокислотных остатков Glu 67 и Asp 84 (расстояние 8.2Å) расположены на поверхности глобулы, но по разные стороны от “выступа на поверхности”. На наш взгляд, наиболее вероятная пара аминокислотных остатков, которые могут входить в активный центр, - это Glu 61 и Glu 62.

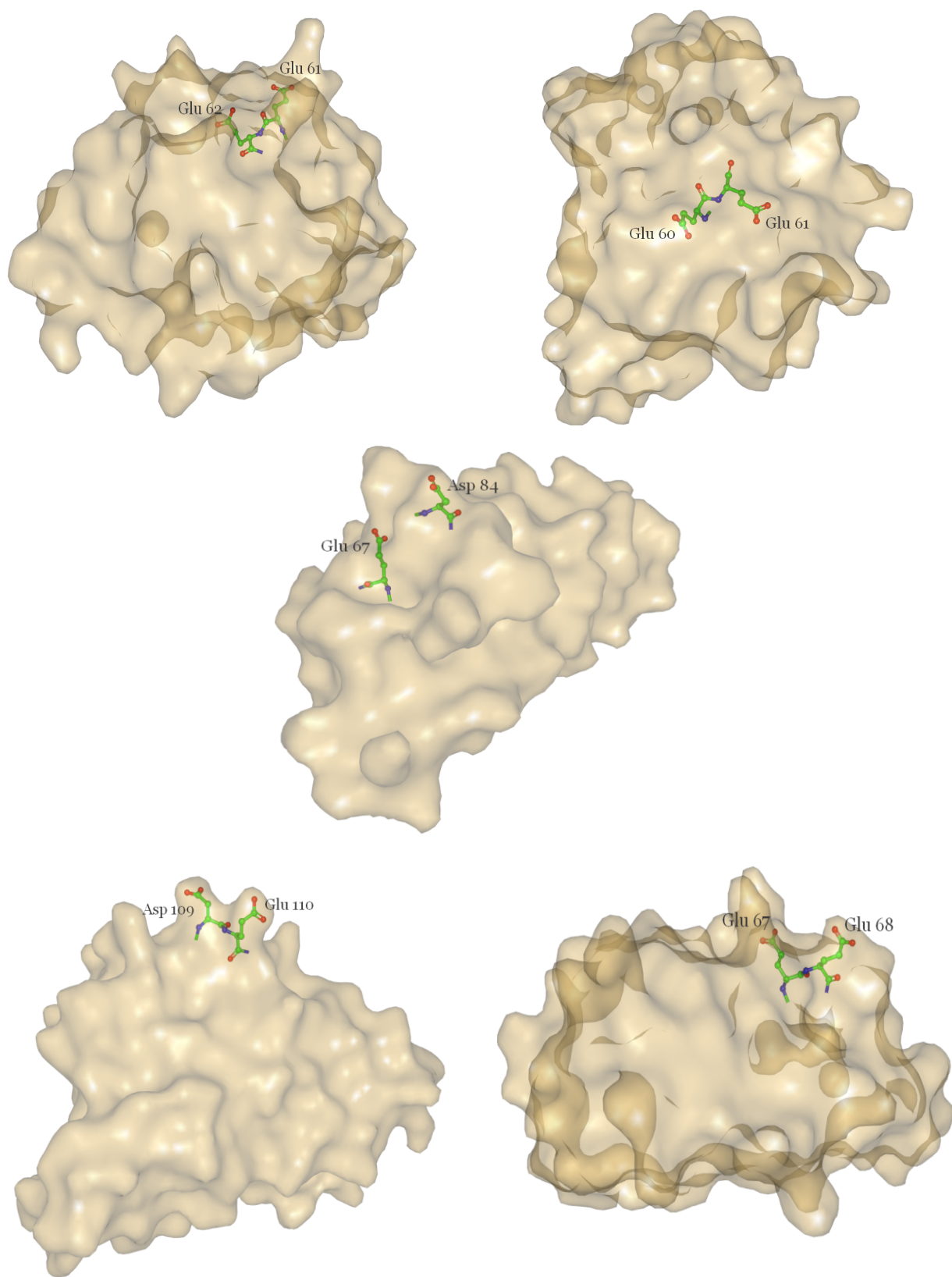


Рисунок 5-5. Структура интерлейкина-2 с потенциальными локализациями активного центра.

Таблица 5-2. Пары аминокислотных остатков в структуре интерлейкина-2, содержащих экспонированные наружу карбоксильные группы.

№	Пары аминокислотных остатков	Расстояние между кислородами соседних карбоксильных групп
1	Glu 61, Glu 62	6.1Å
2	Glu 60, Glu 61	6.2Å
3	Asp 109, Glu 110	7.3Å
4	Glu 67, Glu 68	7.3Å
5	Glu 67, Asp 84	8.2Å
6	Glu 110, Glu 116	8.3Å
7	Glu 106, Asp 109	8.6Å
8	Asp 20, Glu 95	10.7Å
9	Glu 62, Glu 60	11.0Å
10	Glu 62, Glu 116	11.4Å
11	Glu 61, Glu 106	11.6Å
12	Asp 20, Asp 84	11.6Å
13	Glu 15, Asp 20	11.7Å
14	Glu 60, Glu 67	11.8Å

5.6. Влияние низкомолекулярных эффекторов на активность бактериолитических ферментов. Сравнение скоростей лизиса клеток *E. coli* куриным яичным лизоцимом и интерлейкином-2 человека в присутствии различных веществ (биогенных аминов, аминокислот, пептидных антибиотиков, милдроната).

Использованы данные из списка публикаций автора [С7].

Новые, разработанные нами подходы позволяют аккуратно и корректно измерить бактериолитическую активность фермента на живых бактериальных клетках, соответственно есть вероятность, что мы можем обнаружить эффекты, которые не были известны ранее по причине отсутствия системных исследований и точных корректных измерений.

Мы сравнили влияние на активность лизоцима и интерлейкина-2 различных веществ, которые в реальных условиях могут с высокой вероятностью присутствовать в медицинских препаратах или в биологических жидкостях или сами или в виде аналогов. Нашим выбором стали аминокислоты, биогенные амины, пептидные антибиотики, милдронат и ЭДТА. Для данного исследования мы взяли клетки *E. coli*, по отношению к которым проявляет бактериолитическую активность как лизоцим так и интерлейкин-2. Понимание особенностей влияния добавок может с одной стороны помочь понять различия механизмах действия лизоцима и интерлейкина-2, с другой стороны эта информация расширяет возможности разработки новых лекарственных средств.

Активность лизоцима и интерлейкина-2 при разных концентрациях глицина, лизина, аргинина и глутамата представлена на рисунке 6-1. Для аспартата график не приведён, так как характер его влияния и на лизоцим, и на интерлейкин-2 схож с глутаматом. Как видим, активность лизоцима в присутствии глицина кардинально изменяется, достигая максимума при концентрации 1-2 мМ эффектора. Также лизин существенно влияет на

активность лизоцима с максимальным эффектом при концентрации 15–18 мМ добавки. На активность интерлейкина-2 ни глицин, ни лизин не влияют. Таким образом, мы видим, что лизоцим и интерлейкин-2 ведут себя в присутствии этих двух аминокислот по-разному, что, возможно, связано с различиями в механизме их действия ферментов и возможности стабилизации данными добавками переходного состояния в активном центре лизоцима. Ранее эффект активации бактериолитической активности лизоцима в присутствии глицина не был известен. В литературе имеется информация о том, что глицин обладает бактериостатическим действием и может улучшать эффективность действия различных неферментативных антимикробных препаратов [229].

Из рисунка далее мы видим, что аргинин сходным образом влияет на бактериолитическую активность и лизоцима и интерлейкина-2. Скорость лизиса клеток бактерий обоими бактериолитическими факторами существенно возрастает при концентрации аргинина 10 мМ и выше, демонстрируя «зависимость с насыщением». На наш взгляд, действие аргинина может объясняться влиянием как на фермент, так и на клетки. Известно, что аргинин повышает эффективность действия фармацевтических препаратов на основе лизоцима, препятствуя его агрегации [230].

На том же рисунке видим, что действие и лизоцима и интерлейкина-2 усиливается в присутствии глутамата. Мы наблюдаем зависимость «с насыщением» с увеличением скорости лизиса клеток в 2 и 3 раза соответственно для интерлейкина-2 и лизоцима при достижении концентрации глутамата 15 мМ. Эффект усиления скорости лизиса бактериальных клеток в присутствии глутамата может объясняться тем, что данная аминокислота образует комплекс с положительно заряженными группами на поверхности ферментов, предотвращая

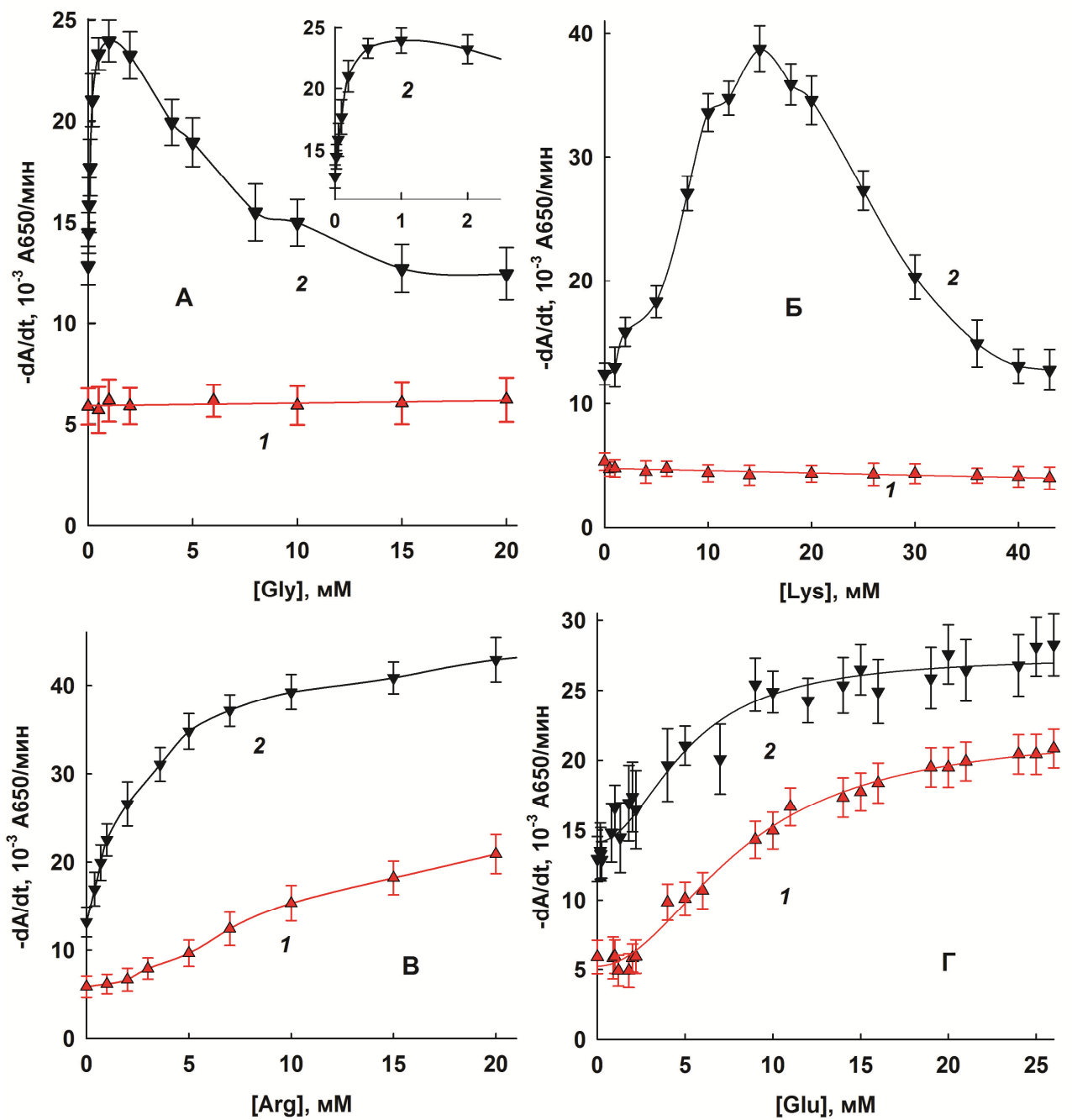


Рисунок 6-1. Зависимость активности интерлейкина-2 (1) и лизоцима (2) от концентрации добавок глицина (А), лизина (Б), аргинина (В), глутамата (Г). 37°C, 10 мМ MES-Трис-ацетат, рН 8.8 и рН 8.5 для интерлейкина-2 и лизоцима соответственно.

непродуктивную сорбцию ферментов на клетках, которая может существенно изменять эффективные значения параметров бактериолитической активности (раздел 5.3).

Активность интерлейкина-2 и лизоцима на бактериальных клетках в присутствии ароматических аминокислот представлена на рисунке 6-2. Ввиду низкой водорастворимости тирозина, мы ограничились его концентрацией 0.6 мМ. Несколько снижают активность лизоцима триптофан и фенилаланин. Тирозин практически не влияет на активность лизоцима. Триптофан и фенилаланин также не влияют на активность интерлейкина-2. Зависимость бактериолитической активности интерлейкина-2 от концентрации тирозина демонстрирует кривую с небольшим максимумом. Активность интерлейкина-2 увеличивается на треть от исходной при концентрации тирозина 0.3 мМ. В целом, можно сказать, что на активность интерлейкина-2 и лизоцима ароматические аминокислоты влияют очень незначительно, эффекты практически не выходят за погрешность измерений.

Бактериолитическая активность лизоцима и интерлейкина-2 в присутствии триптамина и тирамина представлена на рисунке 6-3. По сути, триптамин и тирамин являются производными триптофана и тирозина. Однако, в отличие от ситуации с ароматическими аминокислотами, которые практически не влияли на активность, мы здесь видим совершенно иную картину. Лизоцим ингибируется и триптамином, и тирамином. Интерлейкин-2, напротив, активизируется обоими биогенными ароматическими аминами. Можем предположить, что триптамин и тирамин связываются гидрофобными областями на поверхности интерлейкина-2 и таким образом препятствуют его непродуктивной сорбции на бактериях. У интерлейкина-2 по информации из литературы имеются гидрофобные области на поверхности молекулы белка, с которыми могут связываться различные гидрофобные лиганды [231].

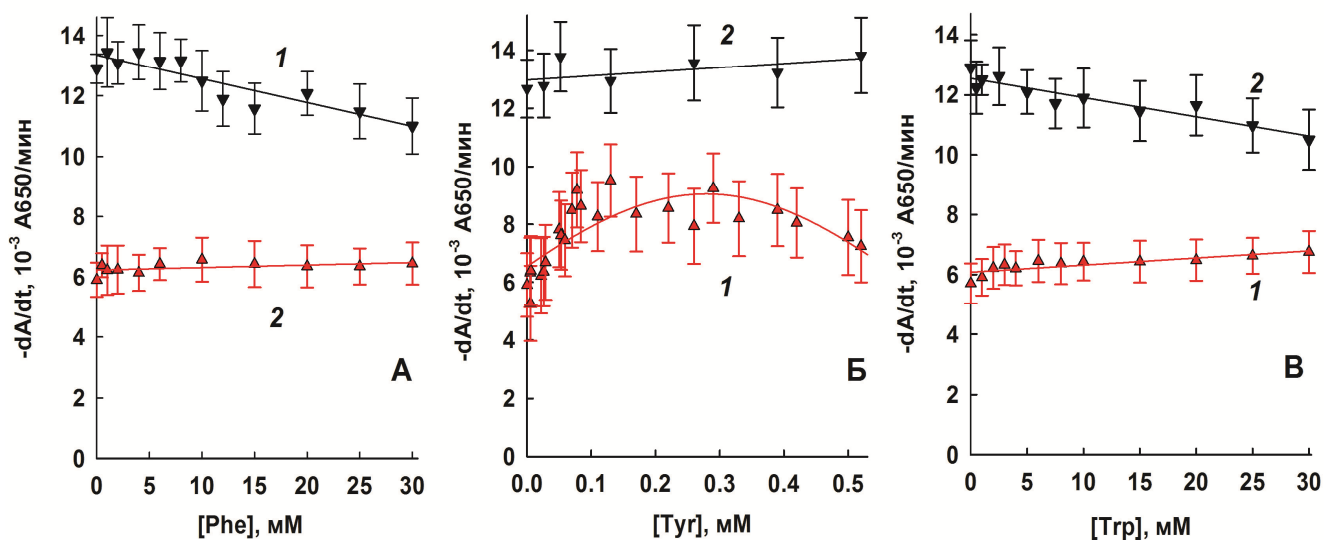


Рисунок 6-2. Зависимость активности интерлейкина-2 (1) и лизоцима (2) от концентрации добавок фенилаланина (А), тирозина (Б), триптофана (В). 37°C, 10 мМ MES-Трис-ацетат, рН 8.8 и рН 8.5 для интерлейкина-2 и лизоцима соответственно.

