

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



ШНИТКО АЛЕКСЕЙ ВАЛЕРЬЕВИЧ

**ВЛИЯНИЕ ПЛЮРОНИКОВ L121, P123 И F127 НА
КОЛЛОИДНО-ХИМИЧЕСКИЕ, СТРУКТУРНЫЕ И
ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ СВОЙСТВА ЛИЗОЦИМА**

02.00.14 – радиохимия

03.01.04 – биохимия по химическим наукам

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

кандидата химических наук

Научные руководители:

к.х.н., доцент Чернышёва М.Г.,

к.х.н., с.н.с. Левашов П.А.

Москва – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1. 1. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПЛЮРОНИКОВ С БЕЛКАМИ.....	10
1.1.1. Номенклатура плюроников	10
1.1.2. Физико-химические свойства плюроников	10
1.1.3. Поведение плюроников на границе раздела фаз	14
1.1.4. Взаимодействие плюроников с белками.....	16
1.1.5. Конкурентная адсорбция плюроников и белков на границе раздела фаз	18
1.1.6. Влияние плюроников на структуру и ферментативные свойства белков	21
1.1.7. Молекулярный краудинг	28
1.1.8. Неспецифические взаимодействие и комплексообразование.....	29
1.1.9. Лизоцим как модельный белок	33
1.2. РАДИОХИМИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ИССЛЕДОВАНИЮ	35
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ И НПАВ	35
1.2.1. Радиоактивные изотопы в исследованиях белков и ПАВ	35
1.2.2. Методы введения тритиевой метки	40
1.2.3. Взаимодействие атомарного трития с органическими соединениями	48
1.2.4. Метод тритиевой планиграфии.....	53
1.2.5. Метод сцинтилляционной фазы.....	57
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	62
2.1. МАТЕРИАЛЫ.....	62
2.2. МЕТОДЫ.....	64
2.2.1. Определение молекулярно-массового распределения плюроников	64
2.2.2. Радионуклидные методы для исследования системы белок – НПАВ	64
2.2.3. Определение поверхностного натяжения на границе раздела жидкость/жидкость и жидкость/воздух с помощью метода висящей капли	68
2.2.4. Исследования комплексов лизоцим-НПАВ методами молекулярной спектроскопии.....	70
2.2.5. Измерение ферментативной активности.....	71

2.2.6. Молекулярный докинг	73
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	74
3.1. ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ПЛЮРОНИКОВ	74
3.2. ПОЛУЧЕНИЕ МЕЧЕННЫХ ТРИТИЕМ ЛИЗОЦИМА, P123 И БРИДЖ-35	76
3.3. ВЛИЯНИЕ ИОННОЙ СИЛЫ И ПРИРОДЫ АНИОНОВ НА ПОВЕДЕНИЕ ЛИЗОЦИМА НА МЕЖФАЗНОЙ ГРАНИЦЕ.....	78
3.4. ВЗАИМНОЕ ВЛИЯНИЕ ЛИЗОЦИМА И НПАВ ПРИ КОНКУРЕНТНОЙ АДСОРБЦИИ НА МЕЖФАЗНЫХ ГРАНИЦАХ ВОДНЫЙ РАСТВОР/ <i>n</i> -КСИЛОЛ И ВОДНЫЙ РАСТВОР/ВОЗДУХ	82
3.5. ВЛИЯНИЕ ДЛИНЫ ПЭО ЦЕПИ ПЛЮРОНИКОВ НА АДСОРБЦИЮ ЛИЗОЦИМА НА МЕЖФАЗНЫХ ГРАНИЦАХ ВОДНЫЙ РАСТВОР/ <i>n</i> -КСИЛОЛ И ВОДНЫЙ РАСТВОР/ВОЗДУХ	92
3.6. ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИЗОЦИМА С НПАВ С ПОМОЩЬЮ АТОМАРНОГО ТРИТИЯ.....	94
3.7. ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЛИЗОЦИМЕ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ.....	103
3.7. ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИЗОЦИМА В СОСТАВЕ КОМПЛЕКСОВ С ПЛЮРОНИКАМИ.....	110
3.8. МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИЗОЦИМА С ПЛЮРОНИКАМИ	122
ВЫВОДЫ	128
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	130

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БСА – бычий сывороточный альбумин
ГЛБ – гидрофильно-липофильный баланс
ГПХ – гельпроникающая хроматография
ДСН – додецилсульфат натрия
ДТАБ – додецилтриметиламмония бромид
ЖСС – жидкостно-сцинтилляционная спектрометрия
ККМ – критическая концентрация мицеллообразования
КД – круговой дихроизм
КТМ – критическая температура мицеллообразования
МТАТ – метод термической активации трития
НПАВ – неионогенное поверхностно-активное вещество
ОЕ – оптические единицы, единицы оптической плотности
ПАВ – поверхностно-активное вещество
ПО – пропиленоксид
ППО – полипропиленоксид
ПЭО – полиэтиленоксид
ПЭГ - полиэтиленгликоль
ПЭО – полиэтиленоксид
СФ – сцинтилляционная фаза
ТТАБ – тетрадецилтриметиламмония бромид
Тритон X-100 – *n*-третоктилфениловый эфир полиоксиэтиленгликоля
ХТ – химотрипсин
ЦТАБ – цетилметиламмония бромид
ЧСА – человеческий сывороточный альбумин
ЭО – этиленоксид
ЯМР – ядерный магнитный резонанс
CPM – counting per minutes – импульсы в минуту
PBS – phosphate-buffered saline – фосфатно-солевой буфер
SAXS – Small-angle X-ray scattering – малоугловое рентгеновское рассеяние

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Взаимодействие глобулярных белков и блок-сополимеров этиленоксида и пропиленоксида, называемых также плурониками, представляет большой интерес, как с точки зрения фундаментальной науки, так и с точки зрения практического применения. Плуроники нашли применение в медицине и фармакологии в первую очередь как модификаторы поверхностей для предотвращения адсорбции на них белков [1] и носители для направленной доставки лекарственных препаратов [2]. Мицеллы на основе плуроников с солюбилизированными лекарственными препаратами были первыми полимерными мицеллами, использованными для адресной доставки лекарств в экспериментах с животными [3], и первыми, прошедшими клинические испытания [4]. Относительно недавно было показано, что плуроники выступают в качестве модификаторов биологического ответа. Например, плуроники увеличивают чувствительность к противоопухолевым препаратам некоторых линий раковых клеток, в т.ч. обладающих лекарственной устойчивостью [5].

В настоящее время существует несколько теорий, объясняющих механизм возникновения повышенной чувствительности раковых клеток к противоопухолевым препаратам в присутствии плуроников [6, 7, 8]: во-первых, плуроники способствуют накоплению противораковых препаратов внутри клетки за счёт адсорбции на клеточных мембранах, что препятствует функционированию трансмембранных эффлюкс-транспортёров, таких как белок множественной лекарственной устойчивости (Pgp) и белок устойчивости к раку груди (BCRP); во-вторых, плуроники проникают внутрь клеточных митохондрий, подавляя митохондриальное дыхание и синтез АТФ, а уменьшение концентрации АТФ также подавляет активность Pgp и BCRP; в-третьих, взаимодействие плуроников с митохондриями способствует увеличению концентрации в клетке активных форм кислорода; в-четвёртых, связывание плуроников с митохондриями приводит к десорбции с поверхности наружной мембраны митохондрии цитохрома С, белка, запускающего процесс апоптоза [9]. В связи с этим, исследование особенностей взаимодействия плуроников с глобулярными белками, их влияния на структуру и каталитическую активность ферментов, представляется актуальной задачей.

Особый интерес вызывает самоорганизация белков и плуроников на межфазных границах. Использование радионуклидных методов для исследования таких систем позволяет получить информацию не только о количестве вещества в поверхностном слое, но и выявить его структурные особенности и определить характер межмолекулярных взаимодействий. Все это позволяет сделать **метод тритиевого зонда**, основанный на применении реакций атомарного трития и меченных тритием соединений. Совокупность радиохимических и классических спектрометрических подходов позволят выявить особенности самоорганизации лизоцима и плуроников на межфазных границах жидкость-жидкость, жидкость-газ, а также в объеме раствора.

Степень разработанности темы. Данные литературы о взаимодействии плуроников с белками носят фрагментарный характер. Практически нет информации о наличии/отсутствии и характере межмолекулярных взаимодействий между белками и плурониками, влиянии плуроников на адсорбцию и распределение белков в двухфазной системе. Неизвестна роль полиэтиленоксидных и полипропиленоксидных блоков во взаимодействии плуроников с белками. Вместе с тем накоплен большой материал о взаимодействии с белками полиэтиленоксида (ПЭГ), представленный в литературном обзоре данной диссертации.

Цель работы: определение влияния плуроников L121, P123 и F127 на коллоидно-химические, структурные и ферментативные свойства глобулярного белка лизоцима куриного яйца. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Определение коэффициентов распределения лизоцима и неионогенных поверхностно-активных веществ (ПАВ) в системе водный раствор/*n*-ксилол, выбранной в качестве модели двухфазной системы;
2. Исследование взаимного влияния лизоцима и неионогенных ПАВ при конкурентной адсорбции на межфазных границах водный раствор/*n*-ксилол и водный раствор/воздух с помощью методов сцинтиллирующей фазы и тензиометрии;
3. Изучение взаимодействий плуроников с лизоцимом по характеру распределения тритиевой метки по аминокислотным остаткам белка;

4. Определение влияния плуроников на структуру белка по данным молекулярной спектроскопии (УФ-спектроскопии, спектроскопии кругового дихроизма, флуориметрии);

5. Определение влияния плуроников на каталитическую активность лизоцима.

Научная новизна работы заключается в положениях, выносимых на защиту:

1. Показано образование посредством водородных и ван-дер-ваальсовых взаимодействий между цепями полиэтиленоксида (ПЭО) и аминокислотными остатками устойчивых комплексов между лизоцимом и неионогенными ПАВ (плурониками L121, P123 и F127, а также Бридж-35) на межфазных границах жидкость/жидкость и жидкость/воздух, а также в объёме водной фазы при концентрации плуроников ниже критической концентрации мицеллообразования (ККМ).

2. Показано неполное замещение лизоцима из поверхностного слоя молекулами плуроника при концентрациях ПАВ ниже ККМ. В области ККМ и выше нее замещение также составляло 40-75%. В составе смешанного адсорбционного слоя молекула белка изменяла пространственную ориентацию по сравнению с адсорбционным слоем, образованным только молекулами лизоцима.

3. Определены параметры межмолекулярного взаимодействия между лизоцимом и неионогенными ПАВ на границе раздела фаз водный раствор/*n*-ксилол, с помощью которых был определён состав смешанного адсорбционного слоя на границе с воздухом.

4. Найдено, что смешанный адсорбционный слой неионогенное ПАВ-лизоцим более проницаем для атомарного трития по сравнению с адсорбционным слоем белка.

5. Показано, что образование комплексов неионогенное ПАВ-лизоцим не влияет на вторичную структуру белка, но уменьшает бактериолитическую активность лизоцима по отношению к *Micrococcus luteus* и приводит к отклонению от кинетики Михаэлиса–Ментен процесса гидролиза клеточной стенки *M. luteus* под действием лизоцима.

Практическая значимость. Предложенный подход может служить основой для расширенного применения радиохимических методов при проведении физико-химических и биохимических исследований. Выявленные закономерности

взаимодействия глобулярных белков и плуроников на границах водный раствор/органическая жидкость и водный раствор/воздух, а также влияние плуроников на структуру и каталитические свойства белков расширяют наше представление о функционировании комплексов на основе плуроников в живых организмах. Полученные данные могут быть использованы при разработке лекарственных препаратов на основе плуроников, носителей для адресной доставки лекарственных препаратов, модификаторов поверхностей, антибактериальных покрытий.

Личный вклад автора состоял в анализе научной литературы и написании обзора; проведении экспериментов по исследованию поведения лизоцима и неионогенных ПАВ в системе водный раствор/*n*-ксилол; измерению ферментативной активности и обработке полученных результатов. Работы по получению и очистке меченых соединений выполнены совместно с к.х.н. Бадуном Г.А. Эксперименты по определению поверхностного натяжения проведены совместно с к.х.н. Соболевой О.А. Анализ распределения трития в аминокислотных остатках лизоцима проведён совместно с к.х.н. Ксенофонтовым А.Л. (НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова). Получение спектров кругового дихроизма проведено совместно с к. ф.-м. н. Арутюняном А.М. (НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова).

Настоящая работа является частью исследований, связанных с получением, анализом и применением меченных тритием веществ, выполненных при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации (МК-4881.2016.3) и Российского Фонда Фундаментальных Исследований (в рамках проекта 18-33-20147-мол_а_вед).