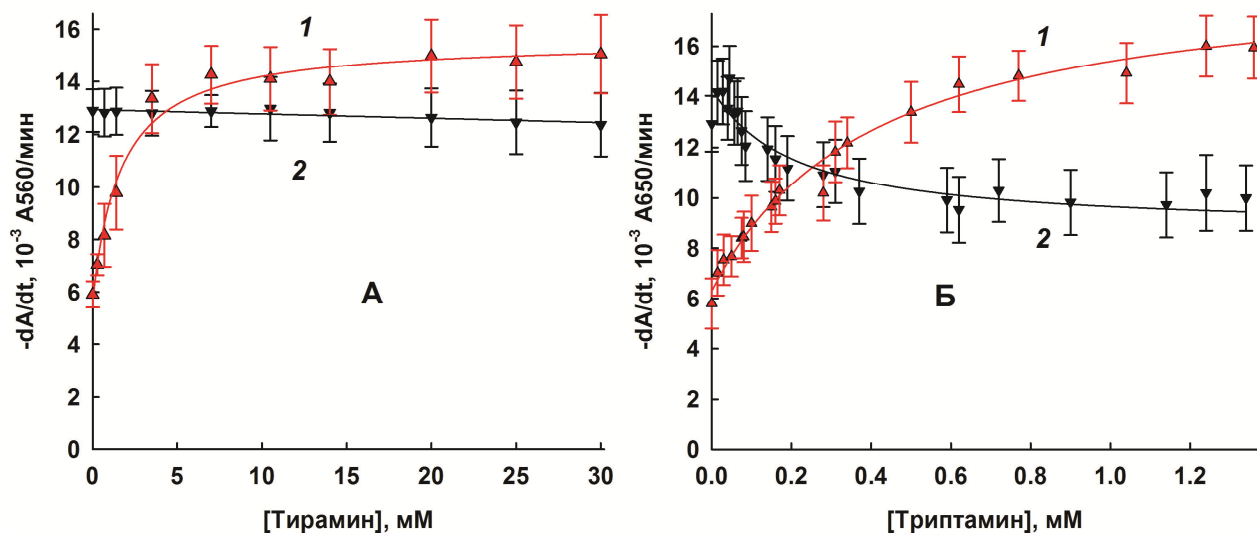


Рисунок 6-3. Зависимость активности интерлейкина-2 (1) и лизоцима (2) от концентрации добавок тирамина (А), триптамина (Б). 37°C, 10 мМ MES-Трис-ацетат, рН 8.8 и рН 8.5 для интерлейкина-2 и лизоцима соответственно.

На рисунке 6-4 приведены данные по бактериолитической активности лизоцима и интерлейкина-2 на клетках *E.coli* в присутствии пептидных антибиотиков бацитрацина и полимиксина-Б. Добавки бацитрацина и полимиксина-Б дают схожую картину влияния на бактериолитическую активность лизоцима и интерлейкина-2 с колоколообразной кривой зависимости с максимумом при концентрации антибиотиков 5–7 мкМ. Лизис бактерий в присутствии данных антибиотиков без интерлейкина-2 и лизоцима не наблюдается. Возможно, что антибиотик делает бактериальные клетки их более чувствительными к действию бактериолитических ферментов. Схожую картину мы наблюдали в случае пептидного антибиотика Полимиксина-М, влияющего на активность эндолизина и экзолизина бактериофага SPZ7 против клеток *S. enteritidis* (раздел 5.4.1.).

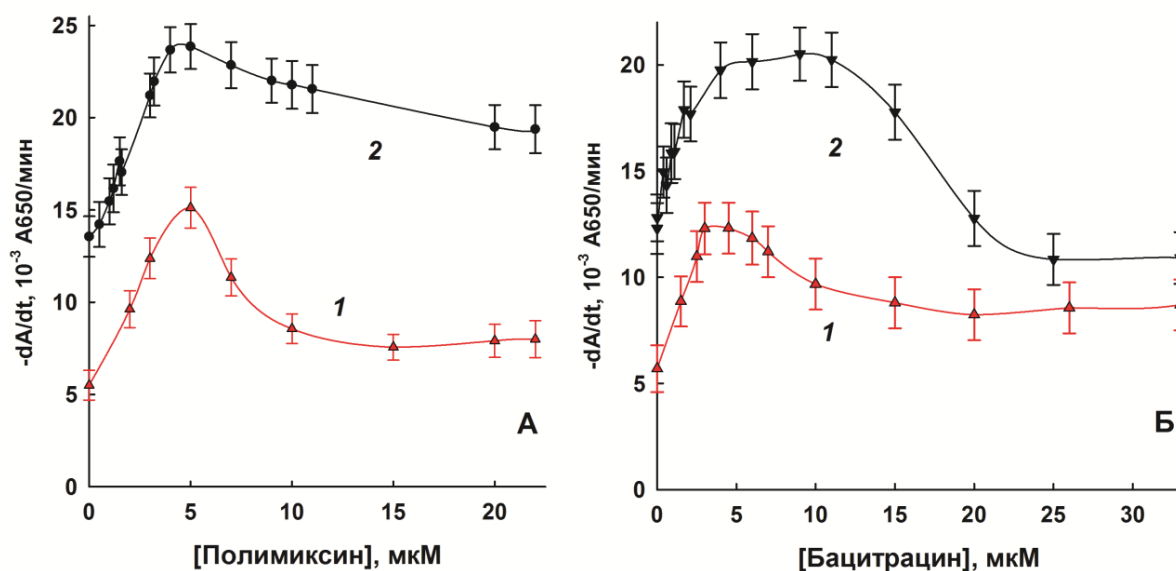


Рисунок 6-4. Зависимость активности интерлейкина-2 (1) и лизоцима (2) от концентрации полимиксина Б (А), бацитрацина (Б). 37°C, 10 мМ MES-Трис-ацетат, рН 8.8 и рН 8.5 для интерлейкина-2 и лизоцима соответственно.

Мы также исследовали влияние на бактериолитическую активность, таурина, милдроната и ЭДТА. Данные модельные соединения сами или в виде аналогов могут присутствовать в медицинских препаратах, пищевых продуктах. На рисунке 6-5 приведены данные по активности интерлейкина-2 и лизоцима на клетках *E. coli* в присутствии таурина, милдроната и ЭДТА. Как видим, активность лизоцима не изменяется в присутствии милдроната, однако для активности интерлейкина-2 мы наблюдаем зависимость от концентрации милдроната с максимумом при концентрации эффиктора 3 мМ. Для милдроната физиологическое действие объясняется сходством в структуре с различными биологически активными соединениями, например, L-карнитином и γ -бутиробетаином [232, 233]. Можно предположить, что подобные эффикторы могут связываться в организме с интерлейкином-2, меняя его свойства. Таурин практически не влияет на

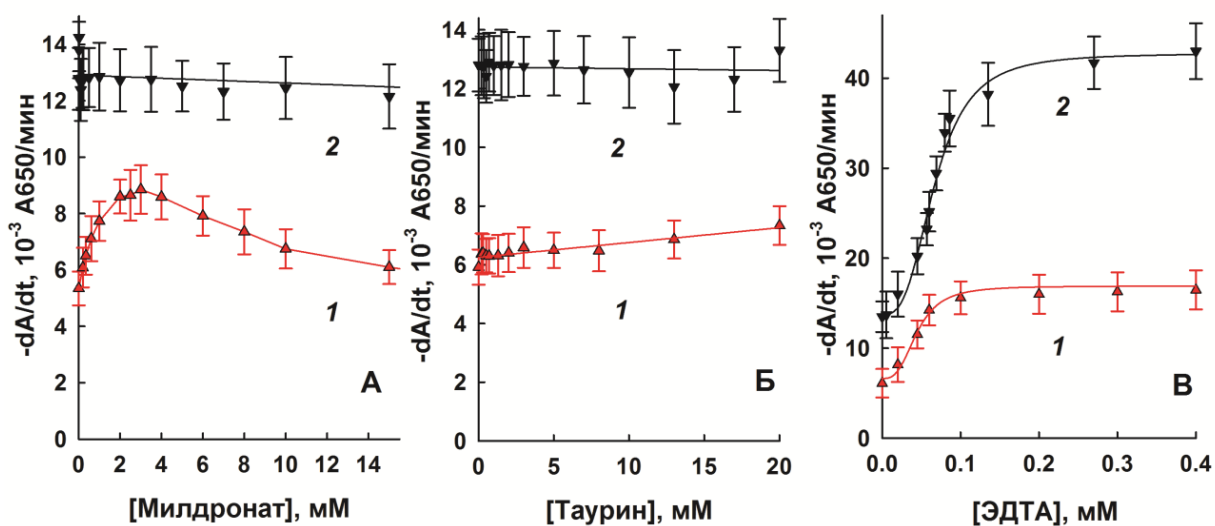


Рисунок 6-5. Зависимость активности интерлейкина-2 (1) и лизоцима (2) от концентрации милдроната (А), таурина (Б), ЭДТА (В). 37°C, 10 мМ MES-Трис-ацетат, рН 8.8 и рН 8.5 для интерлейкина-2 и лизоцима соответственно.

бактериолитическую активность интерлейкина-2 и лизоцима. Добавка ЭДТА в концентрации 0.1 мМ усиливает бактериолитическое действие лизоцима и интерлейкина-2, что можно частично объяснить связыванием Ca^+ и, соответственно, дестабилизирующим действием на клетки.

Таким образом, новые подходы в измерении бактериолитической активности позволили нам детально изучить влияние различных низкомолекулярных веществ на действие лизоцима и интерлейкина-2 на бактериальные клетки. Неожиданно для нас оказалось, что ароматические аминокислоты практически никак не влияют на активность этих двух бактериолитических факторов. В тоже время выяснилось, что такая простая аминокислота, как глицин, оказывает драматическое влияние на активность лизоцима, что ранее не было известно по литературным данным и никак не исследовалось, несмотря на долгую историю изучения лизоцима. Усиление активности лизоцима различными заряженными аминокислотами также ранее не было известно. И глицин и лизин и лизоцим являются широко распространёнными лекарственными средствами, но их совместное действие до сих пор не изучалось. Глутамат и аргинин являются и естественными компонентами продуктов питания и широко распространёнными искусственными пищевыми добавками, однако влияние их на активность лизоцима также не было изучено ранее. Влияние заряженных аминокислот на активность лизоцима наблюдалось нами для разных бактерий, но эффект мог отличаться; например, в случае *M. luteus* в сравнении с *E. coli* усиление ферментативного лизиса клеток в присутствии добавок менее выражено.

Для интерлейкина-2 ранее до данной работы вообще не было известно о его бактериолитической активности, соответственно является абсолютно новой информация о его активаторах, а именно аргинине, глутамате, аспартате, тирамине, триптаmine и милдронате. Все эти новые

данные имеют большую ценность для более глубокого понимания роли данного белка в организме. Интерлейкин-2 в настоящее время пока не применяется в медицинской практике в качестве бактериолитического фактора, так как его бактериолитические свойства ранее не были известны. Однако не исключено, что и антимикробные свойства также сыграли свою роль в ряде случаев, когда эффективность интерлейкина-2 была подтверждена. Интерлейкин-2 в настоящее время используется как в лечении сепсиса, где роль бактерий очевидна, так и в лечении рака, где роль бактерий менее очевидна на первый взгляд, однако могут иметь место сочетанные с основным заболеванием бактериальные поражения тканей [234, 235]. С точки зрения эффективности применения лекарственных средств также следует обратить пристальное внимание на влияние на действие данного белка добавок, например, мельдония, аргинина и глутамата. Сочетанное использование данных препаратов может открыть новые горизонты в лечении тяжёлых заболеваний.

5.7. Влияние ПАВ на ферментативный лизис бактериальных клеток.

Использованы данные из списка публикаций [С13] и также неопубликованные данные, полученные совместно автором и Лу ВеньЦзя.

Влияние ПАВ на ферментативный лизис бактерий представляет собой отдельную исключительно важную тему. ПАВ могут создавать окружение для фермента и субстрата (клеток), которое имитирует реальные контакты с молекулярными структурами в биологических системах. Также различные ПАВ могут быть частью препаратов медицинского назначения. На рисунке 7-1 представлена зависимость лизиса клеток *Lactobacillus plantarum* лизоцимом от pH и концентрации двух различных ПАВ, ионного додецилсульфата (ДСН) и неионного Твин-21. Несмотря на то, что ПАВ разные и картина в целом отличается, тем не менее, можно выделить некоторые общие закономерности. В случае обоих ПАВ нет смещения pH оптимума активности. В случае Твин-21 сначала активность возрастает при добавлении в систему ПАВ до концентрации порядка 150 мкМ, затем идёт снижение до некоторого приблизительно постоянного уровня «плато». В случае ДСН наблюдаем постоянство активности «плато» при малых концентрация ПАВ вплоть до 100 мкМ. Затем, после концентраций ПАВ 100-150 мкМ активность снижается и снова выходит на сравнительно постоянный уровень при больших концентрациях выше 200 мкМ, «второе плато».

Попробуем теоретически объяснить, почему зависимость активности от концентрации ПАВ может иметь такие сложные формы. Допустим, ПАВ может связываться на том или ином участке на белке, меняя свойства белка, например, каталитическую активность. Рассмотрим простую модель, где имеется некий участок связывания на белке, который можно охарактеризовать определенной усреднённой константой десорбции (K_{DI}) для данного лиганда (ПАВ). Допустим, что на этом участке белка

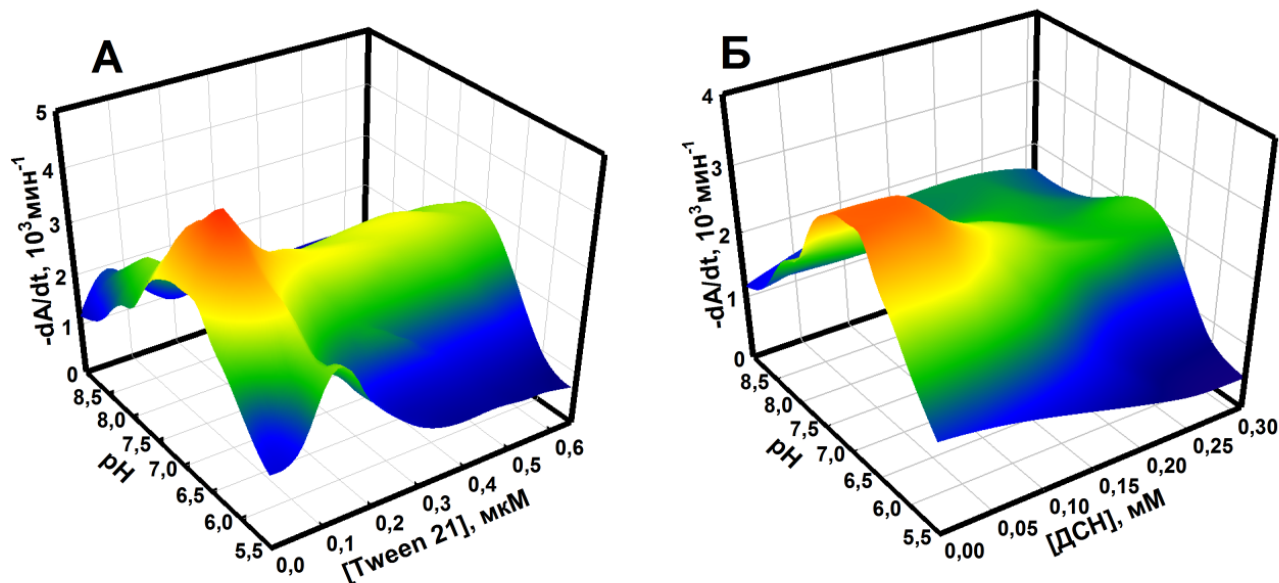


Рисунок 7-1. Трёхмерные зависимости скорости лизиса *L. plantarum* куриным яичным лизоцимом от рН и концентрации ПАВ. А – Твин 21, Б – ДСН. КОЕ = $1 \cdot 10^8$ клеток/мл. Измерения проводились при температуре 37°C в буферном растворе 10 мМ Трис-МЕС-АЦЕТАТ, концентрация лизоцима составляла $6,4 \cdot 10^{-8}$ М.

может максимально связаться n молекул лиганда ($E+nL \rightarrow EL_n$). В самом простом случае, с ферментом на этом участке может связаться только один лиганд ПАВ, $n=1$. В общем случае степень насыщения или средняя доля фермента, связанного с лигандом будет описываться функцией:

$$Q_l([\text{ПАВ}]) = \frac{[\text{ПАВ}]}{K_{D1} + [\text{ПАВ}]}, \quad (7-1)$$

где значение Q_l меняется от 0 до 1. Вывод данного уравнения аналогичен выводу уравнения Ленгмюра для изотермы адсорбции.

Допустим, что в простом случае при $n \neq 1$ активность белка линейно меняется в зависимости от степени заполнения данного контактного участка молекулами ПАВ. При $n=1$ в любом случае будет линейное изменение общей активности фермента от доли связанного с лигандом белка. Получаем выражение для величины суммарной активности:

$$A([\text{ПАВ}]) = A_0 + (A_1 - A_0) \cdot Q_1, \quad (7-2)$$

где A_0 активность фермента в отсутствие лиганда, а A_1 активность при полном заполнении участка связывания лигандом (экспериментально это должно практически достигаться при концентрации $[\text{ПАВ}] > 20 \cdot K_{D1}$). Теперь допустим, что при более высоких значениях концентрации ПАВ начинается независимое заполнение еще одного участка связывания ($\text{ELn+mL} \rightarrow \text{ELnLm}$). Если константа десорбции лиганда для второго участка связывания намного больше константы для первого участка (например, $K_{D2} > 50 \cdot K_{D1}$), то, рассуждая аналогично выше сказанному, для области концентраций ПАВ порядка величин значения K_{D2} можем записать аналогичное выражение для величины суммарной активности:

$$A([\text{ПАВ}]) = A_1 + (A_2 - A_1) \cdot Q_2, \quad (7-3)$$

где A_2 -активность после полного заполнения второго участка связывания, и соответственно

$$Q_2([\text{ПАВ}]) = \frac{[\text{ПАВ}]}{K_{D2} + [\text{ПАВ}]} \quad (7-4)$$

Полное уравнение для всего диапазона концентраций ПАВ в случае наличия двух разных участков связывания будет соответственно:

$$A([ПАВ]) = A_0 + (A_1 - A_0) \cdot Q_1 + (A_2 - A_1) \cdot Q_2 \quad (7-5)$$

или

$$A([ПАВ]) = A_0 + (A_1 - A_0) \cdot \frac{[ПАВ]}{K_{D1} + [ПАВ]} + (A_2 - A_1) \cdot \frac{[ПАВ]}{K_{D2} + [ПАВ]} \quad (7-6)$$

Чтобы проиллюстрировать возможный вид подобной зависимости построим теоретические графики активности (Рисунок 7-2). Случай №1: два участка связывания ПАВ с $K_{D1}=10^{-7}M$, $K_{D2}=10^{-5}M$, $A_0=1$ (условная единица активности), $A_1=1.5$, $A_2=1$; Случай №2: один участок связывания ПАВ с $K_{D1}=10^{-5}M$, $A_0=1.5$, $A_1=1$. Получаем соответственно:

$$1) \quad A = 1 + 0.5 \cdot \frac{[ПАВ]}{10^{-7} + [ПАВ]} - 0.5 \cdot \frac{[ПАВ]}{10^{-5} + [ПАВ]}$$

и

$$2) \quad A = 1.5 - 0.5 \cdot \frac{[ПАВ]}{10^{-5} + [ПАВ]}$$

Как видим, в случае отличия K_{D1} от K_{D2} на два порядка, области промежуточных значений активности $(A_0+A_1)/2$ и $(A_1+A_0)/2$ (полувысота перехода) приблизительно соответствуют таким концентрациям ПАВ, которые численно совпадают со значениями K_{D1} и K_{D2} соответственно. Вспоминая реальную экспериментальную картину (рисунок 7-1), можем предположить, что в данных условиях Твин-21 вероятно связывается на двух участках молекулы лизоцима с константами десорбции порядка $3 \cdot 10^{-8}$ и $3 \cdot 10^{-7}$ М, а ДСН вероятно на одном участке молекулы лизоцима с константой десорбции порядка $1.3 \cdot 10^{-4}$ М. Все полученные нами значения существенно ниже значений ККМ (критических концентраций мицеллообразования) для Твин-21 и ДСН [236-237].