Апробация работы. Основные результаты настоящей работы были представлены в виде устных и стендовых докладов на Международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 2016, 2017, 2018, 2019), Всероссийской Каргинской конференции «Полимеры» (Москва, 2017; Тверь, 2020), Международной конференции для молодых учёных «Химическая технология функциональных наноматериалов» (Москва, 2017), IX Российской конференции с международным участием «Радиохимия» (Санкт-Петербург, 2018), Школе-конференции с международным участием для молодых

учёных «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (Казань, 2019), X Международной конференции «Химическая термодинамика и кинетика» (Великий Новгород, 2020), XXI Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Санкт-Петербург, 2019), XVI International Conference on Surface Forces, (Казань, 2018) и VII International Colloids Conference, (Сиджес, 2017).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи, в т.ч. статьи в международных рецензируемых научных изданиях с импакт-фактором, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus) и рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных работ, а также 13 тезисов докладов.

Полный **объём работы** составляет 173 страниц машинописного текста и содержит 36 рисунков и 10 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 409 источника.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. 1. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПЛЮРОНИКОВ С БЕЛКАМИ

1.1.1. Номенклатура плюроники

Блок-сополимеры полипропиленоксида (ППО) и полиэтиленоксида (ПЭО) или полуксамеры, согласно международной номенклатуре, получили широкое применение в качестве полимерных поверхностно-активных веществ (ПАВ). Наиболее часто применяются трёхблочные сополимеры симметричного строения, общая формула которых выглядит следующим образом:



Данные блок-сополимеры производятся фирмой «BASF» под маркой «Pluronic», а фирмой «ICI Ltd» под маркой «Synperonic», поэтому они также называются плюрониками или синперониками. Длина блока ППО у разных плюроники составляет от 20 до 70 звеньев, а каждого блока ПЭО – от 2 до 150. Коммерческим препаратам плюроники присваивают буквенно-цифровые обозначения, в которых содержится информация об агрегатном состоянии и составе полимера. Буква в названии плюроника (P, F, L) обозначает агрегатное состояние продукта: пастообразное (Paste), жидкое (Liquid) или хлопьеобразное (Flakes). Последняя цифра в названии показывает массовую долю звеньев этиленоксида (ЭО), выраженную в десятках процентов, остальные цифры – количество звеньев пропиленоксида (ПО), делённое на 5. Например, плюроник P123 является пастообразным, содержит 30% звеньев ЭО по массе и $12 \times 5 = 60$ звеньев ПО. Обозначения полуксамеров включают в себя номер, в котором первые две цифры обозначают массу гидрофобного блока, поделённую на 100, а третья цифра обозначает массовую долю звеньев ЭО в молекуле. Для обозначения числа и массовой доли звеньев используют средние значения, хотя степень полидисперсности и композиционной неоднородности плюроники, получаемых анионной полимеризацией, не велика [10, 11].

1.1.2. Физико-химические свойства плюроники

Физико-химические свойства плюроники обусловлены наличием в них двух блоков, различающихся по гидрофобности: гидрофильного ПЭО и гидрофобного ППО. Гидрофобность тех или иных органических соединений обусловлена тем, что контакты углеводородных цепей с водой термодинамически невыгодны. В основной

цепи звенья ЭО могут образовывать водородные связи с молекулами воды. Отсутствие крупных боковых заместителей делает макромолекулы достаточно гибкими для оптимизации свободной энергии взаимодействия с водой. Этим обусловлена гидрофильность цепей ПЭО. Наличие метильных заместителей у цепей ППО приводит к увеличению жёсткости макромолекулы, изменению её локальной геометрии и, как следствие, к значительному уменьшению гидратации. Поэтому при обычных условиях ППО гидрофобен [10, 12]. Для описания зависимости свойств блочных амфифильных соединений от их структуры используется такая величина как гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ). По формуле Гриффина ГЛБ определяют как отношение молекулярной массы гидрофильного блока (ПЭО в случае плуроников) к общей молекулярной массе полимера, умноженное на 20 [13].

Из-за наличия двух цепей, различающихся по растворимости в воде, плуроники проявляют свойства неионогенных ПАВ (НПАВ). Плуроники как и большинство амфифильных соединений в водном растворе при определённых значениях концентрации и температуры образуют различные надмолекулярные ассоциаты, в т.ч. мицеллы. В области низких концентраций плуроники существуют в виде неассоциированных молекул, представляющих собой идеальные (гауссовы) клубки [14]. С увеличением концентрации плуроника в растворе образуются мицеллы, которые находятся в состоянии равновесия с одиночными молекулами. В полярных растворителях, таких как вода, внутреннее ядро мицелл состоит из гидрофобных звеньев, ППО, а внешняя сторона – из гидрофильных звеньев, ПЭО.

Стабильность, размер, форма и число агрегации (количество молекул в составе) мицелл зависят от структуры плуроника, в частности, от длины цепей ППО и ПЭО и их взаимного расположения (архитектуры), а также от концентрации плуроника и условий внешней среды, таких как температура и природа растворителя [15, 2, 16, 17]. Например, плуроники L121 ($a = 5$, $b = 68$, где a и b – длина цепей ПЭО и ППО соответственно) и F127 ($a = 100$, $b = 65$) имеют примерно одинаковое число гидрофобных звеньев ПО, в то время как длина гидрофильных цепей ПЭО резко отличается, при этом плуроник L121 в отличие от плуроника F127 не формирует мицеллы. В области низких концентраций и низких температур плуроник L121 существует в виде агрегатов, при температуре окружающей среды и низкой концентрации (0,1% по массе) L121 образует мутные дисперсии, размер

которых уменьшается с увеличением температуры. Напротив, плуроник F127 формирует сферические мицеллы в широком диапазоне концентраций [18].

Диаметр мицелл варьируется от 10 нм до 100 нм [19], а в отдельных случаях достигает значений 400 нм [20]. В сферической мицелле число агрегации составляет от 30 до 100 [21, 22]. Мицеллы могут иметь не только сферическую, но также пластинчатую, эллипсоидную или иную морфологию. Можно было бы ожидать, что форма мицелл, образованных плурониками, определяет их физико-химические и биологические свойства, например, высокую растворимость мицелл, имеющих пластинчатую или цилиндрическую морфологию, как это наблюдается для некоторых других сополимеров [23, 24]. Несферические мицеллы не подвергаются поглощению клетками иммунной системы [23, 24] и менее стабильны [18, 25]. Некоторые плуроники, например, L121 и P123, образуют бислойные везикулы, диаметр которых варьируется от 120 нм для L121 [26] до 800 нм для P123 [27]. В некоторых случаях ядро мицелл плуроников может содержать нерастворимые в воде соединения, массовая доля которых составляет до 20—30% [28].

Минимальная концентрация, при которой начинается формирование мицелл, называется критической концентрацией мицеллообразования (ККМ). Для определения ККМ используют методы статического [29, 30] и динамического светорассеяния [31], стационарной и разрешённой во времени флуоресценции [32, 33], гель-проникающей хроматографии (ГПХ) [34], вискозиметрии [35], тензиометрии [36, 37] и др.

В основе процесса мицеллообразования лежат гидрофобные взаимодействия между звеньями пропиленоксида. С увеличением цепей ПО усиливаются гидрофобные взаимодействия между метильными звеньями и склонность плуроника к образованию мицелл [16, 38, 39], в результате ККМ уменьшается [40, 41]. В свою очередь увеличение степени полимеризации цепи ЭО приводит к повышению вероятности взаимодействия цепей ПО с цепями ЭО в ядре мицелл, что приводит к уменьшению гидрофобности ядра мицелл и, как следствие, к увеличению значений ККМ [37, 41]. Кроме того, на способность блок-сополимеров этиленоксида и пропиленоксида образовывать мицеллы оказывают влияние соотношение числа звеньев ПО/ЭО и молекулярная масса: при постоянном соотношении ПО/ЭО с увеличением молекулярной массы происходит уменьшение

ККМ, т.е. плуроника с большой молекулярной массой более склонны к формированию мицелл в водных растворах [37, 41, 42]. Значения ККМ смесей плуроников соответствуют усреднённым значениям ККМ отдельных компонентов смесей, что указывает на образование смешанных агрегатов [43].

Увеличение температуры приводит к разрушению водородных связей в воде и усилению роли гидрофобных взаимодействий [44]. Формирование мицелл начинается при увеличении температуры до определённого значения – критической температуры мицеллообразования (КТМ). Значения КТМ увеличиваются с уменьшением гидрофобности плуроника и уменьшаются с увеличением его концентрации. Плуроники с высоким содержанием полиэтиленоксидных звеньев не образуют мицелл при комнатной температуре, но начинают агрегировать при более высоких температурах [10].

Важную роль при формировании мицелл играет не только количество звеньев в отдельных блоках молекулы сополимера, но также их взаимное расположение в молекуле. Двухблочные сополимеры ПО и ЭО имеют меньшие или такие же значения ККМ и КТМ как и трёхблочные сополимеры [45, 46]. Трёхблочные сополимеры с обращённой структурой $\text{ПО}_{m/2}\text{ЭО}_n\text{ПО}_{m/2}$ менее склонны к образованию мицелл, значения ККМ сополимеров с такой структурой на два порядка выше значений ККМ для плуроников (при равной длине цепей ППО и ПЭО) [47].

На мицеллообразование плуроников оказывает влияние присутствие в растворе низкомолекулярных соединений. Добавление к водным растворам плуроников галогенидов (F^- , Cl^- , Br^- , I^-) различных щелочных металлов (Na^+ , K^+ , Li^+) в концентрации выше 0,5 М приводит к уменьшению значений ККМ и КТМ, эффект увеличивается с повышением концентрации соли, напротив, добавление NaSCN и мочевины приводит к увеличению ККМ и КТМ [48]. Влияние солей на параметры мицеллообразования плуроников обусловлено воздействием на структуру воды [49]. При этом способность солей уменьшать значения ККМ и КТМ соответствует лиотропным рядам Гофмейстера: $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Li}^+$; $\text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$ [48, 50, 51].

Присутствие высокомолекулярных соединений, таких как белки, также влияет на мицеллообразование. Например, добавление бычьего сывороточного альбумина

(БСА) к раствору плуроников P103, P105 и P108 приводит к увеличению КТМ и уменьшению энтальпии и энтропии мицеллообразования в водных растворах [52].

Приведённые в литературе значения ККМ большинства плуроников варьируют в широком диапазоне. Так, для плуроника F127 в литературе приводятся значения ККМ от 8×10^{-8} М [42] до 8×10^{-4} М [53, 54], а для плуроника L121 – от 1 мкМ [28] до 10 мкМ [55]. Различие в значениях ККМ обусловлено различием в условиях определения ККМ (температура, pH, ионная сила), присутствием примесей низкомолекулярных соединений и неоднородностью полимеров. Кроме того, значение ККМ зависит от метода определения из-за разной чувствительности различных методов [41, 56, 57].

Таким образом, амфифильная природа плуроников определяет их физико-химические свойства, такие как способность к мицеллообразованию и поверхностно-активные свойства. В основе процессов мицеллообразования лежат гидрофобные взаимодействия между цепями ППО. В меньшей степени на процесс формирования мицелл влияют цепи ПЭО, которые в основном определяют растворимость плуроников в воде. На формирование мицелл влияют температура, присутствие низко- и высокомолекулярных соединений, неоднородность полимеров, что в зависимости также от метода определения приводит к широкому диапазону значений ККМ в научной литературе.

1.1.3. Поведение плуроников на границе раздела фаз

Плуроники адсорбируются с образованием монослоя на гидрофобных поверхностях за счёт гидрофобного блока ППО, при этом цепи ПЭО экспонированы в водную среду. Адсорбция плуроников на твёрдых поверхностях препятствует адсорбции белков, что позволяет их использовать в качестве модификаторов поверхностей [1]. Характерно, что при взаимодействии с клеточными мембранами плуроники ведут похожим образом. Гидрофобный фрагмент ППО связывается с фосфолипидным слоем, в то время как цепи ПЭО ориентированы в водную фазу, оставаясь доступными для взаимодействия с белками [58].

При связывании с твёрдыми поверхностями или с границами несмешивающихся жидкостей плуроники, как и другие полимеры, могут принимать несколько возможных конформаций [59, 60]. В том случае, когда плотность поверхностного слоя плуроников очень низкая (расстояние между точками

связывания полимеров с поверхностью значительно больше радиуса Флори, т.е. расстояния между концами молекулы полимера), полимерные цепи изолированы друг от друга и принимают форму «гриба». При более высокой плотности поверхностного слоя полимеров (расстояние между точками связывания меньше радиуса Флори) молекулы полимера вытягиваются, принимая форму «щётки» из-за взаимного отталкивания, вызванного эффектом исключённого объёма. В этом случае молекулы полимера создают стерический барьер, препятствующий адсорбции на поверхности других соединений, в т.ч. белков. В том случае, если молекулы полимера проявляют сродство к поверхности раздела фаз, то при низкой плотности поверхностного слоя молекулы полимера связываются с поверхностью, принимая форму «блина», а при более высокой плотности – форму «щётки».