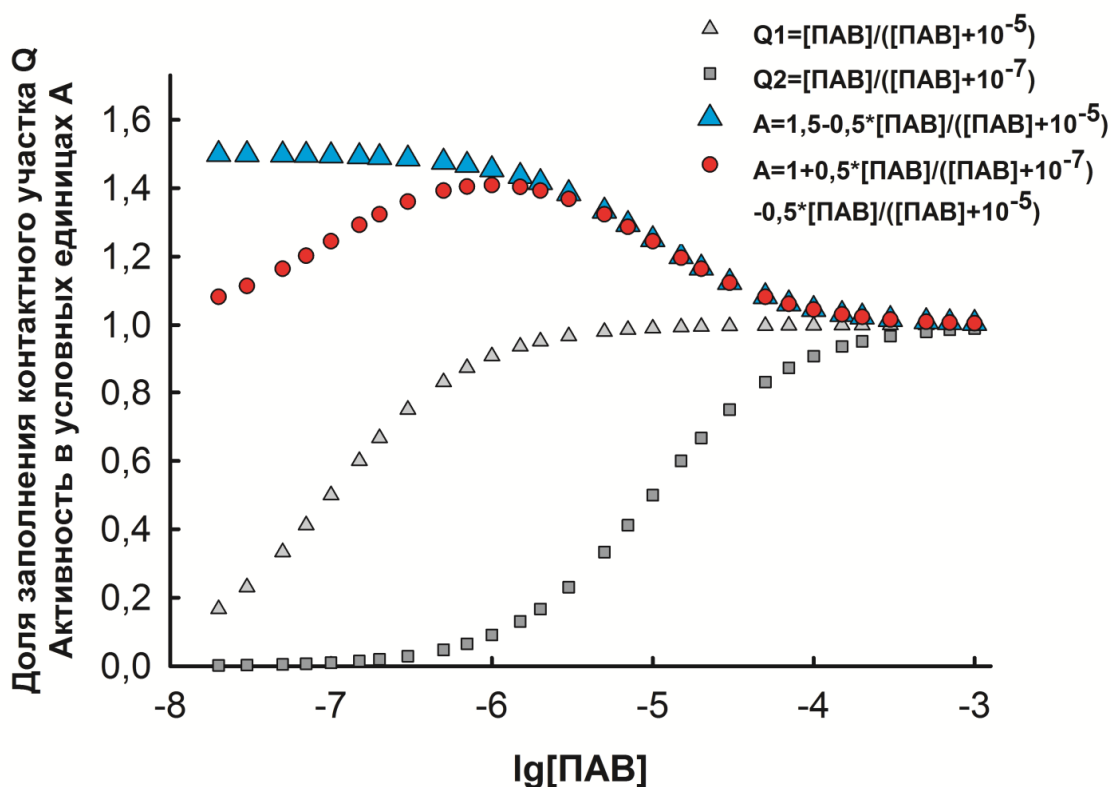


Рисунок 7-2. Зависимости A, Q1, Q2 от концентрации ПАВ.

Нами также было изучено влияние ПАВ различной природы: анионного (додецилсульфата натрия, ДСН), катионного (бромид додецилтриметиламмония, ДТАБ) и цвиттер-ионного (кокоамидопропил бетаина, КАПБ) на лизис грамположительных бактерий *Micrococcus luteus* под действием лизоцима. Картина изменений активности лизоцима на клетках *Micrococcus luteus* также имеет также сложный характер зависимости с максимумом для всех перечисленных ПАВ, аналогичный моделированию на рисунке 7-2.

5.8. Химическая модификация фермента для улучшения бактериолитических свойств (на примере куриного яичного лизоцима).

Использованы данные из списка публикаций [С2].

В случае биотехнологического применения лизоцима возникает вопрос, можно ли химически модифицировать фермент так, чтобы придать ему дополнительные характеристики, управлять его свойствами. В качестве наиболее удобного, простого, практичного метода мы предложили химическую модификацию свободных аминогрупп фермента с помощью ароматических альдегидов с последующим восстановлением двойной связи основания Шиффа с помощью боргидрида (рисунок 8-1).

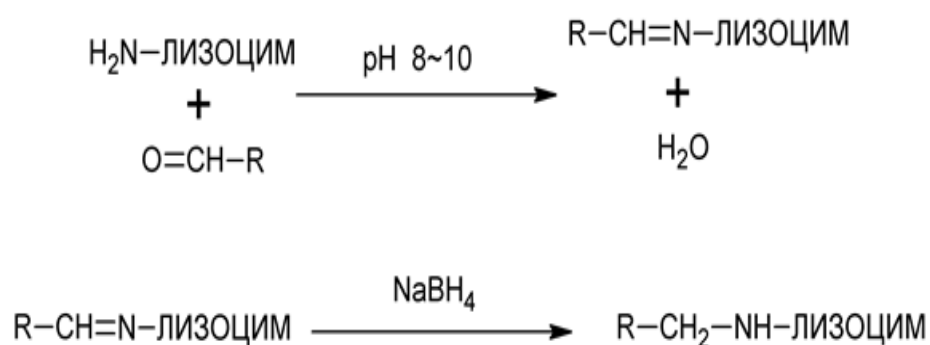


Рисунок 8-1. Схема химической модификации лизоцима.

Стратегия нашей работы в целом состояла в том, чтобы химически модифицировать и впоследствии возможно ковалентно иммобилизовать фермент на матрице. Обратная схема (иммобилизация фермента с последующей его модификацией) является более сложной с технологической точки зрения. Дело в том, что поры выбранных нами для биотехнологического применения матриц достаточно велики, поэтому лизоцим при иммобилизации распределяется внутри частиц.

Модификация такого препарата альдегидами в этом случае будет осложнена диффузией реагентов внутри частиц. Как первый, так и второй этап предложенного процесса (модификация и иммобилизация) предполагался с использованием свободных аминогрупп лизина, которые по литературным данным не являются необходимыми для катализа. Поскольку согласно литературным данным только три остатка лизина в лизоциме доступны для реакции без нарушения третичной структуры [195, 238], сначала было необходимо выбрать условия, при которых модификация альдегидами затрагивает только одну или две аминогруппы.

Процесс химической модификации лизоцима мы контролировали титрованием свободных аминогрупп в препаратах лизоцима с использованием ТНБС (Тринитробензолсульфо кислоты). При сравнении калибровочных зависимостей титрования нативного лизоцима и ϵ -аминокапроновой кислоты (рисунок 8-2) было обнаружено, что аналитический сигнал фермента примерно в 7 раз больше. Действительно, лизоцим содержит 6 остатков лизина и одну свободную аминогруппу терминальной аминокислоты [195, 238]. Поэтому расчет степени модификации фермента проводился в предположении наличия 7 титруемых аминогрупп. Для всех модифицированных препаратов лизоцима зависимость аналитического сигнала от концентрации белка была линейной и проходила через ноль.

В таблице 8-1 приведены свойства модифицированного и нативного лизоцима. Увеличение концентрации альдегида в реакционной смеси приводит к более высокой степени модификации белка. В качестве модификатора бензальдегид выглядит несколько менее эффективным, чем анисовый альдегид. Во всех случаях модификация затрагивает от 0,7 до 1,7 аминогрупп на молекулу фермента. Другие аминогруппы вероятно либо менее реакционноспособны, либо стерически менее доступны для взаимодействия с альдегидом. Дальнейшее увеличение концентрации

модификатора для наших задач было нецелесообразно. Во-первых, уже при молярном соотношении фермент/модификатор 1/15 концентрация

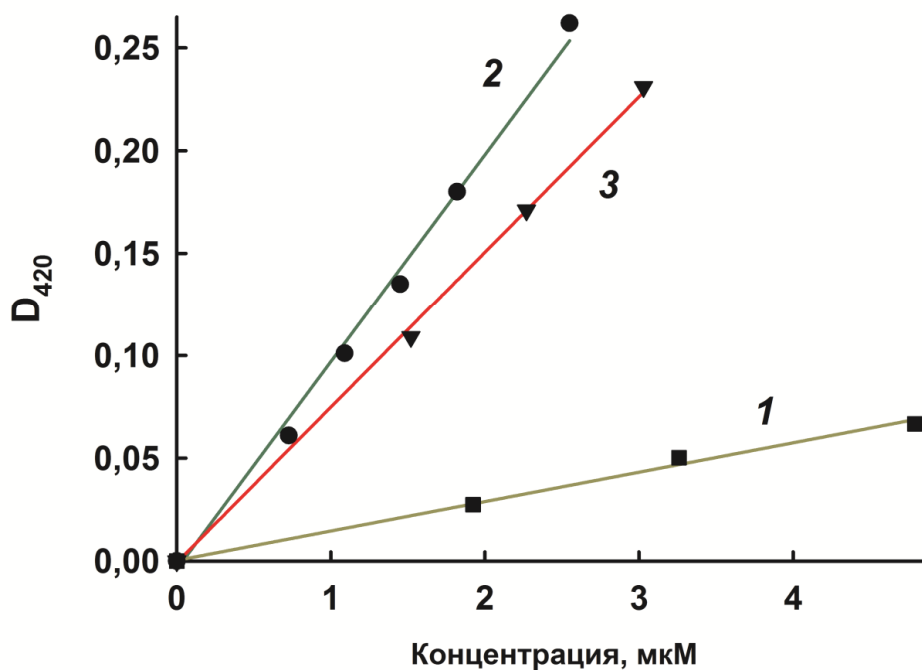


Рисунок 8-2. Зависимость оптической плотности при 420 нм от концентрации: ϵ -аминокапроновая кислота (1, ■), нативный лизоцим (2, ●) и лизоцим, модифицированный анисовым альдегидом (молярное соотношение фермент/альдегид 1:15) (3, ▼). Уменьшение количества свободных аминогрупп лизоцима определяли с использованием (ТНБС) тринитробензолсульфоновой кислоты. Измерения проводились при 37 ° С в буфере H_3BO_3 -NaOH (0,1 М, рН 9,5). Раствор ТНБС добавляли в кювету с белковым раствором до концентрации 0,04%, рост поглощения регистрировали при 420 нм до достижения плато (~ 50 мин).

используемых альдегидов близка к их растворимости в воде. Дальнейшее увеличение концентрации альдегида потребовало бы использования органических растворителей, которые могут отрицательно влиять на структуру лизоцима. Во-вторых, получение фермента с одной-двумя модифицированными аминогруппами полностью соответствовало нашим задачам.

Обнаружено было, что концентрации белка в препаратах, определенных микробиуретовым методом и методом Брэдфорд, близки в пределах ошибки эксперимента. Соотношение оптического поглощения раствора белка при 280 нм и при 260 нм также не изменяется после модификации в пределах ошибки эксперимента. Таким образом, химическая модификация в пределах погрешности эксперимента не влияет на связывание красителя Кумасси G-250 с белком и на образование биуретового комплекса пептидными связями, практически не меняет ультрафиолетовый спектр поглощения. Контрольный эксперимент показал, что лизоцим, обработанный в процедуре модификации без добавления альдегидов, не изменял свои бактериолитические свойства. Активность фермента после модификации изменяется незначительно. Модифицированный лизоцим демонстрирует тот же рН-оптимум активности на клетках *M. luteus* и небольшой сдвиг в щелочную область для рН-оптимума активности на клетках *E. coli*. После модификации лизоцима бензальдегидом и анисовым альдегидом значения K_m для субстрата *M. luteus* уменьшаются приблизительно в полтора раза. После модификации лизоцима бензальдегидом значение K_m для субстрата *E. coli* уменьшается в два раза. После модификации лизоцима анисовым альдегидом K_m для субстрата *E. coli* практически не изменяется. Снижение K_m после модификации можно объяснить улучшенным связыванием бактериальных клеток с лизоцимом.

Таблица 8-1. Свойства нативного и химически модифицированного лизоцима

Характеристика	Нативный лизоцим	Контроль ^a	Молярное соотношение лизоцим/альдегид						
			Бензойный альдегид			Анисовый альдегид			
			1:3	1:7	1:15	1:3	1:7	1:15	
Число модифицированных аминокрупп	-	-	0.68 ± 0.08	1.19 ± 0.09	1.52 ± 0.12	0.86 ± 0.07	1.28 ± 0.07	1.70 ± 0.09	
[Белок] (микробиуретовый метод)/[Белок] (метод Бредфорд)	1.01 ± 0.05	1.03 ± 0.05	0.97 ± 0.10	0.99 ± 0.07	1.13 ± 0.08	1.09 ± 0.08	1.03 ± 0.09	1.18 ± 0.13	
Поглощение при 280 нм /Поглощение при 260 нм	1.69±0.04	1.69±0.04	1.66±0.05	1.67±0.05	1.70±0.04	1.65±0.04	1.66±0.05	1.64±0.05	
<i>M. luteus</i>	Активность 10 ⁻³ /мин	8.3 ± 0.5	8.1 ± 0.5	9.9 ± 0.6	9.7 ± 0.6	9.6 ± 0.6	9.9 ± 0.5	9.8 ± 0.5	9.8 ± 0.5
	K _m , оптических единиц	0.14 ± 0.02	0.15 ± 0.03	0.12 ± 0.03	0.11 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.13 ± 0.03
	pH-оптимум	8.7 ± 0.2	8.7 ± 0.2	8.8 ± 0.2	8.8 ± 0.2	8.8 ± 0.2	8.9 ± 0.2	8.9 ± 0.2	9.0 ± 0.2
<i>E. coli</i>	Активность 10 ⁻³ /мин	12.2 ± 0.8	11.9 ± 0.9	12.0 ± 0.9	12.2 ± 0.9	12.7 ± 0.9	12.0 ± 0.6	12.1 ± 0.7	11.9 ± 0.7
	K _m , оптических единиц	0.17 ± 0.02	0.18 ± 0.03	0.14 ± 0.03	0.10 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.18 ± 0.03	0.18 ± 0.03
	pH-оптимум	8.8 ± 0.2	8.8 ± 0.2	8.9 ± 0.2	9.2 ± 0.2	9.4 ± 0.2	9.0 ± 0.2	9.1 ± 0.2	9.3 ± 0.2

^a Лизоцим, обработанный без добавления альдегида (Молярное соотношение лизоцим/альдегид 1:0)

Экспериментальные данные представлены как среднее и погрешность, рассчитанная для доверительного интервала 95% по распределению Стьюдента.

5.9. Иммуобилизация лизоцима.

Использованы данные из списка публикаций [С2, С3, С4, С5, П1, П2, П3].

Для получения препарата иммуобилизованного фермента к нерастворимой полимерной агарозной матрице (WorkBeads 200 SEC) был ковалентно присоединён лизоцим. Выбор полимерной матрицы был обусловлен тем, что мы предварительно показали её гемосовместимость. Также было предварительно проверено не вызывает ли растворимый лизоцим разрушение клеток крови. В результате проверки выяснилось, что добавление в кровь до 0.4 мг в мл лизоцима не вызывает гемолиз. В случае удачных результатов иммуобилизованный лизоцим в дальнейшем можно будет использовать в медицинских целях для хроматографической очистки крови в процедурах экстракорпоральной терапии. Уничтожение устойчивых к антибиотикам бактерий является крайне важной задачей, которую потенциально может решить материал на основе иммуобилизованного лизоцима. Также, зная, что лизоцим способен сорбироваться на поверхности бактериальных клеток, мы предположили, что теоретически иммуобилизованный лизоцим может быть способен сорбировать липополисахариды (эндотоксины) бактерий, которые необходимо удалять из кровотока при спасении больных с сепсисом. При иммуобилизации, как и при химической модификации лизоцима (раздел 8), задействованы аминокислотные группы, которые экспонированы на поверхности белка, но не входят в активный центр. По литературным данным, всего свободных аминокислотных групп в молекуле лизоцима 7, но доступных свободных аминокислотных групп на поверхности лизоцима без нарушения третичной структуры белка всего три. Соответственно у химически модифицированного лизоцима имеется одна или две аминокислотные группы, доступные для химических реакций, в частности для ковалентной иммуобилизации.

В работе был произведён подбор условий иммобилизации. Проведена иммобилизация лизоцима тремя способами:

1) Присоединением лизоцима к матрице, активированной BrCN. Лизоцим присоединяется посредством производных уретана и изомочевины (схема иммобилизации на рисунке 9-1).

2) Присоединением лизоцима к матрице, активированной окислением NaIO_4 . NaIO_4 окисляет матрицу до получения альдегидных групп, которые впоследствии взаимодействуют с аминогруппами поверхности белка с получением основания Шиффа. Основание Шиффа восстанавливаем с помощью NaBH_4 (схема иммобилизации на рисунке 9-2).

3) Присоединением лизоцима к аминированной матрице конденсацией с глутаровым альдегидом с получением основания Шиффа, которое затем восстанавливаем с помощью NaBH_4 . Аминированная матрица предварительно получается аналогично способу 2 с присоединением диаминогексана вместо лизоцима (схема иммобилизации на рисунке 9-3).

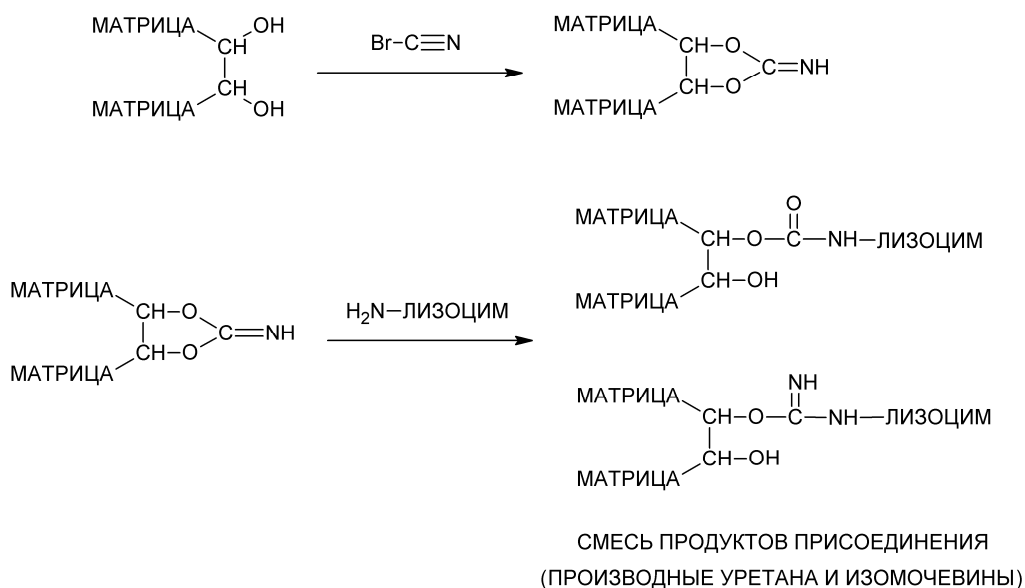


Рисунок 9-1. Схема иммобилизации с помощью активации матрицы бромцианом.

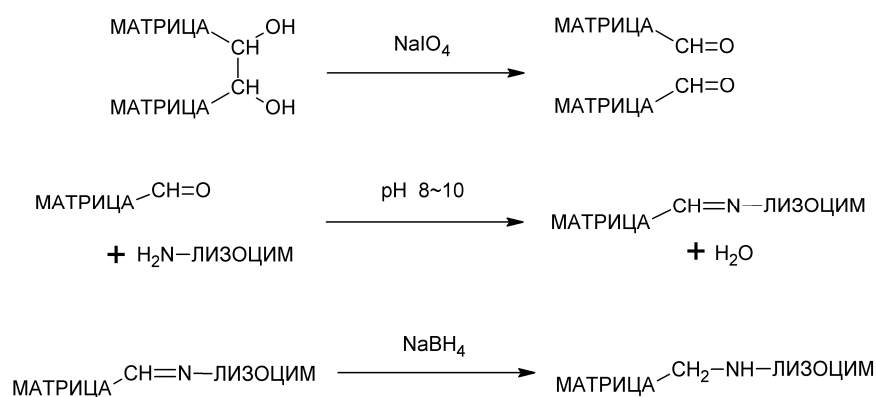


Рисунок 9-2. Схема иммобилизации с помощью активации матрицы периодатом

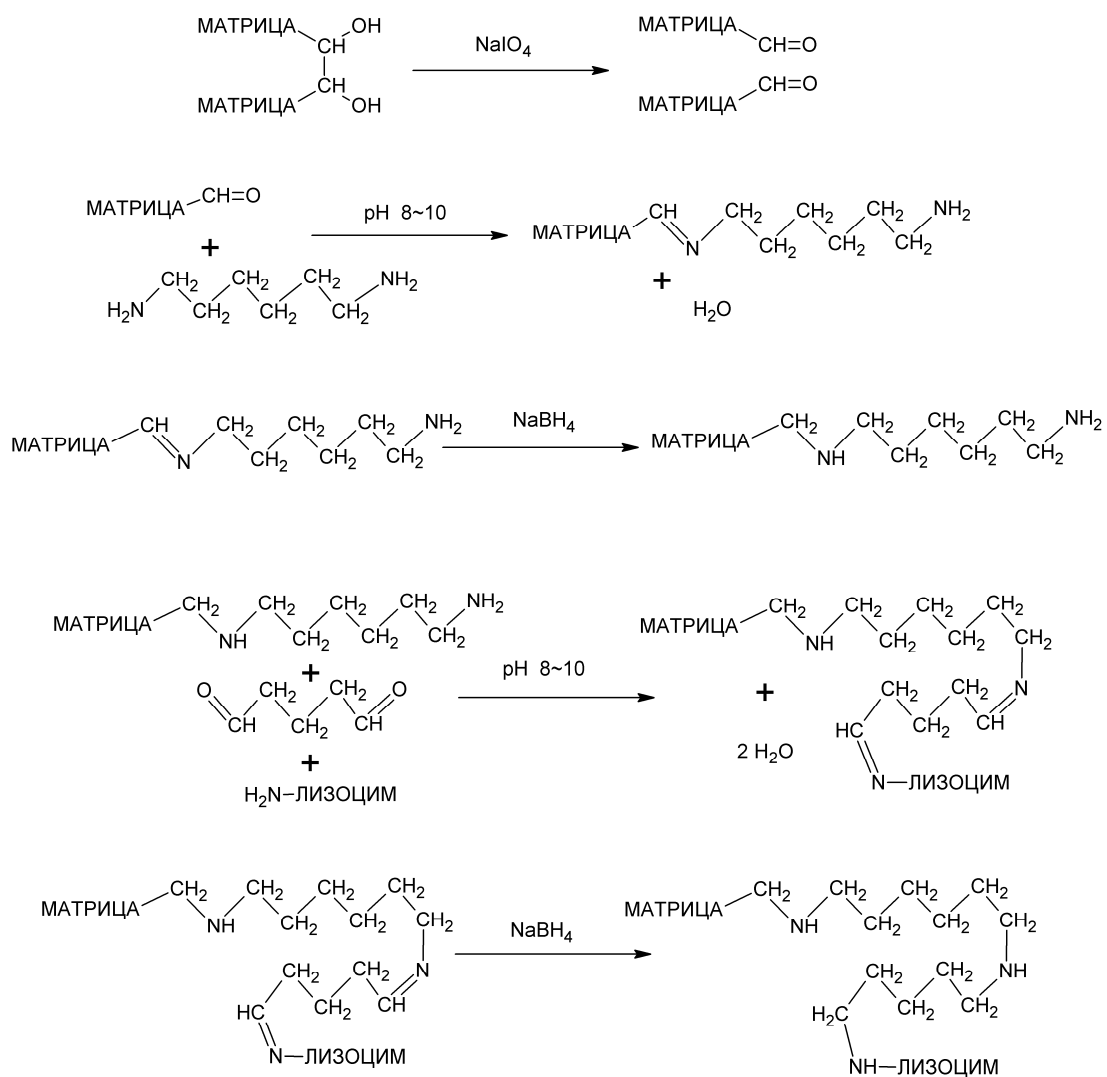


Рисунок 9-3. Схема иммобилизации с помощью активации матрицы периодатом и введением дополнительного молекулярного спейсера.

Во всех вариантах иммобилизации лизоцим присоединяется к матрице с выходом 92-99% (из 15 мг на мл матрицы). Однако при изучении смывов с препаратов иммобилизованного лизоцима выяснилось, что в случае активации с помощью BrCN имеет место утечка фермента при хранении до 0,5 мкг с 1 мл матрицы в неделю (0.003 % от количества иммобилизованного фермента). Утечка лиганда выявляется только по активности, но не по присутствию белка в растворе. Методы определения белка, пригодные для нашей работы, не позволяют достоверно определять меньше 1-2 мкг в мл в пробе. Утечка обнаруживалась через несколько дней после каждой новой отмывки препарата. В вариантах иммобилизации с активацией матрицы окислением NaIO₄ утечки лизоцима не происходило. Вероятно, метод с активацией матрицы BrCN даёт менее стабильные ковалентные связи, хотя в литературе на этот счёт нет детальных исследований.

Мы сравнили активность иммобилизованного и растворимого лизоцима (рисунок 9-4). Чтобы было удобно сравнивать активности в единых координатах, мы для растворимого лизоцима брали конечную концентрацию 0,1 мкг/мл, а иммобилизованный лизоцим добавляли в количестве 35 мкл на мл смеси. Из-за стерических затруднений только небольшая часть фермента, иммобилизованного в гранулах полимера, доступна для ферментативного действия на клетки бактерий. В 35 мкл иммобилизованного препарата содержится 525 мкг лизоцима, в 5250 раз больше количества растворимого лизоцима в эксперименте сравнения. Необходимость иммобилизации избыточных количеств лизоцима не должна стать серьёзным препятствием для биотехнологического применения, так как лизоцим представляет собой коммерчески доступное вещество. Лизоцим, иммобилизованный с помощью BrCN и лизоцим, иммобилизованный с помощью активации матрицы с NaIO₄ с последующим присоединением удлиненного молекулярного спейсера, оба

эффективно лизируют как клетки *E. coli*, так и клетки *M. luteus*. Лизоцим, иммобилизованный с помощью активации матрицы с NaIO_4 , но без дополнительного молекулярного спейсера, имеет пониженную активность на грамположительных клетках *M. luteus*. В этом случае, вероятно, иммобилизованный лизоцим распределяется в матрице таким образом, что имеются дополнительные стерические затруднения для его взаимодействия с бактериальными клетками.

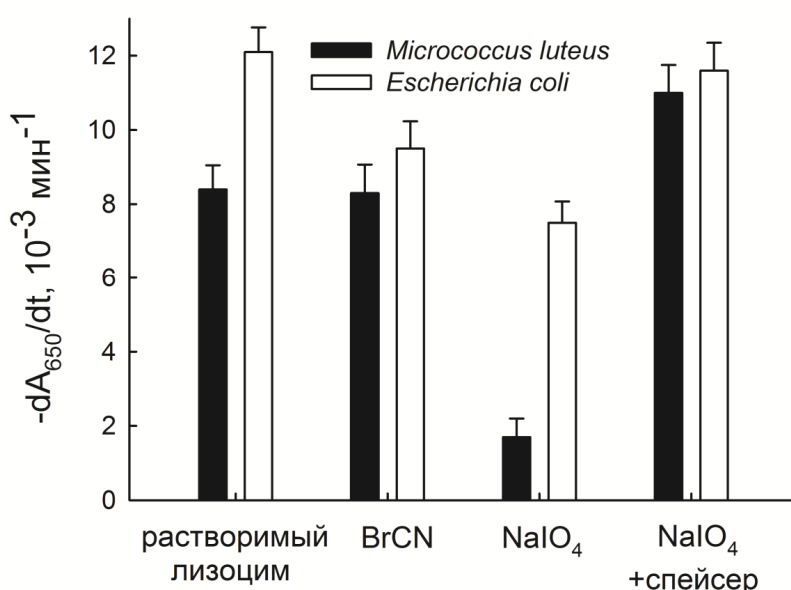


Рисунок 9-4. Сравнение активности растворимого лизоцима и различных препаратов иммобилизованного лизоцима. 0,01 М Трис-MES-ацетат с pH 8,8 при температуре 37°C. 0,1 мкг растворимого лизоцима в мл раствора или 35 мкл препарата иммобилизованного лизоцима на 1 мл раствора.

Для дальнейшей работы с химически немодифицированным и с химически модифицированным лизоцимом мы использовали иммобилизацию с помощью активации матрицы окислением NaIO_4 и

введением удлинённого молекулярного спейсера (-NH-C₆H₁₂-NH-C₅H₁₀-NH-).

В таблице 9-1 приведены данные по снижению обсеменённости раствора при физиологических значениях ионной силы и pH после пропускания через колонку с иммобилизованным лизоцимом. Как мы видим, трёхкратное пропускание препарата приводит к уничтожению 40% бактерий. После 12-кратного пропускания через сорбент уничтожено бактерий 75%. Таким образом, видим эффективное обеззараживающее действие нового материала.

Таблица 9-1. Изменение концентрации клеток в бактериальной суспензии *M.luteus* (в 10 мМ КН₂РО₄-КОН pH 7,0 с 0,15 мМ NaCl) при пропускании препарата через колонку объёмом 5 мл с иммобилизованным лизоцимом.

Количество циклов пропускания через колонку	Оптическое поглощение	Объём суспензии и клеток, мл	Концентрация бактерий, 10 ⁷ КОЕ/мл	Падение обсеменённости по сравнению с исходной, %
0	0,502	10	2,5	0
3	0,216	14	1,5	40
6	0,125	18	1,1	55
9	0,07	22	0,8	69
12	0,05	25	0,6	75

Согласно подобранной методике иммобилизации были получены препараты как немодифицированного иммобилизованного лизоцима, так и химически модифицированного (раздел 8) иммобилизованного лизоцима. Мы провели дополнительные детальные исследования иммобилизованного фермента как на предмет бактериолитической активности, так и на предмет способности сорбировать компоненты плазмы крови человека и липополисахариды (эндотоксин) бактерий. Как было сказано ранее, исходя из результатов по изучению сорбции лизоцима на клетках, можно было предположить, что лизоцим может связываться с различными молекулярными структурами поверхности бактериальной клетки, в частности с липополисахаридами (эндотоксинами) бактерий, которые необходимо удалять из кровотока пациентов, больных сепсисом. Эта гипотеза подтвердилась. Мы также обнаружили, что с помощью иммобилизованного лизоцима кроме эндотоксина бактерий из плазмы человека удаляется ещё некоторое количество иммуноглобулинов G. Другие компоненты плазмы крови, согласно электрофоретическим исследованиям смывов с сорбента, практически не связывались.

В таблице 9-2 приведена сводка свойств иммобилизованного модифицированного лизоцима по сравнению со свойствами иммобилизованного немодифицированного лизоцима. Соотношение объёмов раствор/сорбент выбрано с учётом реальных соотношений в медицинских процедурах экстракорпоральной терапии [239], так как нам важно понимать реальную применимость сорбента для медицинских технологий.

Важно отдельно отметить, что разработанная процедура модификации не повлияла на эффективность иммобилизации белка на носителе - во всех случаях выход иммобилизации колеблется от 92 до 96%. Этот факт подтверждает правильность выбранной стратегии получения препаратов иммобилизованного модифицированного лизоцима. Наличие

даже одной доступной свободной аминогруппы в молекуле белка вполне достаточно для ее полного связывания с носителем.

Как мы видим, как модифицированный лизоцим, так и немодифицированный лизоцим после иммобилизации сохраняет активность в отношении бактериальных клеток. Относительная бактериолитическая активность иммобилизованного модифицированного лизоцима по сравнению с иммобилизованным немодифицированным лизоцимом выше по отношению к клеткам *M. luteus* (примерно в полтора раза) и почти одинакова в случае клеток *E.coli*.

Материал на основе модифицированного ковалентно иммобилизованного лизоцима демонстрирует отличную сорбцию эндотоксина. Реальные концентрации эндотоксина у пациентов с сепсисом в среднем ниже на три порядка по сравнению с модельным раствором, использованном в этой работе [240]. Изотерма сорбции эндотоксина в данных условиях описывается уравнением Генри.

Мы видим, что с сорбентом связывается IgG (иммуноглобулин G). Концентрация IgG в модельном растворе 10 мг в мл по порядку соответствует физиологической концентрации в плазме крови человека [241] и удаление не более 10% от этого количества не представляет опасности для пациентов. Способность иммобилизованного лизоцима специфически связываться с иммуноглобулинами (IgG) показывает, что этот фермент может играть роль опсонина, усиливая иммунные реакции при одновременном связывании с иммуноглобулинами и бактериальной клеткой. В литературе обсуждался вопрос, что лизоцим может усиливать некоторые иммунные реакции, однако это явление связывалось с предположением того, что связывание с лизоцимом просто изменяет поверхностный заряд ряда антигенов [129]. До сих пор не было показано то, что иммуноглобулины непосредственно связываются с лизоцимом. Адсорбция IgG на иммобилизованном лизоциме не изменялась после

химической модификации, что свидетельствует о том, что для иммуноглобулины вероятно специфически связываются с тем участком лизоцима, где нет модифицированных аминокрупп. Изотерма сорбции IgG в данных условиях описывается уравнением Генри.

Способность лизоцима связывать IgG была подтверждена также для человеческого лизоцима. Контрольные эксперименты показали, что матрица без иммобилизованного лизоцима не влияет на бактериальный лизис и не связывает эндотоксин или IgG.

Таким образом, разработанный сорбционный материал имеет широкие перспективы для разработки в будущем медицинского сорбента для экстракорпоральной терапии при лечении сепсиса. Предложенная схема получения иммобилизованного модифицированного лизоцима может быть использована с различными альдегидами для приготовления сорбентов с различными свойствами для различных целей биотехнологии и медицины.

Была проведена проверка гемосовместимости препарата иммобилизованного лизоцима. Почти все исследуемые параметры крови не менялись значительно после контакта с сорбентом: число эритроцитов, средний объем эритроцита, среднее содержание гемоглобина в эритроците, число тромбоцитов, средний объем тромбоцитов, число лейкоцитов, число лимфоцитов, число моноцитов. Концентрация тромбоцитов менялась с $(210 \pm 26) \times 10^9$ кл/л до $(161 \pm 18) \times 10^9$ кл/л, однако это не выходит за рамки нормы. Таким образом, новый сорбент удалось сделать совместимым с цельной кровью.

Таким образом, нам удалось выбрать методику для иммобилизации, при которой отсутствует утечка фермента и одновременно с этим обеспечивается гемосовместимость, сорбция эндотоксинов бактерий и эффективность ферментативного действия лизоцима и на

Таблица 9-2. Характеристики иммобилизованного нативного и модифицированного лизоцима.