Для плуроников показана возможность формирования двух типов плёнок на границе вода/воздух: (1) при низких значениях поверхностного натяжения цепи ППО расположены перпендикулярно границе раздела фаз; (2) при более высоких значениях сегменты ППО могут десорбироваться с границы раздела фаз и смешиваться с сегментами ПЭО в воде [61]. Моделирование методом молекулярной динамики показывает, что гидрофобные группы ППО находятся преимущественно на границе раздела вода/воздух, а гидрофильные группы ПЭО находятся в водном слое вдали от поверхности [62], аналогично тому, как плуроники ведут себя на границах с твёрдыми поверхностями.

В присутствии плуроников и других амфифильных полиалкиленоксидов, содержащих этиленоксидные звенья, наблюдается значительное уменьшение сорбции белков на твёрдых поверхностях, таких как полисульфоновые мембраны [63], диметилдихлорсилан [64], полистирол [65, 66, 67], полиэтилентерефталат [68], метилированный диоксид кремния [69], полиуретан [70, 71], полиметилметакрилат [72], трихлорвинилсилан [73], углеродные нанотрубки [74, 75] и частицы золота [76]. Способность плуроников уменьшать связывание белков с различными материалами используется для создания биосенсоров и наночастиц для адресной доставки лекарств, поскольку адсорбция белков на этих материалах мешает их эффективному применению [1, 75].

Сорбция белков на поверхностях, покрытых плурониками, снижается с увеличением длины обращённых в раствор цепей ПЭО и их подвижности, как

показано на примере взаимодействия белков плазмы крови с плурониками P105, F68, F88 и F108 на поверхности полистирола [65], что указывает на ключевую роль цепей ПЭО в процессе вытеснения белков. В некоторых работах наблюдаемое вытеснение белков плурониками с границы раздела фаз связывается с тем, что цепи ПЭО создают стерическое препятствие сорбции белков [65]. В других работах приводится более сложный механизм, который объединяет вандерваальсовы и гидрофобные взаимодействия и стерическое отталкивание. В результате гидрофобных и вандерваальсовых взаимодействий этиленоксидных цепей с белком происходит сжатие цепей ПЭО и значительное уменьшение конформационной энтропии цепей, что усиливает стерическое отталкивание молекул белками цепями ПЭО, что приводит к увеличению свободной энергии белка и делает его более подвижным, препятствуя его сорбции [77, 78].

Уменьшение адсорбции белков в присутствии плуроников может быть также обусловлено образованием комплексов состава белок—плуроник с низкой аффинностью к твёрдым поверхностям [79], при этом связывание с плуроником препятствует агрегации белка, как показано на примере взаимодействия лизоцима с плурониками, [80], хотя в некоторых работах образование устойчивых комплексов плуроников с белками ставится под сомнение [81].

В то же время сорбция белков в присутствии плуроников зависит не только от длины гидрофильных цепей ПЭО, но и от длины гидрофобных цепей ППО, как показано в некоторых исследованиях [82], т.е. на уменьшение сорбции белка на твёрдых поверхностях влияет степень сродства полимера к поверхности.

1.1.4. Взаимодействие плуроников с белками

Белки – это амфотерные полиэлектролиты, имеющие отдельные гидрофобные и гидрофильные участки. В отличие от других полимеров белки имеют вторичную и третичную структуры, образованные различными типами взаимодействий, среди которых главную роль играют гидрофобные и водородные связи. Характер взаимодействия белков с ПАВ определяется природой ПАВ, структурой белка, в т.ч. зарядом поверхности, количеством и относительным расположением гидрофобных и гидрофильных участков, а также pH и ионной силой раствора [83, 84].

Механизм взаимодействия белков с ионными ПАВ хорошо исследован. Связывание белка с ионными ПАВ происходит в несколько стадий в зависимости от

соотношения концентраций белка ПАВ. В начале молекулы ПАВ связываются с доступными заряженными участками белка за счёт электростатических взаимодействий, что приводит к формированию электронейтральных комплексов. Углеводородные цепи ПАВ в этом случае обращены в сторону раствора, поэтому комплекс является гидрофобным. При дальнейшем увеличении концентрации ПАВ всю большую роль начинают играть гидрофобные взаимодействия между гидрофобными «хвостами» ПАВ и неполярными остатками или доменами белков, комплекс становится более гидрофильным [85, 86].

При определённых концентрациях и соотношениях взаимодействие белка с противоположно заряженным ПАВ приводит к образованию осадка, растворимого при избытке ПАВ [87]. Поскольку на поверхности белковой глобулы одновременно присутствуют положительно и отрицательно заряженные участки, белки могут связываться не только с противоположно заряженными ПАВ, но и с одноимённо заряженными [88, 89]. В результате электростатических и гидрофобных взаимодействий между белком и ПАВ в структуре белка происходят конформационные изменения, а при определённых концентрациях ПАВ происходит развёртывание глобулы (анфолдинг) или денатурация белка [90]. Скорость развёртывания глобулы возрастает в домицеллярной области и выходит на постоянные значения в мицеллярной [91].

Взаимодействие неионогенных ПАВ, в том числе плуроников, с белками имеет свои особенности. НПАВ не оказывают какого-либо влияния на эффективный заряд белка и связываются с белками слабо, преимущественно за счёт гидрофобных взаимодействий [84, 92]. Связывание НПАВ с белками не вызывает значительных конформационных изменений в структуре белка, как ионогенные ПАВ [85, 86, 93]. Изучение взаимодействия плуроника F68 (с массовой долей 0,035%), Твин 80 и Твин 60 (по 0,02%) с Fc-гибридным белком и БСА на границе раздела фаз вода/силиконовое масло показало, что связывание белков с НПАВ определяется наличием гидрофобных участков на поверхности, и при их отсутствии нет и взаимодействия белка с НПАВ [93, 94].

Высокие концентрации плуроников вызывают уменьшение α -спирального компонента в составе белка подобно действию ионогенных ПАВ в области мицеллярных концентраций, как показано на примере взаимодействия $1,3 \times 10^{-2}$ М

плюроника F127 и ЧСА [95]. Увеличение эллиптичности альбумина наблюдается в присутствии $2,4 \times 10^{-2}$ М плюроника F127 [96]. Более того, плюроники способны восстанавливать структуру белка, потерявшего свою конформацию в результате взаимодействия с ионными ПАВ, как показано на примере взаимодействия плюроника P123 и ЧСА [97].

Присутствие белков оказывает влияние на процесс мицеллообразования НПАВ: уменьшает число агрегации мицелл НПАВ, как показано при исследовании взаимодействия додецилового эфира октаоксиэтиленгликоля с БСА [98], или препятствует формированию мицелл, как показано на примере взаимодействия с БСА плюроников P103, P105 и F108 [52]. Формированию мицелл мешает то, что гидрофобные взаимодействия ППО с белком замещают собой гидрофобные взаимодействия цепей ППО между собой [52]. Образование комплексов плюроников с белками не только может препятствовать адсорбции белков на границе раздела фаз, но и разрушает агрегаты плюроников, что приводит к образованию большого количества мономеров и увеличению адсорбции плюроника на границе раздела фаз [79]. В свою очередь плюроники препятствуют агрегации белков даже при высоких температурах, предположительно за счёт того, что цепи ППО связываются с гидрофобными остатками белков посредством гидрофобных взаимодействий, а экспонированные в водный раствор цепи ПЭО препятствуют взаимодействию молекул белка между собой [80].

1.1.5. Конкурентная адсорбция плюроников и белков на границе раздела фаз

Благодаря тому, что на поверхности глобулы белка всегда присутствуют и гидрофильные, и гидрофобные аминокислотные остатки, белки проявляют поверхностно-активные свойства и адсорбируются на межфазной границе, вызывая незначительное снижение поверхностного натяжения. При плотном заполнении молекулами белка поверхностного слоя двумерное давление составляет 10 – 20 мН/м [99, 100]. Адсорбция белковых молекул на гидрофобных поверхностях определяется двумя основными факторами: удалением структурированной воды вокруг неполярных групп на белке при адсорбции и структурными изменениями, которые возможны в белковых молекулах на границе раздела [101]. Связывание белка с гидрофобными поверхностями за счёт неполярных остатков, присутствующих на

его поверхности, не только закрывает эти неполярные остатки от действия воды, но и приводит к частичному разворачиванию глобулы белка.

При исследовании адсорбции лизоцима на межфазной границе вода/воздух [100] было показано, что при низких концентрациях кинетика адсорбции белка может быть описана как диффузионно-контролируемый процесс, при более высоких концентрациях основную роль в адсорбции белка играют конформационные изменения в структуре, и кинетика адсорбции описывается как смешанный механизм. Адсорбция лизоцима на границе раздела фаз достигает постоянного значения за 20 часов, при этом происходит увеличение площади, которую занимает молекула лизоцима, что говорит о переориентации белковой глобулы на поверхности. Полученные данные о переориентации глобулы лизоцима согласуются с результатами исследований с применением методов эллипсометрии и зеркального отражения нейтронов [102, 103].

Исследования межфазного давления для различных белков на границе раздела фаз воздух/вода показали, что независимо от размера белка, только небольшая часть белка вступает во взаимодействие с границей раздела фаз [104]. Площадь поперечного сечения исследуемых белков варьировалась от ~ 1000 до $10000 \text{ \AA}^2$, однако площадь, необходимая для каждого белка для связывания с границей раздела, находилась в узком диапазоне от 100 до $175 \text{ \AA}^2$. Это говорит о том, что белки могут связываться с границей раздела за счёт нескольких неполярных боковых цепей, расположенных на поверхности.

В присутствии НПАВ происходит уменьшение адсорбции белков на границе раздела, что обусловлено, предположительно, большей поверхностной активностью или взаимодействием НПАВ с белками [105]. Взаимодействие белка и ПАВ оказывает влияние на поверхностное натяжение. При наличии сильных взаимодействий между полярными группами белка и ПАВ (электростатических, водородных) происходит образование комплекса белок—ПАВ, обладающего большей поверхностной активностью по сравнению с белком или ПАВ по отдельности.

Такой тип поведения был показан при исследовании системы БСА—Tween 80 [106]. Предположительно, за счёт гидрофобных взаимодействий и водородных взаимодействий происходит образование комплекса, адсорбирующегося на границе

раздела фаз. Из-за наличия гидрофобных взаимодействий образующиеся комплексы являются более гидрофильными по сравнению с нативными белками. При избытке ПАВ все молекулы белка связаны в ассоциаты. С увеличением концентрации ПАВ происходит вытеснение комплексов с границы раздела фаз свободными молекулами ПАВ, и поверхностный слой заполняется молекулами ПАВ.

Поведение смесей состава белок—ПАВ на границе раздела фаз рассматривает модель Файнермана, описывающая адсорбцию белка [107, 108] и ПАВ [109] по отдельности, а также адсорбцию смеси белок—ПАВ [99, 110]. Данная модель хорошо описывает изотермы поверхностного натяжения и адсорбции для смесей ЧСА—ЦТАБ и β -лактоглобулин—лаурилсульфат натрия [111, 112]. В случае смесей белок—ПАВ, значения поверхностного натяжения в области низких концентраций ниже, чем у индивидуальных ПАВ, что указывает на специфическое связывание ПАВ с белками, при более высоких концентрациях изотермы для ПАВ в присутствии и в отсутствие белка совпадают.

Исследования адсорбции $C_{12}E_6$ и β -лактоглобулином [113], а также $C_{12}E_5$ и лизоцима [114] показали, что молекулы ПАВ не адсорбируются в присутствии белка, если молярное отношение ПАВ к белку в объёме раствора составляет менее 0,1, а при последующем увеличении концентрации ПАВ белок полностью вытесняется с поверхности раздела в узком диапазоне концентраций. Переходная область при соадсорбции $C_{12}E_6$ и β -лактоглобулина характеризовалась максимумом полного поверхностного избытка. При соадсорбции $C_{12}E_5$ и лизоцима, наоборот, показан минимум общего избытка поверхности в этом регионе. Различие обусловлено влиянием ассоциативного взаимодействия ПАВ и белков на адсорбцию в разных системах.

При исследовании адсорбции β -лактоглобулина на межфазной границе вода/гексан в присутствии различных бромидов алкилтриметиламмония (с длиной углеводородной цепи C_{10} — C_{16}) с применением метода тензиометрии и экспериментальных расчётов показано, что в системе протекает конкурентная адсорбция, несмотря на формирование гидрофобного комплекса в области низких концентрациях ПАВ и гидрофильного комплекса при увеличении концентрации ПАВ. Для смесей белка с $C_{14}TAB$ и $C_{16}TAB$ показана нейтрализация заряда белка из-за взаимодействия с молекулами ПАВ, при этом система ведёт себя как смесь белка

с неионогенным ПАВ, в которой формируется комплекс белок – ПАВ за счёт гидрофобных взаимодействий. При увеличении концентрации ПАВ происходит образование гидрофильного комплекса, который вытесняется молекулами ПАВ с границы раздел фаз [85].