Характеристики		Нативный лизоцим	Молярное соотношение при модификации лизоцим/альдегид					
			Бензойный альдегид			Анисовый альдегид		
			1:3	1:7	1:15	1:3	1:7	1:15
Выход иммобилизации, %		95 ± 3	92 ± 3	93 ± 3	96 ± 3	92 ± 3	92 ± 3	95 ± 3
Активность (<i>M. luteus</i>), 10 ⁻³ /мин		10.5 ± 1.7	16.2 ± 1.9	16.1 ± 1.7	16.5 ± 2.0	14.6 ± 1.6	14.9 ± 1.5	15.3 ± 1.7
Активность (<i>E. coli</i>), 10 ⁻³ /мин		11.1 ± 2.0	11.3 ± 1.8	11.2 ± 1.8	11.0 ± 2.0	11.4 ± 1.8	11.3 ± 2.0	11.1 ± 1.9
Сорбция эндотоксина <i>E. coli</i> ^b	Ёмкость, нг на мл сорбента	466 ± 39	598 ± 43	670 ± 48	682 ± 47	581 ± 45	596 ± 47	598 ± 49
	Эффективность удаления, %	62	80	89	91	78	80	80
Сорбция эндотоксина <i>P.aeruginosa</i> ^b	Ёмкость, нг на мл сорбента	342 ± 37	548 ± 42	572 ± 46	587 ± 52	433 ± 48	443 ± 52	449 ± 51
	Эффективность удаления, %	46	73	76	78	58	59	60
Сорбция IgG ^c	Ёмкость, мг на мл сорбента	8.7 ± 0.8	8.2 ± 0.8	7.9 ± 0.9	7.4 ± 0.8	7.8 ± 0.9	7.3 ± 0.8	7.1 ± 0.9
	Эффективность удаления, %	8.7	8.2	7.9	7.4	7.8	7.3	7.1

^b Раствор эндотоксина 75 нг в мл, объёмное соотношение раствора к сорбенту 10:1

^c Раствор IgG 10 мг в мл, объёмное соотношение раствора к сорбенту 10:1

Экспериментальные данные представлены как среднее и погрешность, рассчитанная для доверительного интервала 95% по распределению Стьюдента.

грамотрицательные клетки *E. coli* и на грамположительные клетки *M. luteus*. При использовании в биотехнологии и медицине неизбежно возникает вопрос возможности стерилизации материала. В противном случае при необходимости можно производить материал изначально в стерильных условиях, однако это повышает стоимость продукции. Мы провели автоклавирование сорбента с иммобилизованным лизоцимом, чтобы проверить его свойства после данной процедуры. Автоклавирование осуществлялось в виде 50% суспензии сорбента в дистиллированной воде при 121 °С в течение 30 мин.

Была проверена эффективность удаления клеток неавтоклавированного и автоклавированного иммобилизованного лизоцима и иммобилизованный лизоцим после автоклавирования. К осевшему гелю добавляли суспензию клеток *M. luteus* в буферном растворе 10 мМ Трис-MES-ацетат, pH 7,5 (из расчета 30 мкл сорбента на мл суспензии клеток) и инкубировали на роторной качалке со скоростью 10 оборотов в мин при 37 °С. Через определённые интервалы времени (7-10 мин) отбирали пробы по 2 мл и давали сорбенту осесть в течение 1 минуты (время оседания 30-40 с). Измеряли оптическую плотность надосадочной суспензии при длине волны 650 нм. Исходная оптическая плотность суспензии клеток составляла 0,5-0,6, что соответствует порядку 10^8 бактерий в мл. Результаты представлены на рисунке 9-5. Как видим, в случае неавтоклавированного лизоцима падение оптической плотности (уменьшение количества бактериальных клеток) продолжается и после 1 часа и после 2 часов инкубации, что свидетельствует о разрушении клеток активным ферментом. В случае автоклавированного иммобилизованного фермента мы наблюдаем выход оптической плотности к некоторому порогу, отвечающему заполнению поверхности сорбента связанными адсорбированными клетками.

Таким образом, мы видим, что автоклавированный иммобилизованный лизоцим потерял активность и не разрушает клетки, а только сорбирует. Автоклавированный сорбент также можно использовать в медицинских целях для удаления бактериальных клеток. Более того в ряде ситуаций для медицинского применения получается преимущество, так как снижается риск иммунных реакций пациента при высвобождении из разрушенных бактериальных биополимеров. Проверка способности связывать липополисахариды (эндотоксины) бактерий автоклавированным иммобилизованным лизоцимом показала, что после автоклавирования сорбционная ёмкость не только не теряется, а даже увеличивается на 15-20%.

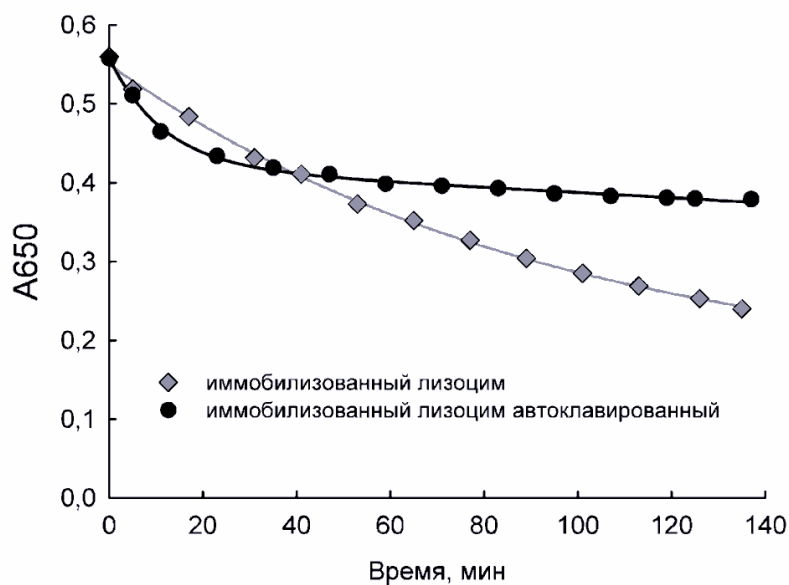


Рисунок 9-5. Осветление суспензии клеток *M. luteus* в присутствии иммобилизованного лизоцима. 0,03 мл сорбента на 1 мл суспензии клеток.

Автор выражает благодарность своим коллегам из Межотраслевого инжинирингового центра композиционных материалов Федерального государственного бюджетного образовательного

учреждения высшего образования «Московский государственный технический университет имени Н.Э. Баумана» и Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, вместе с которыми в рамках совместного проекта были получены данные, использованные при написании глав 8 и 9.

Выводы

1. В результате систематических исследований ферментативного лизиса бактерий сформулированы основополагающие методические подходы для корректного измерения скорости ферментативного лизиса бактериальных клеток. Для данного типа исследований определена решающая роль особого контроля таких параметров как начальная концентрация клеток, концентрация фермента, ионная сила среды. Теоретически обосновано и экспериментально подтверждено, что изменение числа целых клеток во времени кратно изменению оптического поглощения, измеряемого в турбидиметрическом методе.
2. Разработан подход для измерения кинетики и термодинамики сорбции бактериолитического фермента непосредственно на живых клетках. Экспериментально показано, что процесс сорбции фермента на клетках может иметь как положительное, так и отрицательное влияние на ферментативный лизис клеток («продуктивное» и «непродуктивное» связывание).
3. Разработанные теоретические и методические подходы для измерения бактериолитической активности позволили впервые показать наличие бактериолитической активности у интерлейкина-2, серотрансферрина и компонента системы комплемент C2.
4. Показано, что бактериолитическая активность лизоцима и интерлейкина-2 на живых клетках зависит от присутствия низкомолекулярных эффекторов. Активность лизоцима повышается в присутствии миллимолярных концентраций глицина и заряженных аминокислот. Активность интерлейкина-2 повышается в присутствии миллимолярных концентраций глутамата, аспартата, аргинина, тирамина, триптамина и милдроната.

5. Найдены общие закономерности в характере зависимостей скорости ферментативного лизиса бактерий от концентрации ПАВ. Предложена математическая модель, описывающая экспериментальные данные, позволяющая оценивать константы связывания ПАВ с ферментом.
6. Исследования по химической модификации и иммобилизации лизоцима позволили создать материал, который одновременно и проявляет антибактериальные свойства, и совместим с кровью, а соответственно потенциально пригоден для экстракорпоральных медицинских процедур. Впервые показано, что иммобилизованный лизоцим помимо своей бактериолитической активности эффективно связывает липополисахариды бактерий (эндотоксины), и, следовательно, может применяться в лечении сепсиса.
7. Показано связывание лизоцима с иммуноглобулинами, которое свидетельствует о наличии неферментативной физиологической функции у лизоцима как белка-опсонина, усиливающего реакцию иммунных клеток на антиген.

VI. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гусев М. В., Минеева Л. А., Микробиология, М, Академия, 2008, 464 с.
2. Емцев В. Т., Мишустин Е. Н., Микробиология, М, Юрайт, 2018, 445 с.
3. Реннеберг Р., Эликсиры жизни, М, Мир, 1987, 152с.
4. Rennera L. D., Weibela D. B., Cardiolipin microdomains localize to negatively curved regions of *Escherichia coli* membranes // PNAS, 2011, V. 108(15), P. 16264–16269.
5. Sun Y., Sun Tz.-L., Huang H. W., Physical properties of *Escherichia coli* spheroplast membranes // Biophys J, 2014, V. 107, P. 2082–2090.
6. Vollmer W., Blanot D., De Pedro M A., Peptidoglycan structure and architecture // FEMS Microbiology Reviews, 2008, V. 32, P. 149–167.
7. Кулаев И.С., Бактериолитические ферменты микробного происхождения в биологии и медицине // Соросовский образовательный журнал, 1997, Т. 3, С. 23-31.
8. Савельев Е.П., Петров Г.И., Молекулярные основы строения клеточной стенки бактерий // Успехи биол. химии, 1978, Т. 19, С. 106–129.
9. Ghuysen J.-M., Hakenbeck R. Bacterial Cell Wall. Amsterdam, Elsevier, 1994.
10. Vollmer W., Joris B., Charlier P., Foster S., Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases // FEMS Microbiol Rev, 2008, V. 32, P. 259–286.
11. Найт Р., Смотри, что у тебя внутри, М, Аст, 2015, 160с.
12. Mengin-Lecreulx D., Lemaitre B., Structure and metabolism of peptidoglycan and molecular requirements allowing its detection by the *Drosophila* innate immune system // Journal of Endotoxin Research, 2005, V. 11(2), P. 105–111.

13. Потехина Н. В., Тейхоевые кислоты актиномицетов и других грамположительных бактерий // Успехи биологической химии, 2006, Т. 46. С. 225–278.
14. Dalen R., Peschel A., van Sorge N M., Wall teichoic acid in *Staphylococcus aureus* host interaction // Trends in Microbiology, 2020, in press.
15. Fischer W. Physiology of lipoteichoic acids in bacteria // Adv Microb Physiol. 1988. V. 29, P. 233–302.
16. Fischer W. Lipoteichoic acid and lipids in the membrane of *Staphylococcus aureus* // Med Microbiol Immunol. 1994. V. 183(2), P. 61–76.
17. Holtje J. V., Tomasz A., Specific recognition of choline residues in the cell wall teichoic acid by the N-acetylmuramyl-L-alanine amidase of pneumococcus // J Biol Chem, 1975, V. 250(15), P. 6072–6076.
18. Heselpoth R. D., Euler C. W., Schuch R., Fischetti V. A., Lysocins: Bioengineered Antimicrobials That Deliver Lysins Across the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria // Antimicrob Agents Chemother, 2019, V. 63(6), e00342–19.
19. Wilkinson B. J., Cell envelope of paracoccus denitrificans: outer membrane permeability to lysozyme and hydrophobic antibiotics // FEMS Microbiology Letters, 1977, V. 2(5), P. 285–288.
20. Ragland S. A., Criss A. K., From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme // PLoS Pathog, 2017, V. 13(9), e1006512.
21. Nikaido H., Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited // Microbiol Mol Biol Rev, 2003, V. 67(4), P. 593–656.
22. Wee S., Wilkinson B. J., Increased outer membrane ornithine-containing lipid and lysozyme penetrability of paracoccus denitrificans grown in a

- complex medium deficient in divalent cations // *J Bacteriol*, 1988, V. 170(7), P. 3283–3286.
23. Salazar O., Asenjo J. A., Enzymatic lysis of microbial cells // *Biotechnol Lett*, 2007, V. 29(7), P. 985–994.
 24. Hamouda T., Baker J. R. Jr., Antimicrobial mechanism of action of surfactant lipid preparations in enteric Gram-negative bacilli // *Journal of Applied Microbiology*, 2000, V. 89, 397A403
 25. Benz R, Bauer K, Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of gram-negative bacteria. Review on bacterial porins // *Eur. J. Biochem.* 1988. V. 176(1), P. 1–19.
 26. Jap B.K., Walian P.J., Biophysics of the structure and function of porins // *Q. Rev. Biophys*, 1990, V. 23(4), P. 367–403.
 27. Veiga-Crespo P., Ageitos J.M., Poza M., Villa T.G., Enzybiotics: a look to the future, recalling the past // *J Pharm Sci*, 2007, 96, 1917–1924.
 28. S. Yum, Kim M. J., Xu Y., Jin X. L., Yoo H. Y., Park J. W., Gong J. H., Choe K. M., Lee B. L., Ha N. C., Structural basis for the recognition of lysozyme by MliC, a periplasmic lysozyme inhibitor in Gram-negative bacteria // *BBRC*, 2009, 378, 244–248.
 29. Van Herreweghe J. M., Vanderkelen L., Callewaert L., Aertsen A., Compennolle G., Declerck P. J., Michiels C. W., Lysozyme inhibitor conferring bacterial tolerance to invertebrate type lysozyme // *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67, 1177–1188.
 30. Callewaert L., Aertsen A., Deckers D., Vanoirbeek K. G. A., Vanderkelen L., van Herreweghe J. M., Masschalck B., Nakimbugwe D., Robben J., Michiels C. W., A new family of lysozyme inhibitors contributing to lysozyme tolerance in gram-negative bacteria // *PLoS Pathog*, 2008, V. 4(3), e1000019.

31. Leysen S., Vanderkelen L., van Asten K., Vanheuverzwijn S., Theuwis V., Michiels C.W., Strelkov S.V., Structural characterization of the PliG lysozyme inhibitor family // *J Struct Biol*, 2012, V.180(1), P. 235–242.
32. Rietschel E. T., Kirikae T., Shade F. U., Mamat U., Seydel G., Di Padova F., Schreier M., Brade H., Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function // *FASEB j*, 1994, V. 8, P. 217–225.
33. Raetz C. R., Whitfield C., Lipopolysaccharide endotoxins // *Annu. Rev. Biochem.*, 2002, V. 71, P. 635–700.
34. Hershberger C., Binkley S. B., Chemistry and metabolism of 3-deoxy-D-mannooctulosonic acid. I. Stereochemical determination // *J. Biol. Chem.*, 1968, V. 243(7), P. 1578–1584.
35. Tzeng Y. L., Datta A., Kolli V. K., Carlson R. W., Stephens D. S., Endotoxin of *Neisseria meningitidis* composed only of intact lipid A: inactivation of the meningococcal 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase // *J. Bacteriol*, 2002, V. 184(9), P. 2379–2388.
36. Rosadini C. V., Kagan J. C., Early innate immune responses to bacterial LPS // *Curr Opin Immunol.*, 2017, V. 44, P. 14–19.
37. Futoma-Koloch B. J., Immune response against bacterial lipopolysaccharide // *Mol Immunol*, 2017, V. 2(1), e105.
38. Prokhorenko I. R., Zubova S. V., Ivanov A. Yu., Grachev S. V., Interaction of gram-negative bacteria with cationic proteins: dependence on the surface characteristics of the bacterial cell // *Int J Gen Med*, 2009, V. 2, P. 33-38.
39. Matias V. R. F., Beveridge T. J., Cryo-electron microscopy reveals native polymeric cell wall structure in *Bacillus subtilis* 168 and the existence of a periplasmic space // *Molecular Microbiology*, 2005, V. 56(1), P. 240–251.

40. Кулаев И.С., Северин А.И, Абрамонкин Г.В., Бактериолитические ферменты микробного происхождения в биологии и медицине // Вестн. АМН СССР, 1984, № 8. С. 64-69.
41. Скрыбин Г.К., Кулаев И.С., Лизоамидаза -вызов микробам // Наука в СССР. 1990. № 2. С. 52—53.
42. Степная О. А., Литические ферменты *Lysobacter sp*, Дисс Докт биол наук, Пущино 2012.
43. Степная О.А., Ледова Л.А., Кулаев И.С., Бактериолитический комплекс лизоамидаза. 1. Определение природы взаимодействия ферментов и полисахарида, входящих в состав комплекса. // Биохимия, 1993, Т. 58(10), С.1523-1528.
44. Sinha R. K., Rosenthal R. S., Release of soluble peptidoglycan from growing *Gonococci*: demonstration of anhydro-muramyl-containing fragments // *Infect Immun*, 1980, V. 29(3), P. 914–925.
45. Ryazanova L.P., Ledova L.A., Stepnaya O.A., Kulaev I.S., Tsurikova N.V., Sinitsyn A.P., Effect of the proteolytic enzymes of *Bacillus licheniformis* and the lysoamidase of *Lysobacter sp. XL1* on *Proteus vulgaris* and *Proteus mirabilis* cells // *App Biochem Microbiol*, 2005, V. 41(5), P. 490–494.
46. Nelson D., Loomis L., Fischetti V. A., Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme // *PNAS*, 2001, V. 98(7), P. 4107–4112.
47. Loeffler J. M., Djurkovic S., Fischetti V. A., Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia // *Infection and immunity*, 2003, V. 71, N. 11, P. 6199–6204.
48. Каттер Э., Сулаквелидзе А., Бактериофаги: биология и практическое применение, М, Научный мир, 2012, 640 с.
49. Fischetti V. A., Bacteriophage Lysins as Effective Antibacterials // *Curr Opin Microbiol*, 2008, V. 11(5), P. 393–400.