При исследовании соадсорбции смесей $C_{12}E_6$ с β -лактоглобулином [115] и $C_{12}E_5$ с лизоцимом [82] были обнаружены некоторые различия. При исследовании соадсорбции $C_{12}E_6$ с β -лактоглобулином было показано, что адсорбция НПАВ на границе раздела фаз не происходит, когда молярное соотношение НПАВ к белку составляет менее 0,1. При дальнейшем увеличении концентрации НПАВ происходит замещение молекул белка молекулами НПАВ на границе раздела фаз в узком диапазоне концентраций. Переходная область характеризуется максимальными значениями поверхностного избытка. Однако при исследовании соадсорбции $C_{12}E_5$ и лизоцима был показан минимум значений поверхностного избытка. Наблюдаемое различие может быть объяснено слабым ассоциативным взаимодействием между ПАВ и белком при адсорбции в разных системах.

При исследовании адсорбции белка β -казеина в присутствии $C_{10}DMPO$ и $C_{12}DMPO$ на границе вода/воздух установлено, что рост длины цепи ПАВ увеличивает степень вытеснения белка из приповерхностного слоя. Возрастание концентрации ПАВ приводит к увеличению толщины диффузного поверхностного слоя до того момента, как белок полностью вытесняется с поверхности. Подобный эффект наблюдается и для смесей $C_{10}DMPO$ с β -лактоглобулином, но только при более высоких концентрациях ПАВ, что обусловлено более жёсткой структурой β -лактоглобулина [116].

Полученные результаты подтверждают, что взаимодействие белка и НПАВ происходит по гидрофобному механизму и приводит к разворачиванию белковой глобулы и постепенной гидрофилизации белка.

1.1.6. Влияние плуроников на структуру и ферментативные свойства белков

При изучении взаимодействия НПАВ с белками и изменений в конформации белков используются методы статического и динамического светорассеяния [117], различные спектроскопические методы, такие как спектрофотометрия [118], стационарная и время-разрешённая флуориметрия [119,

120], спектроскопия кругового дихроизма (КД) [121], спектроскопия малоуглового рентгеновского рассеяния [122] и спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) [123]. Каталитические свойства ферментов находятся в зависимости от конформации белка, поэтому исследование ферментативной активности может быть также использовано при изучении изменений в структуре белка [124]. Присутствие НПАВ может вызывать изменения в структуре и каталитической активности белков. Эффект определяется концентрацией и молекулярной массой НПАВ, а также природой фермента и субстрата. Влияние плуроников на структуру и ферментативные свойства белков обусловлено взаимодействием с белками как гидрофильных цепей ПЭО, так и гидрофобных цепей ППО.

Данные о влиянии плуроников на белки, остаются неполными, и, в частности, мало исследовано влияние плуроников на белки, проявляющие ферментативную активность. Мало исследовано взаимодействие белков с ППО, хотя известно, что ППО вступает в гидрофобные взаимодействия с белками [52]. В то же время в научной литературе накоплен большой материал о взаимодействии с белками полиэтиленгликоля (ПЭГ) и некоторых блочных амфифильных содинений на основе полиэтиленоксида. В некоторых работах показано отсутствие какого-либо влияния ПЭГ на белки, например, как в случае лизоцима в присутствии ПЭГ 400, 2000 и 5000 [121, 125] или алкогольдегидрогеназы ПЭГ 3350 и 8000 [126], но в большинстве случаев добавление ПЭГ приводит к изменениям в структуре и ферментативной активности белков.

Этиленгликоль и ПЭГ 400 и 4000 оказывают значительное влияние на бактериолитическую активность лизоцима по отношению к *Micrococcus lysodeikticus* (*luteus*) в диапазоне концентраций от 2 до 20% [119]. В области низких концентраций ЭГ и ПЭГ бактериолитическая активность лизоцима возрастает почти на 40%. При этом происходит уменьшение константы Михаэлиса K_M , что говорит о формировании более устойчивого фермент-субстратного комплекса. Дальнейшее увеличение концентрации ЭГ и ПЭГ приводит к уменьшению бактериолитической активности и увеличению K_M . Каталитическая константа k_{cat} увеличивается во всём диапазоне концентраций ПЭГ, что говорит об увеличении скорости превращения субстрата. Спектроскопия кругового дихроизма показывает незначительное уменьшение доли α -спиралей в структуре белка ПЭГ 400, особенно в области низких

концентраций, и увеличение в присутствии ПЭГ 4000. Снижение спиральности белка в области низких концентраций ПЭГ, возможно, делает активный центр фермента более доступным для связывания с субстратом, но при более высоких концентрациях ПЭГ изменения в структуре нерегулярны и не могут быть основной причиной снижения активности [119]. Интенсивность флуоресценции возрастает в присутствии ЭГ и ПЭГ с небольшим сдвигом пика интенсивности в синюю область спектра (~5 нм), при дальнейшем увеличении концентрации ПЭГ происходит гашение флуоресценции [119]. При добавлении 5 мг/мл ПЭГ 8000 происходит двукратное гашение флуоресценции лизоцима, при этом дальнейшее увеличение концентрации ПЭГ (до 200 мг/мл) не оказывает никакого влияния на интенсивность флуоресценции. Гашение флуоресценции лизоцима в присутствии ПЭГ говорит об увеличении плотности микроокружения активного центра фермента [119].

Добавление ПЭГ 400 приводит к небольшому (на 6%) увеличению ферментативной активности гексокиназы III типа из пекарных дрожжей, а добавление ПЭГ 1500 и 4000, наоборот, вызывает уменьшение активности фермента на 14% и 7% соответственно. При этом исследование методом малоуглового рентгеновского рассеяния показывает агрегацию белка в присутствии ПЭГ 1500 и 4000, а исследование методом кругового дихроизма – одинаковое уменьшение доли α -спиральной структуры в белке на 15% при добавлении любого ПЭГ, т.е. изменение во вторичной структуре не коррелирует с изменением ферментативной активности [127].

Добавление ПЭГ 400 и 4000 приводит к увеличению на 20% ферментативной активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [122]. Различие в длине цепи не оказывало какого-либо влияния, ферментативная активность возрастала одинаково в обоих случаях. Исследование методом калориметрии показали, что ПЭГ образует водородные связи с молекулами никотинамидадениндинуклеотидфосфата, коферментом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Исследование методом малоуглового рентгеновского рассеяния показало образование агрегатов белка в присутствии ПЭГ 400, но не в присутствии ПЭГ 4000.

Присутствие ПЭГ с различными значениями молекулярной массы (400, 600, 1000, 1500, 2000 и 4000 Да) приводит к увеличению ферментативной активности β -циклодекстринглюканотрансферазы *Bacillus macerans*, свиной панкреатической α -

амилазы, α -амилазы *Aspergillus oryzae*, β -амилазы ячменя, α -амилазы слюны человека, α -амилазы *Bacillus amyloliquefaciens*, α -амилазы *Bacillus licheniformis*, изоамилазы *Pseudomonas amyloclavata* и пуллулазы *Bacillus acidopullulyticus* [128]. Наибольшее увеличение ферментативной активности для циклодекстринглюканотрансферазы (на 20%) происходит в присутствии ПЭГ 1500; на панкреатическую α -амилазу, α -амилазу *A. oryzae* и β -амилазу ячменя наибольший эффект также оказывает ПЭГ 1500; на α -амилазу слюны человека и α -амилазу *B. amyloliquefaciens* — ПЭГ 1000; на α -амилазу *B. licheniformis* — ПЭГ 2000 и ПЭГ 4600; на изоамилазу и пуллулазу — ПЭГ 2000 [128]. Авторы исследования предполагают, что исследуемые ферменты существуют в виде нескольких равновесных форм, различающихся по своей ферментативной активности, а связывание фермента с ПЭГ приводит к стабилизации и изменению третичной структуры с последующим образованием более активной формы.

При внесении ПЭГ с молекулярными массами 200, 400, 600 и 1000 к раствору амилазы *Bacillus amyloliquefaciens* происходит значительное увеличение активности фермента [129]. При этом, наибольшее увеличение активности наблюдается в области низких концентраций ПЭГ, а дальнейшее увеличение концентраций приводит к снижению активности фермента падает до значений, близких к активности фермента без ПЭГ. Присутствие ПЭГ не оказывает значительного влияние на оптическое поглощение белка. Исследования методом флуоресцентной спектроскопии показало сдвиг на спектре пика интенсивности флуоресценции в синюю область спектра и увеличение интенсивности флуоресценции с увеличением концентрации ПЭГ. Полученные результаты авторы исследования объясняют стабилизацией белка в результате гидрофобных и водородных взаимодействий с ПЭГ.

Добавление ПЭГ с различными значениями молекулярной массы (от 400 до 20000 Да) к β -циклодекстрингликозилтрансферазе *Bacillus circulans* приводит к увеличению ферментативной активности по отношению к β -циклодекстрину [130]. При этом эффект зависит от концентрации ПЭГ: в области низких концентраций ($\leq 5\%$) ПЭГ оказывают одинаковое влияние на белок, а в области более высоких концентраций (8 — 15%) наибольшее увеличение активности по отношению к субстрату достигается при добавлении ПЭГ с молекулярной массой 400 Да. При

последующем увеличении концентрации ПЭГ 400 наблюдается увеличение ферментативной активности, но при увеличении концентрации других ПЭГ активность уменьшается (в случае ПЭГ 1000, 2000, 4000, 20000) или остаётся неизменной (для ПЭГ 10000). Наибольшее увеличение ферментативной активности достигается в присутствии 20% ПЭГ 400. Исследование доступной гидрофобной поверхности показало, что добавление любых ПЭГ приводит к увеличению гидрофобной поверхности белка, наибольший эффект наблюдается для ПЭГ 2000 и 10000, а наименьший — для ПЭГ 400. Присутствие ПЭГ приводит к увеличению собственной флуоресценции белка, наибольшее увеличение пика флуоресценции наблюдается при добавлении ПЭГ 1000. Кроме того, наблюдается сдвиг пика флуоресценции в область синего спектра на 4 нм. Исследование структуры белков методом кругового дихроизма при 60 °С показало, что присутствие 10% ПЭГ в растворе приводит к значительному увеличению содержания β -структурных элементов (эффект не зависит от молекулярной массы) и оказывает разное влияние на долю α -спиралей и нерегулярных структур в белке [130].

Добавление ПЭГ 6000 оказывает неодинаковое влияние на каталитическую активность ДНК-лигаз, выделенных из разных источников (бактериофага Т4, крысы и *Escherichia coli*) [131]. Увеличение концентрации ПЭГ до 5% приводит к двукратному повышению ферментативной активности ДНК-лигаз фага Т4 и *E. coli*. Дальнейшее увеличение концентрации ПЭГ приводит к снижению активности фермента. При 20% концентрации ПЭГ активность фермента значительно меньше активности фермента без ПЭГ. Другой эффект оказывает ПЭГ 6000 на активность ДНК-лигазы печени. В области концентраций ПЭГ <10% активность фермента остаётся неизменной. При концентрации ПЭГ 10—15% происходит резкое увеличение активности с последующим падением до значений, близких к значениям активности без ПЭГ [131].

Ферментативная активность РНК-лигазы фага Т4 возрастает в присутствии ПЭГ 8000 и 20000, при этом добавление ПЭГ приводит к изменению состава образующихся продуктов [132]. ПЭГ 6000 вызывает увеличение активности изохоризматсинтазы *Escherichia coli* [133]. Активность полинуклеотидкиназы фага Т4 возрастает в присутствии ПЭГ 8000 и не изменяется в присутствии ПЭГ 200 [134, 135]. При добавлении ПЭГ 6000 и 35000 происходит пятикратное увеличение

ферментативной активности пирофосфатазы *E. Coli*, при этом ПЭГ 1000 не оказывает никакого эффекта [136]. Активность фосфоенолпируват-сахарфосфотрансферазы *E. coli* возрастает в присутствии высоких концентраций ПЭГ 6000 и ПЭГ 35000 [137]. В 10%-ом растворе ПЭГ 600 и ПЭГ 6000 ферментативная активность 3С-подобной пептидазы вируса тяжёлого острого респираторного синдрома увеличивается в два-три раза [138]. У комплекса целлюлаз *Trichoderma reesi* в присутствии ПЭГ 4600 происходит значительное (от 36 до 89%) увеличение ферментативной активности [139]. Ферментативная активность липазы *Bacillus stearothermophilus* MC7 увеличивается в присутствии ПЭГ с различной молекулярной массой – от 400 до 70000 (при этом активность фермента возрастает с увеличением молекулярной массы ПЭГ) [140]. Предварительная инкубация в течение 6 ч в присутствии ПЭГ 8000 и 20000 приводит к увеличению ферментативной активности одного из изоферментов липазы *Candida Rugosa* (*lip3*) на 260%, но не оказывает какого-либо влияния на другой изофермент (*lip1*), также показано, что ПЭГ не препятствует взаимодействию фермента с ингибитором [141].