50. McGowan S., Buckle A. M., Mitchell M.S., Hoopes J. T., Gallagher D. T., Heselpoth R. D., Shen Y., Reboul C. F., Law R. H. P., Fischetti V. A., Whisstock J. C., Nelson D. C., X-ray crystal structure of the streptococcal specific phage lysin PlyC // PNAS, 2012, V. 109(31), P.12752–12757.
51. Latka A., Maciejewska B., Majkowska-Skrobek G., Briers Y., Drulis-Kawa Z., Bacteriophage-encoded virion-associated enzymes to overcome the carbohydrate barriers during the infection process // Appl Microbiol Biotechnol, 2017, V. 101(8), P. 3103–3119.
52. Nelson D., Schuch R., Chahales P., Zhu S., Fischetti V. A., PlyC: A multimeric bacteriophage lysine // PNAS, 2006, V. 103(28), P. 10765-10770.
53. Адамс М., Бактериофаги, 1961, М, Изд. ин. лит., 528с .
54. da Silva C. R., Silva M. L. C., Kamida H. M., Goes-Neto A., Koblitz M. G. B., Lytic enzyme production optimization using low-cost substrates and its application in the clarification of xanthan gum culture broth // Food Sci Nutr, 2014, V. 2(4), P. 299–307.
55. Kombrink A., Tayyrov A., Essig A., Stockli M., Micheller S., Hintze J., van Heuvel Y., Durig N., Lin C.-W., Kallio P.T., Aebi M., Kunzler M., Induction of antibacterial proteins and peptides in the coprophilous mushroom *Coprinopsis cinerea* in response to bacteria // ISME J, 2019, V. 13, P 588–602.
56. Шкаликов В. А., Иммунитет растений, М, КолосС, 2005, 192 с.
57. Плотникова, Л. Я., Иммунитет растений и селекция на устойчивость к болезням и вредителям, М, Колосс, 2007, 359 с.
58. Wang Sh. Y., Ng Tz. B., Chen T. B., Lin D. Y., Wu J. H., Rao P. F., Ye X. Y., First report of a novel plant lysozyme with both antifungal and antibacterial activities // BBRC, 2005, V. 327(3), P. 820–827.

59. Wang Sh. Y., Shao B., Chang J. L., Rao P. F., Isolation and identification of a plant lysozyme from *Momordica charantia* L // European Food Research and Technology, 2011, V. 232(4), P. 613–619.
60. Weaver L. H., Grütter M. G., Remington S. J., Gray T. M., Isaacs N. W., Matthews B. W., Comparison of goose-type, chicken-type, and phage-type lysozymes illustrates the changes that occur in both amino acid sequence and three-dimensional structure during evolution // Journal of Molecular Evolution, 1985, V. 21, P. 97–111.
61. Lamrabet O., Jauslin T., Lima W. C., Leippe M., Cosson P., The multifarious lysozyme arsenal of *Dictyostelium discoideum* // Dev Comp Immunol, 2020, V. 107, 103645.
62. Nilsen I. W., Myrnes B., Edvardsen R. B., Chourrout D., Urochordates carry multiple genes for goose-type lysozyme and no genes for chicken- or invertebrate-type lysozymes // Cell Mol Life Sci, 2003, V. 60(10), P. 2210-2218.
63. Grütter M. G., Weaver L. H., Matthews B. W., Goose lysozyme structure: an evolutionary link between hen and bacteriophage lysozymes? // Nature, 1983, V. 303(5920), P. 828–831.
64. Irwin D. M., Evolution of the vertebrate goose-type lysozyme gene family // BMC Evolutionary Biology, 2014, V. 14(188), P. 1–15.
65. Nitta K, Sugai S, The evolution of lysozyme and alpha-lactalbumin // Eur J Biochem, 1989, V. 182(1), P. 111–118.
66. Callewaert L., Michiels C. W., Lysozymes in the animal kingdom // J Biosci, 2010, V. 35, P. 127–160.
67. Reitamo S., Klockars M., Adinolfi M., Osserman E. F., Human Lysozyme: Origin and Distribution in Health and Disease // Ric Clin Lab, 1978, V. 8(4), P. 211–231.

68. Ragland S. A., Criss A. K., From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme // *PLoS Pathog*, 2017, V. 13(9), e1006512.
69. Laschtschenko. P., Über die keimtötende und entwicklungshemmende Wirkung von Hühnereiweiß // *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*, 1909, V. 64(1), P. 419–427.
70. Fleming A., On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions // *Proceedings of the Royal Society*, 1922, V. B93, P. 306–317.
71. Blake C. C., Koenig D. F., Mair G. A., North A. C., Phillips D. C., Sarma V. R., Structure of hen egg-white lysozyme, A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution // *Nature*, 1965, V. 206(986), P. 757–761.
72. Johnson L. N., Phillips D. C., Structure of some crystalline lysozyme-inhibitor complexes determined by X-ray analysis at 6 Angstrom resolution // *Nature*, 1965. V. 206(986), P. 761–763.
73. Wohlkönig A., Huet J., Looze Y., Wintjens R., Structural relationships in the lysozyme superfamily: significant evidence for glycoside hydrolase signature motifs // *PLoS One*, 2010, V. 5, P. 1–10.
74. Sheng L., Wang J., Huang M. J., Xu Q., Ma M .H., The changes of secondary structures and properties of lysozyme along with the egg storage // *Int J Biol Macromol*, 2016, V. 92, P. 600–606.
75. Tribst A. A. L., de Moraes M. A. B., Tominaga C. Y., Nascimento A. F. Z., Murakami M. T., Cristianini M., How high pressure pre-treatments affect the function and structure of hen egg-white lysozyme // *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2018, V.47, P. 195–203.
76. Phillips D.C., The hen-egg white lysozyme molecule // *PNAS*, 1967, V. 57. P. 483–495.

77. Bowman A. L., Grant I. M., Mulholland A. J. ,QM/MM simulations predict a covalent intermediate in the hen egg white lysozyme reaction with its natural substrate // Chem Comm, 2008, V.37, P. 4425–4427.
78. Koshland D. E., Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reaction // Biol Rev, 1953, V. 28, P. 416–436.
79. Silveti T., Morandi S., Hintersteiner M., Brasca M., Use of hen-egg white lysozyme in the food industry // Egg Innovations and Strategies for Improvements, 2017, P. 233–242.
80. Held J., van Smaalen S., The active site of hen-egg white lysozyme: flexibility and chemical bonding // Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 2014, V.70, P. 1136–1146.
81. Hadfield A. T., Harvey D. J., Archer D. B., Mac Kenzie D. A., Jeenes D. J., Radford S. E., Lowe G., Dobson C. M., Johnson L. N., Crystal structure of the mutant D52S hen egg white lysozyme with an oligosaccharide product // Journal of Molecular Biology, 1994, V. 243, P. 856–872.
82. Vocadlo D.J., Davies G.J., Laine R., Withers S.G., Catalysis by hen-egg white lysozyme proceeds via a covalent intermediate // Natureб 2001, V. 412, P. 835–838.
83. Березин И. В., Клесов А. А., Рабинович М. Л., Кинетика ферментативных реакций в гетерогенных системах. I. Кинетические закономерности расщепления бактериальных клеток *Micrococcus lysodeikticus* под действием лизоцима // Биоорг химия, 1976, Т. 2(5), С. 680-688
84. Рабинович М. Л., Клесов А. А., Березин И. В. Кинетика ферментативных реакций в гетерогенных системах. II. Бактериолитическое действие лизоцима на клетки *Micrococcus lysodeikticus* // Биоорг Химия, 1976, Т. 2(5), С. 689–699.

85. Sonaimuthu M., Nerthigan Y., Swaminathan N, Sharma N., Wu H. -F. Photoluminescent hydrophilic cyclodextrin-stabilized cysteine-protected copper nanoclusters for detecting lysozyme // *Anal Bioanal Chem*, 2020, V. 412(26), P. 7141–7154.
86. Nanjo F., Sakai K., Usui T., P-nitrophenyl penta-N-acetyl-beta-chitopentaoside as a novel synthetic substrate for the colorimetric assay of lysozyme // *J Biochem*, 1988, V. 104(2), P. 255–258.
87. Usui T., Hayashi Y., Nanjo F., Ishido Y., Enzymatic synthesis of p-nitrophenyl N,N',N'',N''',N''''-pentaacetyl-beta-chitopentaoside in water-methanol system; significance as a substrate for lysozyme assay // *BBA*, 1988, V. 23(953), P. 179–184.
88. Mörsky P., Turbidimetric determination of lysozyme with *Micrococcus lysodeikticus* cells: reexamination of reaction conditions // *Anal Biochem*, 1983, V. 128 (1), P. 77–85.
89. Miller T. E., Killing and Lysis of Gram-negative Bacteria Through the Synergistic Effect of Hydrogen Peroxide, Ascorbic Acid, and Lysozyme // *J Bacteriol*. 1969, V. 98 (3), P. 949–955.
90. Nakimbugwe D.; Masschalck B.; Anim G.; Michiels C. W., Inactivation of gram-negative bacteria in milk and banana juice by hen egg white and lambda lysozyme under high hydrostatic pressure // *Int J Food Microbiol*, 2006, V. 112 (1), P. 19–25.
91. Mitchell G. J., Nelson D. C., Weitz J. S. Quantifying enzymatic lysis: Estimating the combined effects of chemistry, physiology and physics. // *Phys Biol*, 2010, V. 7(046002). P. 1–12.
92. Leive L., The barrier function of the gram-negative envelope. // *Ann N Y Acad Sci*, 1974, V. 10(235), P. 109–129.
93. Osborn M. J., Rick P. D., Lehmann V., Rupprecht E., Singh M., Structure and biogenesis of the cell envelope of gram-negative bacteria. // *Ann N Y Acad Sci*. 1974, V. 10(235), P. 52–65.

94. Dias R., Vilas-Boas E., Campos F. M., Hogg T., Couto J. A. Activity of lysozyme on *Lactobacillus hilgardii* strains isolated from Port wine. // Food Microbiol, 2015, V. 49, P. 6–11.
95. Hoffmann S., Walter S., Blume A. -K., Fuchs S., Schmidt Ch., Scholz A, Gerlach R. G., High-Throughput Quantification of Bacterial-Cell Interactions Using Virtual Colony Counts // Front Cell Infect Microbiol, 2018, V. 8(43), P. 1–10.
96. Seccareccia I., Kost Ch., Nett M., Quantitative Analysis of Lysobacter Predation // Appl Environ Microbiol, 2015, V. 81(20), P. 7098–7105.
97. Merek EL. Estimating the size and concentration of unicellular microorganisms by light scattering. Appl Microbiol. 1969;17(2):219-221.
98. Myers J. A., Curtis B. S., Curtis W. R. Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density // BMC Biophys, 2013, V. 6(4), P.1-15.
99. Hecht A., Endy D., Salit M., Munson M. S., When wavelengths collide: bias in cell abundance measurements due to expressed fluorescent proteins // ACS Synth Biol, 2016, V. 5, P. 1024–1027.
100. Stevenson K., McVey A. F., Clark I. B., Swain P. S., Pilizota, T., General calibration of microbial growth in microplate readers // Sci Rep, 2016, V. 6, 38828.
101. Beal J., Farny N. G., Haddock-Angelli T., Selvarajah V., Baldwin G. S., Buckley-Taylor R., Gershater M., Kiga D., Marken J., Sanchania V., Sison A., Workman Ch. T., Robust estimation of bacterial cell count from optical density // Commun Biol, 2020, V. 3, 512.
102. Loutfi, H., Pellen, F., Le Jeune, B. Lteif R, Kallassy M, Le Brun G, Abboud M. Real-time monitoring of bacterial growth kinetics in suspensions using laser speckle imaging. Sci Rep 10, 408 (2020). 1-10.

103. Atherton E., Peters R.H., Some Aspects of Light Scattering from Polydisperse Systems of Spherical Particles // Br J Appl Phys, 1953, V. 4, P. 344–349.
104. Heller W., Pangonis W.J., Theoretical Investigations on the Light Scattering of Colloidal Spheres. I. The Specific Turbidity. // J Chem Phys, 1957, V. 26, P. 498–506.
105. W. Heller, ‘Theoretical Investigations on the Light Scattering of Colloidal Spheres. III. Analytical Expressions for the Turbidity Approximating the Performance of the Mie Equations Prior to the First Maximum. // J Chem Phys, 1957, V. 26, P. 1258–1264.
106. Kourti, T., Turbidimetry in Particle Size Analysis. In Encyclopedia of Analytical Chemistry, Online (eds. R.A. Meyers and R.B. Flippen). 2006. John Wiley & Sons.
107. Deckers D., Masschalck B., Aertsen A., Callewaert L., van Tiggelen C. G. M., Atanassova M., Michiels C. W., Periplasmic lysozyme inhibitor contributes to lysozyme resistance in *Escherichia coli* // Cell Mol Life Sci, 2004, V.61(10), P. 1229–1237.
108. Clarke C. A., Scheurwater E. M., Clarke A. J., The vertebrate lysozyme inhibitor Ivy functions to inhibit the activity of lytic transglycosylase // J Biol Chem, 2010, V. 285(20), P. 14843–14847.
109. Monchois V., Abergel C., Sturgis J., Jeudy S., Claverie J. M., *Escherichia coli* ykfE ORFan gene encodes a potent inhibitor of C-type lysozyme // J Biol Chem, 2001, V. 276(21), V. 18437–18441.
110. Abergel C., Monchois V., Byrne D., Chenivresse S., Lembo F., Lazzaroni J. C., Claverie J. -M., Structure and evolution of the Ivy protein family, unexpected lysozyme inhibitors in Gram-negative bacteria // PNAS, 2007, V. 104(15), P. 6394–6399.

111. Avery K. L., Peixoto C., Barcellona M., Bernards M. T., Hunt. H. K., Lysozyme sorption by pure-silica zeolite MFI films // *Materials Today Comm*, 2019, V. 19, P. 352–359.
112. Klint D., Eriksson H., Conditions for the Adsorption of Proteins on Ultrastable Zeolite Y and Its Use in Protein Purification // *Protein Expr Purif*, 1997, V. 10(2), P. 247-255.
113. Vervalde A. M., Vervalde E. N., Burikov S. A., Patsaeva S. V., Kalyagina N. A., Borisova N. E., Vlasov I. I., Shenderova O. A., Dolenko T. A., Bilayer adsorption of lysozyme on nanodiamonds in aqueous suspensions // *J. Phys. Chem. C*, 2020, V. 124(7). P. 4288–4298.
114. Hughey V. L., Johnson E. A., Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and food-borne disease // *Appl Environ Microbiol*, 1987, V. 53(9), P. 2165-2170.
115. Masschalck B., van Houdt R., van Haver E. G. R., Michiels C.W., Inactivation of gram-negative bacteria by lysozyme, denatured lysozyme, and lysozyme-derived peptides under high hydrostatic pressure // *Appl Environ Microbiol*, 2001, V. 67(1), P. 339–344.
116. Saito H., Sakakibara Y., Sakata A., Kurashige R., Murakami D., Kageshima H., Saito A., Miyazaki Y., Antibacterial activity of lysozyme-chitosan oligosaccharide conjugates (LYZOX) against *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *PLoS One*, 2019; V. 14(5), e0217504.
117. Shimada J., Moon S. K., Lee H. -Y., Takeshita T., Pan H. -Q., Woo J. -I., Gellibolian R., Yamanaka N., Lim D. J., Lysozyme M deficiency leads to an increased susceptibility to *Streptococcus pneumoniae*-induced otitis media // *BMC Infect Dis*, 2008, V. 8(134). P. 1–11.
118. Osserman E. F., Klockars M., Halper J., Fischel R. E., Effects of lysozyme on normal and transformed mammalian cells // *Nature*, 1973, V. 243, P. 331–335.

119. Oevermann A., Engels M., Thomas U., Pellegrini A., The antiviral activity of naturally occurring proteins and their peptide fragments after chemical modification // *Antiviral Res*, 2003, V. 59, P. 23–33.
120. Hayashi, M., Okabe, J., and Hozumi, M. Sensitization of resistant myeloid leukemia clone cells by anti-cancer drugs to factor-stimulating differentiation // *Gan*, 1979, V. 70, P. 235–238.
121. Qi L., Ostrand-Rosenberg S., MHC class II presentation of endogenous tumor antigen by cellular vaccines depends on the endocytic pathway but not H2-M // *Traffic*, 2002, V.1, P.152–160.
122. Siwicki A. K., Klein P., Morand M., Kiczka W., Studnicka M. Immunostimulatory effects of dimerized lysozyme (KLP-602) on the nonspecific defense mechanisms and protection against furunculosis in salmonids // *Vet Immunol Immunopathol*, 1998, V. 61, P. 369–378.
123. King A. E., Critchley H. O., Kelly R. W., Innate immune defences in the human endometrium // *Reprod Biol Endocrinol*, 2003, V. 1(116), P. 1–8.
124. Lee-Huang S., Maiorov V., Huang P. L., Ng A., Lee H. Ch., Chang Y. -T., Kallenbach N., Huang P. L., Chen H. -Ch., Structural and Functional Modeling of Human Lysozyme Reveals a Unique Nonapeptide, HL9, With anti-HIV Activity // *Biochemistry*, 2005, V. 44(12), P. 4648–4655.
125. Ibrahim H. R., Thomas U., Pellegrini A., A helix-loop-helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action // *J Biol Chem*, 2001, V. 276(47), P. 43767–43774.
126. Lee-Huang S., Huang P.L., Sun Y.T., Huang P.L., Kung H.-F., Blithe D.L., Chen H.-Ch., Lysozyme and RNases as anti-HIV components in β -core preparations of human chorionic gonadotropin // *PNAS*, 1999; V. 96(6), P. 2678–2681.
127. Steinrauf L.K., Shiuan D., Yang W.J., Chiang M.Y., Lysozyme Association With Nucleic Acids // *BBRC*, 1999, V. 266(2), P. 366–370.