Для некоторых ферментов характерно уменьшение каталитической активности в присутствии ПЭГ. Каталитическая активность α -химотрипсина уменьшается в присутствии ПЭГ 400, что сопровождается уменьшением как константы Михаэлиса K_M , так и каталитической константы k_{cat} . Полученный результат авторы исследования объясняют стабилизацией «входного отверстия», что приводит к уменьшению K_M , и «выходного отверстия» кармана фермента в результате вытеснения молекул воды молекулами ПЭГ, что приводит к уменьшению k_{cat} [142].

В присутствии ПЭГ 3300 и 8000 происходит уменьшение активности пурипнуклеозидфосфорилазы *Plasmodium falciparu* [143]. При этом, ПЭГ 3300 вызывает двукратное увеличение K_M , а ПЭГ 8000 – уменьшение K_M на 10%, k_{cat} уменьшается в два раза в присутствии обеих добавок. При добавлении ПЭГ к раствору фермента происходит уменьшение интенсивности флуоресценции со сдвигом пика интенсивности в синюю область спектра [143].

Инкубирование нерибосомной энтеробактинсинтетазы *E. coli* с ПЭГ 6000 в течение 1,5 ч приводит к значительному уменьшению каталитической активности фермента (почти на 40%) и изменению массовых долей продуктов ферментативной

реакции [144]. Предварительное инкубирование в течение 3 ч в присутствии ПЭГ приводит к уменьшению ферментативной активности уреазы из пекарных дрожжей на 70% [145].

Полиэтиленоксидные звенья в составе НПАВ сохраняют способность оказывать влияние на структуру и каталитические свойства белков. В присутствии Тритон X-100 происходит значительное увеличение ферментативной активности липазы *Thermomyces lanuginose* [146] и уменьшение активности β -галактозидазы *Bacillus circulans* [147]. В обоих случаях НПАВ вызывают изменения в конформации белков.

Ферментативная активность липаз зависит от концентрации Тритон X-100, в области низких концентраций (<0,1%) происходит четырёхкратное увеличение активности, которое затем сменяется снижением при повышении концентрации НПАВ до 1 % [148]. В присутствии Тритона X-100 наблюдается значительное уменьшение активности разных ферментов, таких как ацил-КоА-холестерол-ацилтрансфераза человека [149], плазмин человека [150], лакказы *Trametes versicolor* [151], фосфолипаза гадюки Никольского *Vipera nikolskii* [152], липаза *Candida Rugosa* [153], в последнем случае Triton X-100 оказывал различное влияние на различные изоформы фермента. Существенное увеличение (в 1,5–3 раза) ферментативной активности эндолизина бактериофага SPZ7 по отношению к клеткам *Salmonella enteritidis* N60 и *Escherichia coli* TG1 наблюдалось в присутствии плуроников с крупным гидрофобным блоком F127, P85 и L101 [154].

Приведённые примеры показывают, что присутствие ПЭГ и содержащих этиленоксидные звенья НПАВ приводит к изменениям во вторичной и третичной структуре белков, что оказывает влияние на ферментативную активность, как увеличивая, так и уменьшая. В некоторых случаях эффект обусловлен взаимодействием ПЭГ с субстратом. Например, скорость ферментативной реакции с участием пероксидазы хрена в присутствии ПЭГ 400 и 8000 зависит от химической природы субстрата: реакции с участием гидрофобного 3,3',5,5'-тетрамethylбензидина более чувствительны к присутствию ПЭГ, чем реакции с участием гидрофильного о-фенилендиамина [155].

Но взаимодействие НПАВ с субстратом не может объяснить все наблюдаемые эффекты. Предположительно, существует ещё несколько факторов, влияющих на

белки: уменьшение локальной полярности растворителя, вызывающее частичное развёртывание белка, увеличение доступности активного центра и изменение плотности микроокружения остатков триптофана (на это указывает увеличение интенсивности флуоресценции); эффект «исключённого объёма» (молекулярный краудинг), приводящий к изменениям в конформации и агрегации белков; неспецифические взаимодействия между белком и ПЭГ, препятствующие взаимодействию фермента с субстратом [120, 122, 156]. Соотношение этих факторов обусловлено природой белка и субстрата, концентрацией и молекулярным весом ПЭГ. Предсказать, как поведёт себя тот или иной белок в присутствии ПЭГ в широком диапазоне концентраций непросто.

1.1.7. Молекулярный краудинг

Эффект исключённого объёма (молекулярный краудинг) состоит в том, что НПАВ при добавлении к раствору белков занимают часть объёма раствора, и в силу взаимной непроницаемости и неспецифического стерического отталкивания вытесняют молекулы белка в оставшееся свободное пространство [157, 158]. При этом, молекулярный краудинг не предполагает прямого взаимодействия между полимером и белками. Около 50% белков протеома эукариотов в нативном состоянии имеют в своей структуре потяжённые участки с неупорядоченной структурой, ещё более 25% белков вовсе лишены стабильной третичной и/или вторичной структуры. Тем не менее, такие белки выполняют биологические функции. Например, в составе немембранных органелл доля белков, лишённых упорядоченной трёхмерной структуры составляет от 4,5% у чумной палочки *Yersinia pestis* до 28% у домового мыши *Mus musculus* [159]. Локальное увеличение концентрации такого белка приводит к стабилизации его структуры, усилению взаимодействий между молекулами белка, увеличению скорости биохимических реакций или сдвигу положения равновесия реакций в сторону ассоциации и олигомеризации белков [160, 158].

Олигомеризация и агрегация белков в присутствии НПАВ говорит о наличии эффекта молекулярного краудинга. Высокие концентрации ПЭГ 20000 приводят к олигомеризации глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы [157]. Фермент существует в форме мономеров, обладающих ферментативной активностью, и менее

активных тетрамеров. Добавление ПЭГ значительно смещает равновесие в сторону образования тетрамеров.

ПЭГ 8000 влияет на олигомеризацию глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [161]. В водном растворе глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа существует в виде активного димера и неактивных мономера и тетрамера. Добавление ПЭГ приводит к увеличению количества димеров в растворе. Добавление ПЭГ приводит к стабилизации активных димеров 3С-подобной пептидазы коронавируса тяжёлого острого респираторного синдрома (SARS-CoV) [138], а также оказывает значительный эффект на конформацию фактора инициации трансляции eIF4A человека, смещая равновесие между открытой и закрытой формой белка в сторону закрытой [162].

ПЭГ 3500 влияет на фибрилляцию четырёх белков: S-карбоксиметил- α -лактальбумина, инсулина человека, гистона бычьего сердца и α -синуклеина [163]. Присутствие ПЭГ значительно увеличивает скорость формирования фибрил S-карбоксиметил- α -лактальбумина, оказывая влияние на свёртку и агрегацию белка. Процесс формирования фибрил инсулина замедляется в присутствии ПЭГ. Формирование фибрил мономерами гистона возрастает, а димерами гистонов – уменьшается. Таким образом, присутствие ПЭГ стабилизирует олигомеры, препятствуя их дальнейшей фибрилляции.

ПЭГ 200, 3350 и 10000 оказывают влияние на агрегирование синуклеина. Добавление ПЭГ значительно ускоряет процесс формирования фибрил. Эффект возрастает по мере увеличения молекулярной массы ПЭГ [164]. ПЭГ 2000 и 20000 способствуют увеличению фибрилляции Тау-белка человека, приона человека и Cu,Zn-супероксиддисмутаза человека, но вызывают уменьшение степени агрегации лизоцима и приона кролика [165]. ПЭГ, создавая «плотную среду» препятствует денатурации химотрипсина и пероксидаз в присутствии органических растворителей [166, 167].

1.1.8. Неспецифические взаимодействия и комплексообразование

Другое объяснение изменений в структуре белков состоит в наличии неспецифических взаимодействий между полиэтиленоксидными звеньями и отдельными аминокислотами белка. Основную роль играют гидрофобные взаимодействия, вклад которых увеличивается с увеличением молекулярной массы

ПЭГ [168, 169], а также водородные и вандерваальсовы связи между этиленоксидными звеньями и аминокислотами, входящими в состав активного центра фермента [146]

ПЭГ образуют комплексы с такими белками как пепсин свиньи [170], ЧСА [171, 172], БСА [172], лактатдегидрогеназа свиньи [173]. На примере пепсина показано образование комплексов за счёт водородных связей между карбоксильными группами активного центра фермента с этиленоксидом при pH 3,0, при более высоких значениях pH комплексы не образуются [170].

ПЭГ с различной молекулярной массой (4000, 6000, 10000, 20000) оказывают разное влияние на коэффициент распределения лизоцима, химотрипсина, А, бычьего сывороточного альбумина, трансферина и каталазы в двухфазной системе (водный раствор декстрана/водный раствор ПЭГ) [174]. Коэффициент распределения, т.е. отношение концентраций белка в фазе, содержащей преимущественно ПЭГ, к концентрации белка в фазе, содержащей преимущественно декстран, уменьшается с увеличением молекулярной массы ПЭГ. Коэффициенты распределения белков значительно уменьшаются в присутствии ПЭГ с небольшой молекулярной массой и выходят на постоянные значения в присутствии ПЭГ с большой молекулярной массой. Исключение составляет химотрипсин, коэффициент распределения которого практически не зависит от молекулярной массы ПЭГ. Увеличение молекулярной массы декстрана приводило к увеличению коэффициента распределения в случае химотрипсина и лизоцима, уменьшению в случае каталазы, а в случае БСА и трансферина коэффициент распределения никак не менялся. Увеличение молекулярной массы ПЭГ или декстрана приводит к уменьшению свободного объёма, который может занять белок. Но тем не менее ПЭГ и декстран оказывают разное влияние на коэффициент распределения белков, что, по мнению авторов исследования, говорит о наличии неспецифических взаимодействий между белком и ПЭГ. ПЭГ является значительно более гидрофобным полимером чем декстран, и гидрофобность ПЭГ увеличивается с увеличением молекулярной массы ПЭГ, поэтому более гидрофобные белки, такие как БСА, вытесняются в меньшей степени чем малые белки, такие как лизоцим [174].

Наличие гидрофобных взаимодействий между белком и ПЭГ подтверждает также изменение термической устойчивости некоторых белков – лизоцима,

рибонуклеазы, химотрипсиногена и β -лактальбумина – в присутствии ПЭГ 200, 400, 1000 и 4000, а также ЭГ [175]. Температура плавления T_m β -лактальбумина уменьшается при увеличении концентрации ЭГ и ПЭГ с 90° до 75° С; T_m химотрипсиногена тоже уменьшается, при этом наибольшее падение (с 56° до 52°) происходит при увеличении концентрации ПЭГ 1000, а наименьшее (с 56° до 55°) – в присутствии ПЭГ 4000; T_m температура плавления лизоцима также уменьшается при увеличении концентрации ПЭГ, при этом наибольшее уменьшение (с 75° до 65°) вызывает добавление ПЭГ 1000, а все кроме ПЭГ 4000 влияют в наименьшей степени (с 75° до 70°); T_m рибонуклеазы никак не меняется в присутствии ЭГ и ПЭГ. Стабильная конформация белка отличается тем, что гидрофобные остатки аминокислот обращены во внутреннюю полость глобулы. При денатурации белка гидрофобные группы оказываются экспонированными в растворитель. Если в растворителе присутствуют вещества, вступающие во взаимодействие с этими группами, денатурация белка «упрощается», что приводит к более низкой температуре теплового перехода. ПЭГ участвует в гидрофобных взаимодействиях с белками, упрощая тем самым переход белков к развёрнутому состоянию, понижая их термическую устойчивость [175].

Исследования методом ЯМР-спектроскопии подтверждают наличие гидрофобных взаимодействий между лизоцимом и ПЭГ 4000 [123]. Наиболее значительные сдвиги характерны для пиков Arg-61, Trp-62, Trp-63 и Arg-73, т.е. аминокислот, формирующих центр связывания, наибольший сдвиг характерен для Trp-62. Полученные результаты согласуются с предположением о гидрофобном характере взаимодействия остатков аминокислот. Возмущения, наблюдаемые для остатков других аминокислот (Lys-96 и Asp-101) говорят о наличии незначительных изменений в конформации белка, вызванных гидрофобным взаимодействием между Trp-62 и этиленовыми звеньями ПЭГ.

Тем не менее образование устойчивых комплексов белков с полиалкиленоксидами ставится под сомнение. Смешение растворов некоторых белков, например, бычьего сывороточного альбумина (БСА) или α -химотрипсина (ХТ) с проксанолами (двублочными сополимерами этиленоксида и пропиленоксида) при комнатной температуре не приводит к образованию комплексов [176]. Стабильные комплексы ХТ с проксанолами можно получить при нагревании

растворов до температуры, соответствующей начальной стадии термической денатурации белка (40 – 60 °C) [176] или при использовании высоких давлений (1,1 – 400 МПа) [177]. При этом, если добавление ПЭГ не влияет на процесс плавления белковых глобул, то в присутствии сополимеров этиленоксида и пропиленоксида происходит смещение пика плавления в область более высоких температур, а также его увеличение, что указывает на большую термическую устойчивость образующегося комплекса. Полученные комплексы сохраняют каталитическую активность. Постепенно комплексы диссоциируют в растворе на исходные компоненты, при этом термоиндуцированные комплексы характеризуются большей термической стабильностью по сравнению с полученными под действием высоких давлений. Если первые разрушаются через сутки, то вторые распадаются уже через 1,5 – 2 часа. По всей видимости, при нагревании или под действием высокого давления происходит разворачивание белковой глобулы, и в результате аминокислоты с гидрофобными боковыми группами оказываются на поверхности белка. Одновременно происходит разворачивание гидрофобного блока сополимера. Полипропиленоксидный блок сополимера вступает во взаимодействия с гидрофобным ядром белковой глобулы, что в итоге приводит к образованию устойчивого комплекса [176]. Большая устойчивость термоиндуцируемых комплексов объясняется тем, что при нагревании происходит более глубокое проникновение пропиленоксидных блоков внутрь белковой глобулы по сравнению с комплексами, которые были получены при действии высоких давлений [177]. Постепенный распад, «выталкивание» сополимера из глобулы ХТ, указывает на нестабильность данных комплексов.

Могут ли быть получены стабильные комплексы плуроников с белками без применения высоких температур и давлений? В некоторых работах показано, что при простом смешивании плуроников с белками никакие комплексы не образуются, и полимеры не оказывают какого-либо влияния на структуру белка. Это было показано на примере взаимодействия целого ряда различных плуроников с БСА, ХТ и фитогемагглютинином в широком диапазоне концентраций и температур (20 – 40 °C) [178]. При исследовании взаимодействия целого ряда ПЭГ с различной молекулярной массой и различных плуроников (F38, F68, F108, P105, P103) с

лизоцимом и бычьим сывороточным альбумином было показано отсутствие какого-либо специфического взаимодействия [81].

1.1.9. Лизоцим как модельный белок

В качестве модельного белка при исследовании влияния НПАВ на белки широкое распространение получил лизоцим, фермент класса гидролаз, обладающий более стабильной структурой по сравнению с БСА [179]. Лизоцим – фермент, катализирующий гидролиз пептидогликана клеточной стенки бактерий. Лизоцим участвует в формировании врождённого противoinфекционного иммунитета и содержится в больших количествах в барьерных органах животных. Лизоцим, выделенный из различных источников, отличается по структуре и свойствам [180].

Использующийся в исследовательской практике лизоцим куриного яйца представляет собой состоящую из 129 остатков полипептидную цепь, свёрнутую в компактную глобулу. Жёсткость структуры белка обеспечена наличием четырёх дисульфидных мостиков. Изoeлектрическая точка лизоцима pI 11, при нейтральном pH поверхностный заряд на молекуле белка равен +8 [181, 182]. Лизоцим существует в виде мономеров при $pH < 5$, при более высоких значениях pH в результате потери одного или двух протонов молекулой белка образует димеры [183].

В ранних исследованиях ферментативной активности лизоцима было показано, что оптимальное значение pH для фермента варьирует от 5,0 до 7,0, оптимальная ионная сила среды составляет 0,1, оптимальная концентрация фермента – 0,01—1 мг/мл. При увеличении концентрации NaCl до 1,0 М ферментативная активность уменьшается [184].

Лизоцим катализирует реакцию гидролиза 1,4-β-гликозидной связи между N-ацетилмурамовой кислотой и N-ацетилглюкозамином. Каталитический центр состоит из остатков двух аминокислот – глутаминовой кислоты (Glu-35) и аспарагиновой кислоты (Asp-52). Протонированный остаток Glu-35 выступает в качестве донора протона при разрыве гликозидной связи субстрата, разрушая связь, а депротонированный остаток Asp-52 выступает в роли основания при активации воды. Т.е., имеет место механизм согласованного действия двух карбоксильных групп, выступающих соответственно в роли электрофила или активатора субстрата и нуклеофила или активатора воды [185]. Остатки лизина и гистидина не входят в

состав каталитического центра, но участвуют в ферментативной реакции, создавая положительный заряд на поверхности белковой глобулы, необходимый для связывания с отрицательно заряженными клетками [186]. В связывании активного центра и субстрата принимают участие, расположенные в активном центре фермента остатки триптофана (Trp-62, Trp-63 и Trp-108) [187]. Сайт связывания лизоцимов может связывать шесть лигандов [188].

Для лизоцима описано изменение каталитических свойств в результате конформационных изменений под влиянием ионной силы и гидростатического давления [189]. Максимальная скорость реакции достигает максимальных значений при изменении концентрации хлорида натрия в диапазоне от 0 до 0,125 М и уменьшается при дальнейшем увеличении концентрации хлорида натрия до 0,208 М. Константа Михаэлиса возрастает с увеличением концентрации хлорида натрия в 18 раз. Значения изменения активационного объема $\Delta V^\ddagger$ (разности молярных объемов активного комплекса и исходных реагентов) в ходе реакции изменяются от -8 до 0 см³/моль при увеличении концентрации соли. Этот эффект обусловлен, предположительно, тем, что в комплексы встраивается разное количество молекул соли, что приводит к изменению каталитических характеристик комплекса. При увеличении давления до 476 атм максимальная скорость реакции незначительно возрастает, константа Михаэлиса уменьшается.

1.2. РАДИОХИМИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ИССЛЕДОВАНИЮ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ И ПАВ

1.2.1. Радиоактивные изотопы в исследованиях белков и ПАВ

Исследование взаимного влияния плуроников и белков на границе раздела фаз связано с количественным определением обоих компонентов смеси. Большинство исследований касается водных растворов смесей белок-ПАВ или их адсорбции на твёрдых поверхностях или на границе вода-воздух. В качестве модели клеточной мембраны может быть использована граница водный раствор/органическая жидкость. Исследование поведения систем белок-ПАВ на границе водный раствор/органическая жидкость усложняется тем, что оба компонента смеси могут перемещаться из одной фазы в другую. Для определения количества белка или ПАВ на границе раздела фаз может быть использован метод радиоактивных индикаторов.

В состав всех органических соединений входят водород, углерод, в состав многих соединений входят также кислород, азот, сера, фосфор. Поэтому для получения меченых белков и ПАВ обычно используются радиоактивные изотопы этих элементов. Радиоактивные изотопы кислорода и азота неприемлимы для биохимических и физико-химических исследований, поскольку имеют слишком малые периоды полураспада (от миллисекунд до минут). К основным радионуклидам, которые используются при изучении белков и ПАВ, относятся ^3H (тритий), ^{14}C , ^{32}P , ^{33}P и ^{35}S , а также ^{125}I .

1.2.1.1. Иод-125

Из приведённых радионуклидов иод-125 является единственным γ -излучателем. ^{125}I имеет период полураспада 60 дней и высокую удельную активность, максимальная энергия γ -излучения равна 0,25 МэВ [70, 71]. Иод-125 получают в реакторах путём облучения стабильного изотопа ксенона-124 потоком нейтронов. Для введения ^{125}I в биологические молекулы применяют реакции химического синтеза с использованием K^{125}I или Na^{125}I , при мечении белков иод присоединяется в основном по остаткам тирозина, реже – по остаткам фенилаланина, триптофана, гистидина. Введение ^{125}I в молекулы белков используется при изучении адсорбции и структуры слоёв белков на твёрдых поверхностях. ^{125}I был использован в исследованиях адсорбции лизоцима [190], БСА

[191, 192], иммуноглобулина G [191, 192], ЧСА [192, 193], аро- α -лактальбумина [194], рибонуклеазы [195]. Введение иода в молекулу белка нередко приводит к изменениям в его структуре, кроме того, иодирование белка часто сопряжено с побочными окислительными процессами. Поэтому иодированные белки химически и биологически не всегда идентичны нативным, а их адсорбционные свойства значительно отличаются [190]. Исследования взаимодействия белков с ПАВ требуют меченых соединений с свойствами, идентичными свойствам природных соединений.

1.2.1.2. Фосфор-32 и -33

Изотопы фосфора (^{32}P и ^{33}P) используются в биологии и медицине при исследовании обмена веществ в живых организмах. Период полураспада ^{32}P составляет 14 дней, максимальная энергия β -излучения – 1,7 МэВ. Период полураспада ^{33}P – 25 дней, максимальная энергия β -излучения – 0,25 МэВ. Изотопы фосфора получают облучением потоком нейтронов соответствующих изотопов серы – ^{32}S и ^{33}S . Основным способом мечения белков является фосфорилирование протеинкиназами с помощью ^{32}P АТФ [196]. Изотопы фосфора были использованы при определении потенциальных сайтов фосфорилирования некоторых интерферона- $\alpha\text{B}2$ и интерферона- $\alpha\text{A/D}$ [197], казеин-киназ [198, 199] и тирозинкиназы Src [200], при изучении взаимодействия кальмодулина и кальмодулин-связывающего белка [201], а также при изучении связывания моноклональных антител с поверхностью клетки [202].

1.2.1.3. Сера-35

Реже применяются соединения, меченные ^{35}S . Период полураспада ^{35}S составляет 87 дней. Максимальная энергия β -излучения для серы ^{35}S составляет 0,167 МэВ. Для введения серы-35 в белки используют методы биологического синтеза или изотопного обмена с участием ^{35}S -метионина или ^{35}S -цистеина [203], реже используют реакции фосфорилирования протеинкиназами в присутствии АТФ, меченного серой-35 по фосфатной группе [196]. Для введения серы-35 в полимеры используют реакции сульфатирования полимеров и последующего изотопного обмена с меченой серной кислотой [204]. Меченные серой-35 соединения были использованы при изучении сорбции сополимера стиреусульфоната и трет-бутилстирола на границе вода/толуол [204].

Недостатком соединений, меченных изотопами фосфора и серы, является их низкая химическая стабильность. Кроме того, применение как ^{35}S , так и изотопов фосфора, ограничено тем, что эти изотопы в отличие от углерода-14 и трития не являются универсальными для органических соединений, что значительно уменьшает область их применения.

1.2.1.4. Углерод-14

Углерод и водород – основные компоненты органических молекул, поэтому их замена на углерод-14 и тритий не приводит к значительному изменению свойств органических соединений. Из-за небольшой разницы в массах меченых и немеченых соединений эти эффекты очень малы, и в большинстве физико-химических и биохимических экспериментов ими можно пренебречь. Периоды полураспада ^{14}C и T позволяют проводить длительные эксперименты.

Долгоживущий изотоп углерода ^{14}C относится к природным радиоактивным изотопам. Период полураспада составляет 5730 лет, в результате β^- -распада образуется стабильный нуклид азота ^{14}N . В природе углерод-14 постоянно образуется в верхних слоях атмосферы в результате поглощения атомами азота тепловых нейтронов, входящими в состав космического излучения. Эта же реакция используется при получении ^{14}C в ядерных реакторах, при этом выделившийся ^{14}C осаждают в виде конечного продукта – $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$. Полученное вещество является предшественником многих органических соединений, меченных углеродом-14. Для введения углерода-14 в органические молекулы используют биологический синтез, т.е. культивирование микроорганизмов в присутствии $^{14}\text{CO}_2$ в качестве основного источника углерода, или реакции химического синтеза. Углерод-14 широко используется при изучении сорбции гуминовых соединений [205, 206].

При изучении смесей белков и ПАВ метка ^{14}C может быть введена в любой из компонентов системы для изучения адсорбции, как это было впервые использовано при изучении меченых ^{14}C –ПАВ [207] и ^{14}C –ацетилпроизводных белков [208, 209]. В этих экспериментах определяли количество меченых веществ – цетилтриметиламмония бромида (ЦТАБ), белков лизоцима, β -казеина и БСА – на границе вода/воздух и на границе двух несмешивающихся жидкостей вода/толуол. Для этого проводили измерение β -излучения, вызывающего сцинтилляции в

органическом растворе. Полученные данные сопоставляли с результатами измерения двумерного давления по методу Вильгельми, измерения поверхностной концентрации по методу эллипсометрии и определения толщины плёнки концентрированного вещества на границе вода/воздух. Было показано совпадение результатов, полученных методом эллисометрии и методом измерения радиоактивности, что указывает на точность метода и одинаковое поведение меченых и немеченых соединений.