128. Крюкова О.В. Поиск эндогенных эффекторов ангиотензин превращающего фермента человека в плазме крови человека. Дисс канд хим наук, М. МГУ. 2018
129. Daniel M., Gaikwad V., Verghese M., Abraham R., Kapoor R., Serum lysozyme (muramidase) levels in intra-abdominal abscesses: an experimental study // *Indian J Surg*, 2015, V. 77, P. 117–119.
130. Bascoul S., Peraldi M., Merino A.L., Lacave C., Cannat A., Serre A., Stimulating activity of Brucella fractions in a human lymphocyte transformation test. Correlation with humoral and cellular immunity // *Immunology*, 1976; V. 31(5), P. 717–722.
131. Stull D., Gillis S., Constitutive production of interleukin 2 activity by a T cell hybridoma // *J Immunol*, 1981; V. 126(5), P. 1680–1683.
132. Oldham G., Williams L., Interleukin 2 (IL-2) production by mitogen stimulated bovine peripheral blood lymphocytes and its assay // *Veterinary Immunology and Immunopathology*, V 7 (3–4), 1984, P 201-212
133. Brandhuber B. J., Boone T., Kenney W. C., McKay D. B., Three-dimensional structure of interleukin-2 // *Science*, 1987; V. 238(4834), P. 1707-1709.
134. Meuer S. C., Dumann H., Meyer zum Büschenfelde K. H., Köhler H., Low-dose interleukin-2 Induces Systemic Immune Responses Against HBsAg in Immunodeficient Non-Responders to Hepatitis B Vaccination // *Lancet*, 1989, V. 1(8628), P. 15–8.
135. Ellner J. J., Wallis R. S., Immunologic aspects of mycobacterial infections // *Rev Infect Dis*, 1989, V.11(Suppl 2), P. S455-S459.
136. Gearing A.J. , Thorpe R., The international standard for human interleukin-2. Calibration by international collaborative study // *J Immunol Methods*, 1988, V. 114(1–2), P. 3–9.

137. Hermann G. G., Geertsen P. F., von der Maase H., Steven K., Andersen C., Hald T., Zeuthen J., Recombinant interleukin-2 and lymphokine-activated killer cell treatment of advanced bladder cancer: clinical results and immunological effects // *Cancer research*, 1992, V. 52(3), P. 726–733.
138. Lesniak M.S., Tyler B.M., Pardoll D.M., Brem H., Gene Therapy for Experimental Brain Tumors Using a Xenogenic Cell Line Engineered to Secrete hIL-2 // *J Neurooncol*, 2003, V. 64, P. 155–160.
139. Ponnuraj K., Xu Y., Macon K., Moore D., Volanakis J. E., Narayana S. V., Structural analysis of engineered Bb fragment of complement factor B: insights into the activation mechanism of the alternative pathway C3-convertase // *Mol Cell*, 2004, V.14(1), P. 17-28.
140. Mortensen S., Jensen J. K., Andersen G. R., Solution Structures of Complement C2 and Its C4 Complexes Propose Pathway-specific Mechanisms for Control and Activation of the Complement Proconvertases // *J Biol Chem*, 2016, V. 291(32), P. 16494-16507.
141. Nagasawa S., Stroud R. M., Cleavage of C2 by C1s into the antigenically distinct fragments C2a and C2b: demonstration of binding of C2b to C4b // *PNAS*, 1977, V. 74(7), P. 2998-3001.
142. Dang Y., Shen Y., Xu X., Wang S., Meng X., Zhang M., Lü L., Wang, R., Li, J., Complement component Bf/C2b gene mediates immune responses against *Aeromonas hydrophila* in grass carp *Ctenopharyngodon idella* // *Fish & shellfish immunology*, 2018, V. 74, P. 509–516.
143. Thiel S., Petersen S. V., Vorup-Jensen T., Matsushita M., Fujita T., Stover C. M., Schwaeble W. J., Jensenius J. C., Interaction of C1q and mannan-binding lectin (MBL) with C1r, C1s, MBL-associated serine proteases 1 and 2, and the MBL-associated protein MAp19. *Journal of immunology*, 2000, V. 165(2), P. 878–887.

144. Gadjeva M. G., Rouseva M. M., Zlatarova A. S., Reid K. B. M., Kishore U., Kojouharova M. S., Interaction of Human C1q with IgG and IgM: Revisited // *Biochemistry*, 2008, V.47 (49), P. 3093-13102.
145. Almitairi J. O. M., Venkatraman Girija U., Furze C. M., Simpson-Gray X., Badakshi F., Marshall J. E., Schwaeble W. J., Mitchell D. A., Moody P. C. E., Wallis R., Structure of the C1r-C1s interaction of the C1 complex of complement activation // *PNAS*, 2018, V.115(4), P.768-773.
146. Poppelaars F, Faria B, Gaya da Costa M, Franssen C.F.M., van Son W. J., Berger S. P., Daha M. R., Seelen M. A., The Complement System in Dialysis: A Forgotten Story? // *Front Immunol*, 2018, V.9, P(71).
147. Krishnan V., Xu Yu. Yu., Macon K., Volanakis J. E., Narayana S. V., The crystal structure of C2a, the catalytic fragment of classical pathway C3 and C5 convertase of human complement // *J Mol Biol*, 2007, V. 367(1), P.224-233.
148. Campbell R. D., The Molecular Genetics and Polymorphism of C2 and Factor B // *Br Med Bull*, 1987, V.43(1), P. 37-49.
149. Krishnan V., Xu Y. Y., Macon K., Volanakis J. E., Narayana S. V. L., The structure of C2b, a fragment of complement component C2 produced during C3 convertase formation // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2009, V. 65(3), P. 266–274.
150. Reddy Y. N. V., Siedlecki A. M., Francis J. M., Breaking Down the Complement System: A Review and Update on Novel Therapies // *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2017, V. 26(2), P. 123-128.
151. Trouw L., Pickering M., Blom A. The complement system as a potential therapeutic target in rheumatic disease // *Nat Rev Rheumatol*, 2017, V.13, P. 538–547.
152. Zhang Y. -K., Li X., Zhao H. -R., Jiang F., Wang Zh. -H., Wu W. -X., Antibodies Specific to Membrane Proteins Are Effective in Complement-

- Mediated Killing of *Mycoplasma bovis* // *Infect Immun*, 2019, V. 87(12), e00740-19.
153. Chasteen N. D., Human serotransferrin: structure and function // *Coord Chem Rev*, 1977, V. 22(1–2), P. 1–36.
 154. Chung M. Ch. -M., Structure and function of transferrin // *Biochem Education*, 1984, V. 12(4), P 146–154.
 155. Andrés M T., Fierro J F., Antimicrobial Mechanism of Action of Transferrins: Selective Inhibition of H⁺-ATPase // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010, V. 54(10), P. 4335–4342.
 156. Bruhn K.W., Spellberg B., Transferrin-mediated iron sequestration as a novel therapy for bacterial and fungal infections // *Curr Opin Microbiol*, 2015, V. 27, P. 57-61.
 157. Gaspar R., Pushed off target with proteins // *Nature Nanotech*, 2013, V. 8, P. 79–80.
 158. Wang Sh. -H., Kaltashov I. A., Identification of reduction-susceptible disulfide bonds in transferrin by differential alkylation using ¹⁶O/¹⁸O labeled iodoacetic acid // *J Am Soc Mass Spectrom*, 2015, V.26(5), P. 800–807.
 159. Yang X. -K., Wang N., Yang Ch., Wang Y. -M., Che T. -J., Differential protein expression in patients with urosepsis // *Chinese Journal of Traumatology*, 2018, V. 21(6), P. 316–322.
 160. Lancheros-Buitrago J., Rodriguez-Villamil P., Gregory J., Bastos H., Camacho C. A., Caballeros J. E., Cazalesa N., Barros E., José de Jesus Silva M., Pimentel A., Mattos R. C., Ceruloplasmin, serotransferrin and albumin presented different abundance in mares' uterine fluid five days after insemination // *Theriogenology*, 2019, V. 148, P. 194–200.
 161. Valenta C., Bernkop-Schnurch A., Schwartz M. Modification of lysozyme with cinnamaldehyde: A strategy for constructing novel preservatives for dermatics // *Int J of Pharm*, 1997, V. 148. P. 131–137.

162. Bernkop-Schnürch A., Krist S., Vehabovic M., Valenta C., Synthesis and evaluation of lysozyme derivatives exhibiting an enhanced antimicrobial action // *Eur J Pharm Sci*, 1998. V. 6(4), P. 303–309.
163. Aminlari L., Hashemi M. M., Aminlari M., Modified Lysozymes as Novel Broad Spectrum Natural Antimicrobial Agents in Foods // *J Food Sci*, 2014. V. 79(6), P. R1077.
164. Ashakirin S. N., Tripathy M., Patil U. K., Majeed A. B. A., Chemistry and bioactivity of cinnamaldehyde: a natural molecule of medicinal importance // *Int J Pharm Sci Res*, 2017, V. 8(6), P. 2333–2340.
165. Sonboli A., Gholipour A., Yousefzadi M., Antibacterial activity of the essential oil and main components of two *Dracocephalum* species from Iran // *Nat Prod Res*, 2012, V. 26, P. 2121–2125.
166. Ibrahim H. R., Kato A., Kobayashi K., Antimicrobial effects of lysozyme against gram-negative bacteria due to covalent binding of palmitic acid // *J Agric Food Chem*, 1991, V. 39, P. 2077–2082.
167. Ibrahim H. R., Hatta H, Fujiki M., Kim M., Yamamoto T., Enhanced antimicrobial action of lysozyme against Gram-negative and Gram-positive bacteria due to modification with perillaldehyde // *J Agric Food Chem*, 1994, V.42, P. 1813–1817.
168. Liu S., Sugimoto T., Azakami H., Kato A., Lipophilization of lysozyme by short and middle chain fatty acids // *J Agric Food Chem*, 2000, V. 48, P. 265–269.
169. Liu S., Azakami H, Kato A., Improvement in the Yield of Lipophilized Lysozyme by the Combination with Maillard-Type Glycosylation // *Nahrung*, 2000, V. 44. P. 407–410.
170. Takahashi K., Lou X., Ishii Y., Hattori M., Lysozyme-glucose stearic acid monoester conjugate formed through the Maillard reaction as an antibacterial emulsifier // *J Agric Food Chem*, 2000, V. 48, P. 2044–2049.

171. Ramezani R, Esmailpour M, Aminlari M., Effect of conjugation with glucosamine on the functional properties of lysozyme and casein // *J Sci Food Agric*, 2008, V. 88, P. 2730–2737.
172. Dekina S. S., Romanovska I. I., Ovsepyan A. M., Molodaya A. L., Pashkin I. I., Immobilization of lysozyme in polyvinyl alcohol cryogel // *Biotechnol Acta*, 2014, V. 7(3). P. 69–73.
173. Kao K. -Ch., Lin T. -S., Mou Ch. -Y., Enhanced Activity and Stability of Lysozyme by Immobilization in the Matching Nanochannels of Mesoporous Silica Nanoparticles // *J Phys Chem C*, 2014, V. 118. P. 6734–6743.
174. Jiang S.S., Qin Y., Yang J., Li M., Xiong L., Sun Q.J. Enhanced antibacterial activity of lysozyme immobilized on chitin nanowhiskers // *Food Chem*, 2017, V. 221, P. 1507–1513.
175. Lian Z. X., Ma Zh. S., Wei J., Liu H., Preparation and characterization of immobilized lysozyme and evaluation of its application in edible coatings // *Proc Biochem*, 2012, V.47(2), P. 201–208.
176. Wu Y., Daeschel M.A., Lytic Antimicrobial Activity of Hen Egg White Lysozyme Immobilized to Polystyrene Beads // *J Food Sci*, 2007, V. 72(9), P. M369–M374.
177. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J., Engel J., *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, 545 p.
178. De Man J.D., Rogosa M., Sharpe M.E., A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. // *Journal of Applied Bacteriology*, 1960, V. 23, P. 130–135.
179. Галынкин В. А., Заикина Н. А., Кочеровец В. И., Курбанова И.З. Питательные среды для микробиологического контроля качества лекарственных средств и пищевых продуктов. СПб, Проспект науки, 2006, 304 с.
180. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М., Практикум по микробиологии, М, Академия, 2005, 608 с.

181. Brock T. D., Edwards M. R., Fine Structure of *Thermus aquaticus*, an Extreme Thermophile // *J Bacteriol*, 1970, V. 104, P. 509-517.
182. Bradford M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal Biochem*, 1976, V. 72, P. 248–254
183. Goa J., A micro biuret method for protein determination; determination of total protein in cerebrospinal fluid // *Scand J Clin Lab Invest*, 1953, V. 5, P. 218–222.
184. Levashov P.A., Sutherland D.S., Besenbacher F., Shipovskov S., A robust method of determination of high concentrations of peptides and proteins // *Anal Biochem*, 2009, V. 395, P. 111–112.
185. Levashov P.A., Ovchinnikova E.D., Afanas'eva M.I., Frid D.A., Az'muko A.A., Besspalova Zh.D., Adamova I.Yu., Afanas'eva O.I., Pokrovskii S.N., Affinity sorbent based on tryptophyl-threonyl-tyrosine for binding of the immunoglobulins G: sorption characteristics and aspects of practical application // *Rus J Bioorg Chem*, 2012, V. 38, P. 46–50.
186. Velick, S.F., Furfine, C. in *The Enzymes* (Boyer, P.D., Lardy, H., and Myrback, K., eds), V. 7, 2nd ed., Acad Press NY, 1963, P. 243–273.
187. Северин С.Е., Соловьева Г.А., Практикум по биохимии, М, МГУ, 1989, 509 с.
188. Зуев В.А., Литическая активность бактериальных вирусов, М, Медицина, 1969, 184 с.
189. Скоупс Р., Методы очистки белков, Пер. с англ. Антонов В.К., М, Мир, 1985, 197 с.
190. Остерман Л.А., Хроматография белков и нуклеиновых кислот, М, Наука, 1985, 109 с.
191. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*, 1970, V. 227, P. 680–685.

192. Гусаков А.В., Семенова М.В., Сеницын А.П., Масс-спектрометрия в исследовании продуцируемых микроскопическими грибами внеклеточных ферментов // Масс-спектрометрия, 2010, Т. 7, С. 5–20.
193. Fields R., The rapid determination of amino groups with TNBS // *Methods Enzymol*, 1972, V. 25, P. 464–468.
194. Mokrasch L., Use of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid for the coestimation of amines, amino acids, and proteins in mixtures. // *Anal Biochem*, 1967, V. 18, P. 64–71.
195. Kleopina G., Kravchenko N., Kaverzneva E., Role of the 6-amino groups of lysine in lysozyme // *Bull Acad Sci USSR Div Chem Sci*, 1965, V. 14, P. 806–812.
196. Porath J., Axe R., Immobilization of enzymes to agar, agarose, and Sephadex supports // *Methods Enzymol*, 1976, V. 44, P. 19–45.
197. Guisán J.M., Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes // *Enzyme and Microbial Technology*, 1988, V. 10, P. 375–382.
198. Matsuura K., Asano Y., Yamada A., Naruse K., Detection of *Micrococcus Luteus* Biofilm Formation in Microfluidic Environments by pH Measurement Using an Ion-Sensitive Field-Effect Transistor // *Sensors*, 2013, V. 13, P. 2484–2493.
199. Schaumberger S., Ladinig A., Reisinger N., Ritzmann M., Schatzmayr G., Evaluation of the endotoxin binding efficiency of clay minerals using the *Limulus* amoebocyte lysate test: an in vitro study // *AMB Express*, 2014, V. 4, P. 1–9.
200. Jager, F.C., Determination of vitamin E requirement in rats by means of spontaneous haemolysis in vitro // *Eur Rev Nutr Diet*, 1968, V. 10, P. 215–223.
201. Schmaldienst S., Goldammer A., Spitzauer S., Derfler K., Horl W. H., Knobl P., Local anticoagulation of the extracorporeal circuit with heparin

- and subsequent neutralization with protamine during immunoadsorption // Am J Kidney Dis, 2002, V. 36, 4900497.
202. Davies R. C., Neuberger A., Wilson B. M. The dependence of lysozyme activity on pH and ionic strength // BBA, 1969, V. 178(2), P. 294-305.
 203. Saint-Blancard J., Maurel J. P., Constant J. F., Berthou J., Jolles P., Influence of pH and ionic strength on the lysis of *Micrococcus luteus* cells by hen lysozyme at low (20°C) and high (physiological, 40°C) temperature // Bioscience Reports, 1981, V.1(2), P. 119–123.
 204. Xue Q. G., Hellberg M. E., Schey K. L., Itoh N., Eytan R. I., Cooper R. K., La Peyre J. F., A new lysozyme from the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and a possible evolutionary pathway for i-type lysozymes in bivalves from host defense to digestion // BMC Evol Biol, 2010, V. 10(213), P. 1-17.
 205. Jensen H. B., Kleppe K., Effect of ionic strength, pH, amines and divalent cations on the lytic activity of T4 lysozyme // Eur J Biochem, 1972, V. 28(1), P. 116-122.
 206. Murao S., Kato M., Wang S.-L, Hoshino M., Arai M., Isolation and Characterization of a Novel Hen Egg White Lysozyme Inhibitor from *Bacillus subtilis* I-139 // Agricultural and Biological Chemistry, 1990, V. 54(5), P. 1129-1136.
 207. Martin N. I., Hu H., Moake M. M., Churey J. J., Whittal R., Worobo R. W., Vederas J. C., Isolation, structural characterization, and properties of mactacin (polymyxin M), a cyclic peptide antibiotic produced by *Paenibacillus kobensis* M. // J Biol Chem, 2003, V. 278: P. 13124–13132.
 208. Dubashynskaya N.V., Skorik Yu. A., Polymyxin Delivery Systems: Recent Advances and Challenges // Pharmaceuticals, 2020, V. 13(5), 83.
 209. <http://www.uniprot.org/uniprot/A5YBU8>
 210. <http://www.uniprot.org/uniprot/P19114>

211. Arenas-Ramirez N., Woytschak J., Boyman O., Interleukin-2: Biology, Design and Application // Trends in Immunology, 2015, V.36 (12), P. 763–777.
212. <https://www.uniprot.org/uniprot/C9JVG0>
213. Page M. G. P., The Role of Iron and Siderophores in Infection, and the Development of Siderophore Antibiotics, // Clinical Infectious Diseases, 2019, V.69, (S7), P. S529–S537.
214. Bricas E., Ghuysen J.-M., Dezelée P. The cell wall peptidoglycan of *Bacillus megaterium* KM. I. Studies on the stereochemistry of alpha, alpha'-diaminopimelic acid // Biochemistry, 1967, V. 6(8), P. 2598–2607.
215. Okada S., Suzuki Y., Kozaki M., A new heterofermentative *Lactobacillus* species with meso-diaminopimelic acid in peptidoglycan, *Lactobacillus vaccinostercus* Kozaki and Okada sp. nov. // J Gen Appl Microbiol, 1979, V. 25, P. 215–221.
216. Van Heijenoort J., Elbaz L., Dezelee P, Petit J.F, Bricas E., Ghuysen J.M., Structure of the meso-diaminopimelic acid containing peptidoglycans in *Escherichia coli* B and *Bacillus megaterium* KM // Biochemistry, 1969, V. 8(1), P. 207–213.
217. Day A., White P.J., Enzymic assays for isomers of 2,6-diaminopimelic acid in walls of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium* // Biochem J, 1977, V. 161(3), P. 677–685.
218. Berges D.A., DeWolf W.E.Jr, Dunn G.L., Grappel S.F., Newman D.J., Taggart J.J., Gilvarg C., Peptides of 2-aminopimelic acid: antibacterial agents that inhibit diaminopimelic acid biosynthesis // J Med Chem, 1986, V. 29(1), P. 89–95.
219. Ikawa M., Snell E.E., Cell wall composition of lactic acid bacteria // J Biol Chem, 1960, V. 235, P. 1376–1382.

220. Warth A.D., Strominger J.L., Structure of the peptidoglycan of bacterial spores: occurrence of the lactam of muramic acid // PNAS, 1969, V. 64(2), P. 528–535.
221. Campos M.A., Vargas M.A., Regueiro V., Llompart C.M, Albert H S., Bengoechea J.A., Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides // Infection and immunity, 2004, V. 72(12), P. 7107–7114.
222. Ginsburg I., Koren E., Feuerstein O., Is bacteriolysis in vivo a friend or a foe? relation to sepsis, chronic granulomatous inflammation and to oral disorders: an overview hypothesis // SOJ Microbiol Infect Dis, 2015, V. 3(1), P. 1–8.
223. Abe Y., Kubota M., Takazaki S., Ito Y., Yamamoto H., Kang D., Ueda T., Imoto T., Effect on catalysis by replacement of catalytic residue from hen egg white lysozyme to *Venerupis philippinarum* lysozyme. // Protein Science, 2016, V.25, P. 1637-1647.
224. Ford L. O., Johnson L. N., Machin P. A., Phillips D. C., Tjian R., Crystal structure of a lysozyme-tetrasaccharide lactone complex // J Mol Biol, 1974, V. 88(2), P. 349-371.
225. Godjayev N. M., Akyüz S., Ismailova L., The conformational properties of Glu 35 and Asp 52 of lysozyme active center // ARI - An International Journal for Physical and Engineering Sciences, 1998, V. 51, P. 56–60.
226. https://www.wwpdb.org/pdb?id=pdb_00001dpx
227. <https://www.uniprot.org/uniprot/P60568>
228. https://www.wwpdb.org/pdb?id=pdb_00001m47
229. Minami M., Ando T., Hashikawa S., Torii K., Hasegawa T., Israel D.A., Ina K., Kusugami K., Goto H., Ohta M., Effect of Glycine on *Helicobacter pylori* In Vitro // Antimicrob Agents Chemother, 2004, V. 48(10), P. 3782–3788.

230. Shah D., Shaikh A.R., Interaction of arginine, lysine, and guanidine with surface residues of lysozyme: implication to protein stability // *J Biomol Struct Dyn*, 2016, V. 34(1), P. 104–114.
231. Afonin P.V., Fokin A.V., Tsygannik I.N., Mikhailova I.Yu., Onoprienko L.V., Mikhaleva I.I., Ivanov V.T., Mareeva T.Yu, Nesmeyanov V.A., Li N., Pangborn W.A., Duax W.L., Pletnev V.Z., Crystal structure of an anti-interleukin-2 monoclonal antibody Fab complexed with an antigenic nonapeptide. // *Protein Sci*, 2001, V. 10(8), P. 1514–1521.
232. Liepinsh E., Konrade I., Skapare E., Pugovics O., Grinberga S., Kuka J., Kalvinsh I., Dambrova M.J., Mildronate treatment alters gamma-butyrobetaine and l-carnitine concentrations in healthy volunteers. // *Pharm. Pharmacol*, 2011, V. 63(9), P. 1195–1201.
233. Beitnere U., Dzirkale Z., Isajevs S., Rumaks J., Svirskis S., Klusa V., Carnitine congener mildronate protects against stress-and haloperidol-induced impairment in memory and brain protein expression in rats // *Eur. J. Pharmacol*, 2014, V. 745, P. 76–83.
234. Mizui M., Tsokos G.C. Low-Dose IL-2 in the Treatment of Lupus// *Curr Rheumatol Rep*, 2016, V. 18(11), 68.
235. Gill D.M., Stenehjem D.D., Parikh K., Merriman J., Sendilnathan A., Agarwal A.M., Hahn A.W., Gupta S., Tantravahi S.K., Samlowski W.E., Agarwal N., Conditional survival of metastatic renal cell carcinoma patients treated with high-dose interleukin-2 // *Ecancermedicalsecience*, 2016, V. 10, 676.
236. Mahmood M.E., Al-Koofee D.A.F., Effect of Temperature Changes on Critical Micelle Concentration for Tween Series surfactant. // *Global Journal of Science Frontier Research*, 2013, V. 13(4), P. 1–8.
237. Hammouda B., Temperature Effect on the Nanostructure of SDS Micelles in Water. // *J Res Natl Inst Stand Technol*, 2013, V. 118, P. 151–167.

238. Canfield R., The amino acid sequence of egg white lysozyme // *J Biol Chem*, 1963, V.238, P. 2698.
239. Morris C., Gray C., Giovannelli M., Early report: the use of Cytosorb™ haemabsorption column as an adjunct in managing severe sepsis: initial experiences, review and recommendations // *J Intensive Care Soc*, 2015, V. 16, P. 257–264.
240. Behre G., Schedel I., Nentwig B., Wörmann B, Essink M., Hiddemann W., Endotoxin concentration in neutropenic patients with suspected gram-negative sepsis: correlation with clinical outcome and determination of anti-endotoxin core antibodies during therapy with poly-clonal immunoglobulin M-enriched immunoglobulins // *Antimicrob Agents Chemother*, 1992, V. 36, P. 2139–2146.
241. Gonzalez-Quintela A., Alende R., Gude F., Campos J., Rey J., Meijide L.M., Fernandez-Merino C., Vidal C., Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities // *Clin Exp Immunol*, 2008, V. 151, P. 42–50.

Публикации по работе автора с соавторами

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus

- C1. Шнитко А.В., Чернышева М.Г., Смирнов С.А., Левашов П.А., Бадун Г.А., Плюроники и бридж-35 уменьшают бактериолитическую активность лизоцима // Вестник моск ун-та. сер 2, 2020, Т. 61(2), С. 114-118.
- C2. Levashov P.A., Matolygina D.A., Dmitrieva O.A., Ovchinnikova E.D., Adamova I.Yu, Karelina N.V., Nelyub V.A., Ereemeev N.L., Levashov A.V. Covalently immobilized chemically modified lysozyme as a sorbent for bacterial endotoxins (lipopolysaccharides) // Biotechnology Reports, 2019, V. 24, e00381, P. 1-6.
- C3. Левашов П.А., Матолыгина Д.А., Овчинникова Е.Д., Адамова И.Ю., Дмитриева О.А., Покровский Н.С., Еремеев Н.Л., Новый способ ковалентной иммобилизации лизоцима для получения препарата медицинского назначения // Биоорганическая химия, 2019, Т. 45(3), С. 265-271.
- C4. Левашов П.А., Матолыгина Д.А., Овчинникова Е.Д., Адамова И.Ю., Дмитриева О.А., Нуждина А.В., Покровский Н.С., Еремеев Н.Л. Новый сорбент на основе ковалентно иммобилизованного лизоцима для удаления бактериального липополисахарида (эндотоксина) из биологических жидкостей // Биохимия, 2019, Т 84(1), С. 100-108.
- C5. Levashov P.A., Matolygina D.A., Ovchinnikova E.D., Adamova I.Yu, Gasanova D.A., Smirnov S.A., Nelyub V.A., Belogurova N.G., Tishkov

- V.I., Ereemeev N.L., Levashov A.V. The bacteriolytic activity of native and covalently immobilized lysozyme against Gram-positive and Gram-negative bacteria is differentially affected by charged amino acids and glycine// FEBS OpenBio, 2019, V.9(3), P. 510-518.
- С6. Матолыгина Д.А., Душутина Н.С., Овчинникова Е.Д., Еремеев Н.Л., Белогурова Н.Г., Атрошенко Д.Л., Смирнов С.А., Савин С.С., Тишков В.И., Левашов А.В., Левашов П.А. Единый подход для расчета скорости ферментативного лизиса живых бактериальных клеточных субстратов турбидиметрическим методом // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия, 2018, Т. 59(2), С. 125-131.
- С7. Левашов П.А., Матолыгина Д.А., Овчинникова Е.Д., Атрошенко Д.Л., Савин С.С., Белогурова Н.Г., Смирнов С.А., Тишков В.И., Левашов А.В. Сравнение бактериолитической активности интерлейкина-2 человека и яичного куриного лизоцима в присутствии потенциальных эффекторов // Acta Naturae, 2017, Т 9(2), С. 87-92.
- С8. Левашов П.А., Овчинникова Е.Д., Морозова О.А., Матолыгина Д.А., Осипова Е.Э., Чердынцева Т.А., Савин С.С., Захарова Г.С., Алексеева А.А., Белогурова Н.Г., Смирнов С.А., Тишков В.И., Левашов А.В. Скрининг бактериолитической активности интерлейкина-2 человека и лизоцима куриного яйца на клетках различных микроорганизмов // Acta Naturae, 2016, Т. 8(1), С. 107-112.
- С9. Левашов П.А., Матолыгина Д.А., Осипова Е.Э., Савин С.С., Захарова Г.С., Гасанова Д.А., Белогурова Н.Г., Овчинникова Е.Д., Смирнов С.А., Тишков В.И., Левашов А.В. Сравнение бактериолитической активности интерлейкина-2 человека и яичного куриного лизоцима на клетках *Lactobacillus plantarum* и *Escherichia coli* // Вестник Московского университета, 2015, Серия 2: Химия, , Т. 56(6), С. 359-364.

- C10. Матолыгина Д.А., Осипова Е.Э., Смирнов С.А., Белогурова Н.Г., Еремеев Н.Л., Тишков В.И., Левашов А.В., Левашов П.А., Определение активности и измерение сорбции бактериолитического фермента в системе живых клеток *Lactobacillus plantarum* // Вестник Московского университета, 2015 Серия 2: Химия, Т. 56(6), С. 365-371.
- C11. Левашов П.А., Овчинникова Е.Д., Фрид Д.А., Азьмуко А.А., Афанасьева М.И., Коткина Т.И., Афанасьева О.И., Адамова И.Ю., Покровский С.Н., Аффиные гемосорбенты на основе ароматических пептидов для связывания иммуноглобулинов класса G // Биоорганическая химия, 2015, Т. 41(4), С. 1-6.
- C12. Левашов П.А., Овчинникова Е.Д., Афанасьева М.И., Фрид Д.А., Азьмуко А.А., Адамова И.Ю., Покровский С.Н. Тирамин и триптамин как лиганды аффиных сорбентов медицинского и биотехнологического назначения // Биоорганическая химия, 2015, издательство Наука (М.), Т. 41(1), С. 23-30.
- C13. Иванов Р.А., Соболева О.А., Смирнов С.А., Левашов П.А. Влияние поверхностно-активных веществ различной природы на бактериолитическую активность лизоцима // Биоорганическая химия, 2015, Т. 41(3), С. 292-298.
- C14. Левашов П.А., Седов С.А., Белогурова Н.Г., Шиповсков С.В., Левашов А.В. Бактериолитические свойства интерлейкина-2 человека // Биохимия, 2012, Т. 77 (11), С. 1567-1570.
- C15. Седов С.А., Белогурова Н.Г., Шиповсков С.В., Семёнова М.В., Гитинов М.М., Левашов А.В., Левашов П.А. Бактериолитические ферменты из плазмы крови барана // Биоорганическая химия, 2012, Т.38(3), С. 315-323.
- C16. Sedov S.A., Belogurova N.G., Shipovskov S., Levashov A.V., Levashov P.A., Lysis of *Escherichia coli* cells by lysozyme: Discrimination between

adsorption and enzyme action // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011, V. 88(1), P. 131-133.

- C17. Клячко Н.Л., Легоцкий С.А., Левашов П.А., Попова В.М., Белогурова Н.Г., Тимашева А.В., Дятлов И.А., Левашов А.В. Эндолизин бактериофага spz7: влияние эффекторов на каталитическую активность фермента в лизисе грамотрицательных микроорганизмов // *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия*, 2010, Т. 51(3), С. 222-226.
- C18. Левашов П.А., Попов Д.В., Попова В.М., Жиленков Е.Л., Морозова О.А., Белогурова Н.Г., Седов С.А., Дятлов И.А., Клячко Н.Л., Левашов А.В., Бактериолитические ферменты фага spz7: выделение и свойства // *Биохимия*, 2010, Т. 75 (9), С. 1299-1304.
- C19. Levashov P.A., Sedov S.A., Belogurova N.G., Levashov A.V., Shlpovskov S., Quantitative turbidimetric assay of enzymatic gram-negative bacteria lysis // *Analytical Chemistry*, 2010, V.82(5), P. 2161-2163.

Публикации по докладам на научных конференциях в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus

- T1 Levashov P., Matolygina D., Ovchinnikova E., Ushakova D., Burmakin V., Cherdyntseva T., Ereemeev N., Tishkov V., Levashov A., Bacteriolytic activity of human blood plasma serotransferrin, *FEBS open bio*, 2019, V. 9(S1), P. 72.
- T2. Matolygina D., Ovchinnikova E., Adamova I., Dmitrieva O., Nuzhdina A., Karelina N., Nelyub V., Pokrovsky N., Ereemeev N., Levashov P.,

- Immobilized lysozyme for removal of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) from biological fluids, FEBS open bio, 2019, V.9(S1), P. 209.
- T3. Matolygina D. A., Ereemeev N. L., Ovchinnikova E. D., Atroshenko D. L., Savin S. S., Smirnov S. A., Tishkov V. I. , Levashov A. V., Levashov P. A., Quantitative relationship between the rate of enzyme cell lysis determined by microbiological and turbidimetric techniques, FEBS Journal, 2017, V.284(S1), P.324.

Патенты

- П1. Левашов П. А., Адамова И. Ю., Нелюб В. А., Овчинникова Е. Д., Бородулин А. С., Матолыгина Д. А., Алешина Н. В., Способ сорбционного удаления целых патогенных бактериальных клеток из раствора с помощью автоклавированного иммобилизованного лизоцима, RU 2734538 C1, 20.10.2020, Бюл. № 29.
- П2. Левашов П. А., Адамова И. Ю., Матолыгина Д. А., Овчинникова Е. Д., Нелюб В. А., Буянов И. А., Чуднов И. В., Бородулин А. С., Способ ковалентной иммобилизации лизоцима для последующего применения иммобилизованного лизоцима для снижения бактериальной обсемененности биологических жидкостей, RU 2694883 C1, 17.07.2019, Бюл. № 20.
- П3. Левашов П. А., Адамова И. Ю., Матолыгина Д. А., Овчинникова Е. Д., Дмитриева О. А., Нуждина А. В., Нелюб В. А., Буянов И. А., Чуднов И. В., Бородулин А. С., Способ удаления эндотоксинов из биологических жидкостей с помощью ковалентно иммобилизованного лизоцима в качестве лиганда, RU 2684639 C1, 11.04.2019, Бюл. № 11.

- П4. Левашов П.А., Попов Д.В., Попова В.М., Дятлов И.А., Жиленков Е.Л., Морозова О.А., Белогурова Н.Г., Пугачев В.Г., Репин В.Е., Клячко Н.Л., Левашов А.В., Седов С.А., Легоцкий С.А., Способ получения ферментов фага SPZ7, RU 2460537 С2, 10.09.2012 Бюл. № 25.
- П5. Пугачев В.Г., Тотменина О.Д., Репин В.Е., Клячко Н.Л., Левашов П.А., Штамм бактериофага *Salmonella typhimurium* S-394, RU 2412243 С1, 20.02.2011, Бюл. № 5.

Автор выражает признательность коллегам, которые принимали участие в работе на разных этапах:

Левашов А.В., Тишков В.И., Белогурова Н.Г., Клячко Н.Л., Морозова О.А.,
Попова В.М., Дятлов И.А., Жиленков Е.Л., Попов Д.В., Пугачев В.Г.,
Репин В.Е., Матолыгина Д.А., Душутина Н.С., Овчинникова Е.Д.,
Седов С.А., Легоцкий С.А., Фрид Д.А., Азьмуко А.А., Коткина Т.И.,
Дмитриева О. А., Нуждина А. В., Афанасьева М.И., Афанасьева О.И.,
Адамова И.Ю., Покровский С.Н., Покровский Н.С., Матолыгина Д.А.,
Еремеев Н.Л., Атрошенко Д.Л., Смирнов С.А., Савин С.С., Шнитко А.В.,
Чернышева М.Г., Бадун Г.А. Нелюб В. А., Буянов И. А., Чуднов И. В.,
Бородулин А. С. Тотменина О.Д., Семёнова М.В, Серебрякова М.В.,
Гасанова Д.А., Иванов Р.А., Соболева О.А., Лу В.Ц., Захарова Г.С.,
Федорчук В.В., Осипова Е.Е., Чердынцева Т.А., Алексеева А.А.,
Карелина А.В., Шиповсков С.В., Гитинов М.М., Ушакова Д.А.,
Бурмакин В.В.