Было показано, что в области низких поверхностных концентраций энергия активации адсорбции равна нулю, а скорость адсорбции определяется преимущественно процессами диффузии. В области более высоких концентраций, соответствующих насыщенному слою, энергия активации отлична от нуля, и скорость процесса определяется способностью белка проникать в существующий слой и переорганизовываться на поверхности. Было обнаружено различие в скорости адсорбции для белков, различающихся по структуре и молекулярной массе. В области низких поверхностных концентраций скорость адсорбции определяется процессами диффузии, при более высоких поверхностных концентрациях белка скорость адсорбции определяется способностью белка проникать в адсорбционный слой и менять его организацию [208, 209].

Данные по адсорбции меченных углеродом-14 соединений [210, 211, 212] были применены для описания структуры адсорбционных слоёв исследуемых белков на границе фаз вода/воздух и вода/толуол. Показано, что β -казеин является более поверхностно-активным по сравнению с лизоцимом и БСА. На границе вода/воздух при низких значениях поверхностного давления ($\pi < 8$ мН/м) β -казеин ведёт себя как линейный полимер, который необратимо адсорбируется вдоль границы раздела фаз (в виде «цепи»). При увеличении поверхностного давления молекулы «сгибаются», образуя «петли», ориентированные перпендикулярно границе раздела фаз. За счёт образования «петлей», площадь, занимаемая одной молекулой на границе раздела фаз, уменьшается, и адсорбируется всё большее число молекул казеина. На границе вода/толуол «петли» образуются даже при минимальных значениях поверхностного давления. При высоких концентрациях белка ($>0,01\%$) образуются многослойные плёнки толщиной 100 Å. Лизоцим при низких значениях поверхностного давления ($\pi < 8$ мН/м) денатурирует, а при более

высоких значениях на границе раздела присутствуют денатурированные и сохраняющие нативную структуру белки, на границе вода/толуол молекулы лизоцима денатурированы в большей степени чем на границе вода/воздух. Адсорбированные молекулы БСА содержат нативную структуру, значительных конформационных изменений не происходит, структура слоя на границе вода/воздух является промежуточной по отношению к структуре лизоцима и β -казеина.

Белки β -казеин и α s-казеин, меченные ^{14}C , были использованы для изучения конкурентной адсорбции смесей на границе вода/триолеин [213, 214]. Было показано, что адсорбция β -казеина существенно ниже, чем адсорбция α s-казеина. При адсорбции эквимольной смеси соотношение β -казеина и α s-казеина в поверхностном слое составляет 2:1, т.е. равновесный состав адсорбционных слоёв при различных соотношениях концентраций белков в водной смеси не согласуется с моделью Ленгмюра. Отклонение связано со способностью одного из белков, β -казеина, вытеснять второй, α s-казеин.

Применение меченных ^{14}C белков – БСА, β -лактальбумина, α -лактоглобулина, овальбумина, фосвитина, лизоцима, β -химотрипсина, пепсина, панкреатической РНКазы и других – в системе вода/триолеин показало, что адсорбция белков на межфазной границе зависит от заряда белка и характера взаимодействия белков с поверхностью: для положительно заряженных белков адсорбция определяется энергетическим барьером, для отрицательно заряженных белков лимитирующей стадией является диффузия вещества к поверхности [215, 216]. Изучение адсорбции на границе вода/воздух меченных ^{14}C лизоцима и его мутантных форм показало, что внесение изменений в структуру белка (замена аминокислотных остатков) оказывает влияние на его адсорбцию: менее стабильная форма белка адсорбируется быстрее и в большем количестве по сравнению с более стабильными вариациями [217].

1.2.1.5. Тритий

В качестве изотопной метки при изучении большинства органических соединений используется также тритий (^3H). Тритий является природным радионуклидом, образующимся в верхних слоях атмосферы в результате столкновения атомов азота с частицами космического излучения. При β^- -распаде

трития образуется стабильный изотоп гелия (^3He). Период полураспада трития составляет 12,33 года, что позволяет проводить исследования практически любой продолжительности, при этом тритий имеет ряд преимуществ по сравнению с ^{14}C . Максимальная энергия β -частиц трития составляет 18,6 кэВ, средняя – 5,6 кэВ. Пробег β -частиц в воздухе составляет 0,6 см, а в биологической ткани – 1 мкм. В воде максимальный пробег β -частиц трития составляет 1,5—1,7 мкм, при этом 50 % частиц поглощается в слое воды толщиной 0,3 – 0,4 мкм, 80 % частиц – в слое 1 мкм [218, 219]. Таким образом, тритий – это относительно безопасный с радиологической точки зрения радионуклид [220].

1.2.2. Методы введения тритиевой метки

Соединения, меченные атомами трития, ведут себя аналогично немеченым, однако существует опасность потери части трития из меченого соединения по причине изменения рН среды (химическая нестабильность) или при ферментативном окислении (метаболическая нестабильность) с последующим образованием тритиевой воды НТО, присутствие которой в исследуемой системе может изменить результаты измерений [221]. По этой причине метка должна вводиться в такие положения, в которых невозможны потери трития.

Для введения трития в органические соединения используются различные методы: химические (прямой органический синтез), биологические (биосинтез, ферментативные реакции), обменные методы. Последние включают группу методов, которые можно назвать физическими: реакции взаимодействия органических соединений с атомами трития, обладающими избыточной энергией, приобретённой в результате действия внешних факторов, таких как γ -излучение, ультрафиолет, электрический высоковольтный разряд, микроволновой высокочастотный разряд, термическая диссоциация [222].

1.2.2.1. Химический синтез

Прямой химический синтез является наиболее точным и надёжным способом получения меченых тритием соединений, это основной метод получения избирательно меченых соединений с высокой удельной активностью. Метод включает классические реакции органического синтеза: гидрирование кратных углерод-углеродных связей с использованием газообразного трития, дегалогенирование, восстановление тритидами металлов (алюмотритидом лития,

боротритидом лития и др.). Исходным материалом в этих методах служит газообразный тритий. Используются катализаторы на основе платины, палладия, родия или их оксидов. В качестве растворителей используются ацетон, метанол, этанол, диоксан [222, 223, 224]. Многие аминокислоты были помечены тритием с применением данных методов [225, 226]. При синтезе меченых аминокислот и белков применяются также реакции восстановления тритидами металлов (алюмотритид лития, боротритид натрия и др.), декарбоксилирования производных α -ацетамидомалоновой кислоты, наращивание цепи по реакции Арндта-Эйстера [222, 227].

Распространённым методом введения трития в белковые молекулы является восстановительное метилирование боротритидом натрия [228, 229], таким образом были помечены лютеинизирующий гормон [230], тауматин I [231], белок A [232], гемоглобин A₂ [229], компонент C3 системы комплемента [229], иммуноглобулин G [232, 229], инсулин [233, 234], лактатдегидрогеназу [235], мембранные белки эритроцита голубя [236], амилин [237], кальцитонин [237], родопсин [238]. С помощью данного метода в состав белка можно ввести до шести атомов трития [229], но при этом метилирование белков может приводить к значительным изменениям в конформации и свойствах [239].

Другой метод основан на реакциях дегалогенирования с применением иодированных пептидов или белков в качестве исходных соединений. Реакция проходит в очень мягких условиях даже при температуре 0 – 5 °C. Метод позволяет получать вещества с высокой удельной активностью. Недостаток метода состоит в образовании тритированных галогенводородов, которые являются каталитическими ядами. Для их связывания в смесь добавляют KOH, NaOH, NH₃, Et₃N или BaCO₃, что приводит к смещению равновесия, ускорению дегалогенирования и подавлению побочных реакций [223]. Методом дегалогенирования были получены меченые окситоцин [240, 241], кортикотропин [242], меланотропин [243]. Метятся главным образом тирозильные остатки, одновременно происходит избирательное мечение ароматических аминокислот [240, 241].

Для многих сложных органических соединений прямой химический синтез не описан или его применение для введения изотопной метки практически неосуществимо. Методами химического синтеза могут быть получены меченные

тритием пептиды с значениями удельной активности в области 1,11–5,55 ТБк/мМ с сохранением биологической активности. Метод не может быть использован для мечення глобулярных белки, поскольку присутствие органического растворителя или металлического катализатора приводит к денатурации белка [227].

1.2.2.2. Биохимические методы

Биохимические методы используются преимущественно для получения соединений, меченных углеродом-14. В основе метода – выращивание бактерий или одноклеточных водорослей в бикарбонатном растворе ^{14}C для получения меченых α -аминокислот и углеводов. Биохимические методы редко используются для мечення тритием из-за подвижности атомов водорода и гидропонного характера всех биологических систем [222, 224].

Биохимические методы введения тритиевой метки включают реакции в неспецифических средах с применением в качестве среды тритий-содержащей воды или других тритий-содержащих соединений. Любой организм, выращенный в тритий-содержащей воде, будет иметь некоторое количество трития во всех водородсодержащих соединениях, но уровень активности будет слишком низким для получения нужных продуктов. Кроме того, ионизирующее излучение трития сильно снижает жизнеспособность биологических клеток [222]. Тем не менее биохимические методы могут быть использованы при получении меченных тритием аминокислот, нуклеотидов и других соединений [224].

К биохимическим методам также относятся реакции с применением различных ферментов в присутствии тритиевой воды, таким образом могут быть помечены различные аминокислоты [226].

Меченые соединения, полученные путём химического синтеза, могут быть использованы при биосинтезе более сложных соединений. Для введения трития в белковые молекулы могут быть использованы меченые аминокислоты: меченый лейцин был использован при исследовании внутриклеточных перемещений белков секреции поджелудочной железы в организме морских свинок [244] и белков зрительного нерва кроликов [245]; сочетание меченых лейцина, валина и триптофана – при исследовании метаболизма белков мозга мыши [246]; из тритий-содержащих аминокислот могут быть получены меченые белки, например, лизоцим [247], тироглобулин [248], инсулин [249]. Метка может быть также введена в

небелковый компонент пептидов и белков: в гуанидин в составе антагониста рецептора нейропептида Y [250], в никотинамидадениндинуклеотидфосфат [251, 252], дерматансульфат [253], 5,10-метилентетрагидрофолат в составе тимидилатсинтазы [254].

Таким образом, биосинтез может быть использован для получения меченых белков, но не позволяет достичь необходимых значений удельной активности и связан со значительными трудностями при выделении и очистки меченого белка из биологического препарата.

1.2.2.3. Изотопный обмен

В качестве основного метода получения меченных тритием соединений используется изотопный обмен. Метод является одностадийным и универсальным, не требует наличия соответствующих соединений-предшественников и делает возможным введение трития в очень сложные молекулы. В качестве тритий-содержащих реагентов используют тритиевую воду (каталитический обмен в растворе) или газообразный тритий (метод насыщения газом). Применимость метода изотопного обмена с тритиевой водой определяется устойчивостью соединений в условиях обменной реакции. Преимущество состоит в отсутствии побочных продуктов гидрирования кратных связей или функциональных групп. Замещение протия на тритий происходит в лабильных положениях, и тритий затем легко обменивается с протонным растворителем. Введение тритиевой метки по C—H связи проходит с меньшей вероятностью и требует особых условий. При проведении изотопного обмена в растворе используются различные катализаторы: фосфорная, серная, хлорная и трифторуксусная кислоты, трифторид бора, щёлочи, ионообменные смолы, катализаторы на основе платины, палладия, иридия, родия и рутения. Минимальная температура, при которой изотопный обмен протекает с приемлемой скоростью, составляет 100 °C, обычно реакцию проводят при температуре 130 – 180 °C в течение 1 – 3 дней. Изотопный обмен с тритиевой водой может быть использован для введения трития в соединения, устойчивые в описанных условиях, в т.ч. аминокислоты, сахара, коферменты и стероиды, но не в белки [222, 223].

Более широкое распространение получил изотопный обмен с газообразным тритием, в основе которого лежит реакция обмена атома трития с атомом протия

растворённого соединения в условиях гомогенного или гетерогенного катализа. В качестве катализаторов используют соединения платины, палладия, родия, никеля, в качестве подложек – C, Al₂O₃, BaSO₄, CaCO₃. На протекание реакции оказывают влияние процентное содержание металла на носителе, температура реакции, давление трития и время реакции [255, 256, 257, 258, 259]. Ключевую роль в реакциях изотопного обмена в присутствии твёрдых катализаторов играет явление спилловера – образование активированных атомов трития, способных мигрировать по подложке и вступать в реакцию с субстратом [260]. По различным предположениям водород может мигрировать в виде сольватированного протона, протон-электронной пары или атомарного водорода [261]. Скорость и выход реакции изотопного обмена возрастают вместе с температурой, но при этом возрастает и степень разложения вещества, поэтому температура подбирается таким образом, чтобы добиться максимальной удельной радиоактивности и минимизировать количество побочных продуктов [257, 262]. Реакция протекает в более мягких условиях, поэтому может быть использована для получения более широкого круга соединений, чем реакции с тритиевой водой.

С помощью изотопного обмена были получены меченые жирные кислоты [263], углеводы [264, 265, 266, 267, 268, 269], пурины и пиримидины [270], нуклеозиды и нуклеотиды [271, 272, 273], гемоглобин [274], аминокислоты [258, 275, 276], пептиды [277, 278, 279], гормоны [280, 281], нейромедиаторы [282, 283], а также некоторые белки – коллаген, коллагеназа [284], β-глюкозидаза, лихеназа [285], β-галактозидаза [278], α-конотоксин [286], инсулин [287]. Большое количество полученных классов меченых соединений показывает его универсальность и большие перспективы. Недостатками метода являются нежелательные побочные процессы: дегалогенирование, гидрирование, восстановление различных функциональных групп [222, 288]. Так, для β-глюкозидазы показано, что при увеличении температуры реакции с 20 до 80 °C хотя и возрастает удельная активность (с 7 до 200 мКи/мг), но при этом значительно уменьшаются выход реакции (с 55% до 10%) и ферментативная активность (с 86% до 12%), что указывает на денатурацию белка [285].

Для проведения изотопного обмена с газообразным тритием применение катализаторов необязательно. Процесс радиоактивного распада молекулярного

трития является источником активных частиц, которые могут вступать в реакции с органическим веществом. Это свойство трития лежит в основе метода получения меченых соединений, предложенного К. Е. Вильцбахом в 1957 году: при выдерживании в течение нескольких суток или недель твёрдых соединений в атмосфере 5 – 15 Ки газообразного трития в результате β -распада инициируются реакции замещения водорода на тритий в органических молекулах [289].

Механизм реакции Вильцбаха включает передачу энергии β -излучения веществу, образование «горячих атомов» трития из-за распада одного из ядер в двухатомной молекуле газообразного трития, образование катиона He^3H^+ и передачу положительного заряда катиона другим молекулам с последующим образованием гелия и атомов трития. При возбуждении и ионизации газообразного трития и органического соединения они получают энергию, достаточную для протекания реакции изотопного замещения протия на тритий по связи C—H. Совокупность перечисленных реакций приводит к получению меченого соединения и большого количества побочных радиоактивных продуктов, как показано в таблице 1.

При выдерживании вещества в атмосфере газообразного трития скорость введения радионуклида составляет около 1% в сутки от общей активности трития, находящегося в системе. Обмен может протекать с любым атомом протия в соединении. В зависимости от природы облучаемого соединения распределение трития в меченых веществах может быть однотипным, избирательным или равномерным. Для очистки полученных меченных тритием соединений используют разные методы кристаллизации, дистилляции, сублимации, хроматографии (хроматография на бумаге, тонкослойная хроматография, газожидкостная хроматография, ионный обмен).

С помощью метода Вильцбаха могут быть получены меченные тритием соединения различной молекулярной массы, в том числе глобулярные белки, например, лизоцим [290], рибонуклеаза [290, 291], γ -глобулины [292, 293], термолизин [291], эластаза [291]. Однако при получении меченых соединений происходит образование большого количества примесей с высоким содержанием трития.

Таблица 1. Процессы, происходящие при распаде трития.

В-распад трития в составе ${}^3\text{H}_2$ ${}^3\text{H}_2 \rightarrow \text{He}^3\text{H}^+ + \beta^-$
Передача заряда $\text{He}^3\text{H}^+ + \text{RH} \rightarrow \text{RH}^+ + \text{He}^3\text{H}$ $\text{He}^3\text{H}^+ + {}^3\text{H}_2 \rightarrow {}^3\text{H}_2^+ + \text{He}^3\text{H}$
Диссоциация $\text{He}^3\text{H} \rightarrow \text{He} + {}^3\text{H}$
Радиолиз $\text{RH} \rightarrow \text{RH}^+ + \text{e}^-$ ${}^3\text{H}_2 \rightarrow {}^3\text{H}_2^+ + \text{e}^-$
Ионно-молекулярные реакции $\text{He}^3\text{H}^+ + \text{RH} \rightarrow \text{R}^3\text{H}^+ + \text{He} + \text{H}$ $\text{RH}^+ + {}^3\text{H}_2 \rightarrow \text{R}^3\text{H}^+ + \text{H}^3\text{H}$
Радикальные реакции ${}^3\text{H} + \text{RH} \rightarrow \text{R}^\bullet + \text{H}^3\text{H}$ ${}^3\text{H} + \text{R}^\bullet \rightarrow \text{R}^3\text{H}$

Для получения меченных тритием соединений могут быть использованы такие методы как бомбардировка соединений ионами трития, ускоренными до энергии 100 эВ, пропускание электрического разряда через газообразный тритий, облучение смеси ультрафиолетовым, γ -, рентгеновским и микроволновым излучением. Все эти методы способствуют увеличению скорости введения трития в соединения, удельная активность конечного продукта оказывается значительно выше, чем при обычном мечении. Но при этом увеличивается содержание в системе побочных продуктов, что затрудняет очистку меченого соединения, а в некоторых случаях делает её невозможной [222].

1.2.2.4. Метод термической активации трития

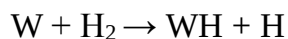
Более удобным и быстрым методом получения реакционных атомов трития является нагревание вольфрамовой проволоки с помощью электрического тока в атмосфере газообразного трития. Исторически этот метод получил название метода

термической активации трития (МТАТ). Метод термической активации трития был впервые использован при получении меченых углеводов в 1960-ые гг. [294]. Дальнейшее развитие метод получил в 1970-1990-ые гг. в Институте химической физики им. Н. Н. Семёнова РАН и на Химическом факультете МГУ им. М. В. Ломоносова [295, 296, 297]

В основе метода лежит диссоциация молекулярного трития на поверхности металла (вольфрамовой проволоки) при высокой температуре (1500 – 2000 К). Образующиеся атомы трития атакуют стенки реакционного сосуда, температура которого равна комнатной или составляет 77 К. В условиях низкого давления газа в реакционной системе (0,5 – 1 Па) атомы трития практически без потери энергии достигают стенок реакционного сосуда, где вступают в реакцию с нанесённой на стенки твёрдой мишенью. Замещение атомов протия на тритий происходит во всех стерически доступных фрагментах мишени с примерно равной вероятностью и не оказывает значительного влияния на свойства соединения [298].

Реакция получения атомарного трития проводится в стеклянном сосуде, в центре которого расположена вольфрамовая проволока. Вещество мишени тонким слоем наносится на стенки сосуда, в ходе реакции стенки сосуда охлаждаются жидким азотом. Результаты введения метки методом термической активации трития зависят от многих параметров: температуры вольфрамовой проволоки, давления газообразного молекулярного трития, способа приготовления мишени, времени взаимодействия атомарного трития с веществом, природы подложки, на которую нанесено вещество-мишень. При комнатной температуре происходит увеличение удельной радиоактивности полученного меченого соединения, но возрастает и количество побочных продуктов. От продолжительности реакции зависит степень разрушения мишени. Поэтому всегда требуется подбор оптимальных условий для получения меченого целевого соединения с высокой удельной радиоактивностью и минимальным количеством побочных продуктов. Подбор оптимальных условий позволяет вводить метку в сложные смеси молекул с равномерным распределением трития по компонентам смеси и увеличить количественные характеристики удельной радиоактивности меченых веществ [299, 300].

На вольфрамовой проволоке происходит реакция образования атомарного трития:



Образование атомов протекает со скоростью (выраженная в мм³/см²•мин), которая зависит от температуры и давления газа в реакционной системе [301, 302]. Реакция образования атомарного водорода включает несколько процессов: адсорбцию молекулярного водорода на поверхности вольфрамовой проволоки, диссоциацию молекул водорода с образованием переходного состояния с вероятностью $S(T)$ и последующую десорбцию водорода с поверхности металла в виде атомарного водорода H или в виде молекул H₂ [303].

С помощью МТАТ были получены самые разные классы меченных тритием высокомолекулярных биологически активных соединений – липиды и жирные кислоты [304], азотистые основания и их производные [305], аминокислоты, пептиды [306], рибосомы [298, 307], растительные вирусы [308], оболочечные вирусы [309], гуминовые вещества [310, 311]. Характеристики меченных тритием соединений определяются природой взаимодействия трития с органическими веществами.

1.2.3. Взаимодействие атомарного трития с органическими соединениями

Реакции атомарного трития T с органическими молекулами RH и RX, где X – функциональные группы (-NH₂, -OH, -COOH, -CONH₂, -SH, -Hal), аналогичны реакциям атомарного водорода с органическими соединениями и могут быть описаны с помощью радикального механизма реакции (табл.2.) [312, 313, 314]. Согласно предложенной теории механизма реакции, при взаимодействии атомов трития с органическими молекулами происходят четыре конкурирующих процесса:

- (1) замещение атома протия на тритий по связи C—H;
- (2) замещение функциональных групп на тритий;
- (3) гидрирование (точнее – тритирование) кратных связей;
- (4) замещение атома протия на тритий в функциональных группах.

Замещение протия по связи C—H приводит к образованию меченного тритием соединения. Замещение функциональных групп и тритирование кратных связей могут быть использованы при получении меченого вещества из вещества-предшественника (прекурсора) в других случаях приводит к образованию побочных продуктов (таблица 2). Замещение водорода в функциональных группах приводит к стабилизации трития в лабильных положениях («лабильная метка»), т.е. составе

обменоспособных групп (-NH₂, -OH, -COOH, -CONH₂, -SH). В такой форме содержится большая часть трития (90 – 99%), и эта доля не зависит от химической природы соединения [314]. Из лабильных положений тритий может удаляться при взаимодействии с протонными растворителями (вода, этанол и др.). Образование «лабильной метки» и побочных продуктов приводит к понижению выхода меченного тритием соединения и усложняет очистку.

Таблица 2. Процессы, происходящие в мишени при действии атомов трития.

Отрыв $RH + T\bullet \rightarrow R\bullet + TH$ $RX + T\bullet \rightarrow R\bullet + TX$
Рекомбинация $R\bullet + T\bullet \rightarrow RT$ $T\bullet + T\bullet \rightarrow T_2$
Диспропорционирование $R\bullet \rightarrow R_1C=CR_2 + H_2$
Рекомбинация радикалов $R\bullet + R\bullet \rightarrow R-R$
Диспропорционирование радикалов $R\bullet + R\bullet \rightarrow R_1C=CR_2 + H_2$

При взаимодействии органических молекул с атомами трития, полученными с помощью метода термической активации, протекают различные реакции, которые рассматриваются как побочные (аналогичные реакции протекают при использовании других методов активации трития) [315]. На удельную радиоактивность полученного меченого соединения и соотношение реакций замещения трития на тритий и побочных реакций оказывают влияние метод получения атомарного трития, давление и температура газообразного трития в реакционном сосуде, природа растворителя, структура молекулы-мишени [314]. В первых работах по получению меченых соединений (ряда α-аминокислот, полипептидного антибиотика А-128 и нуклеотида гуанозинмонофосфата) было высказано предположение, что значения удельной активности могут быть увеличены при большем времени обработки вещества [306].

Последующие эксперименты по мечению некоторых соединений (аминокислот, глюкозамина, сахаров, диазинов) показали, что время, за которое достигается максимальное активности, составляет от 10 с до 1 мин, увеличение длительности реакции приводило лишь к увеличению деградации изучаемых соединений [316, 317, 318]. Исследование влияния типа мишени на взаимодействие атомарного трития с аминокислотами показало, что скорости образования меченых серина и глицина примерно одинаковы для водных растворов и лиофилизированных препаратов, если время обработки вещества атомарным тритием составляло 45 – 270 с. Если обработка тритием велась в течение 15 с, скорость образования меченых серина и глицина в водном растворе в 1,75 раз больше скорости образования меченых аминокислот в лиофилизированной смеси [317].

При низких давлениях газа в реакционном сосуде протекает неравновесный процесс: на «холодную» мишень попадают атомы трития с высокой энергией («горячие атомы»). В этом случае кинетика и механизм реакции зависят от энергии падающих атомов, которая уменьшается за счёт нереакционных столкновений с молекулами мишени. При этом, вероятность снижения энергии атомов из-за нереакционных столкновений с молекулами мишени не учитывается радикально-диффузной моделью, и поэтому неравновесный процесс требует отдельного рассмотрения.

Эксперименты с белками показали, что замещение атома протия на тритий происходит преимущественно в тех аминокислотных остатках, которые находятся на поверхности белковой глобулы. На этом основании была выдвинута модель реакции первого соударения, которая предполагает, что после любого столкновения энергия атомов трития становится ниже 0,3 эВ, и реакция отрыва становится невозможна, поскольку энергия активации реакции отрыва составляет около 0,3 эВ. Более высокая вероятность обмена протия на тритий на поверхности твёрдой мишени, т.е. зависимость внутримолекулярного распределения трития от третичной структуры белка, позволяет использовать МТАТ для определения доступности молекул или их фрагментов атомам трития. Метод исследования структуры сложных соединений по их доступности атомарному тритию получил название метода тритиевой планиграфии. Метод включает обработку исследуемого вещества атомарным тритием и анализ распределения трития по фрагментам исследуемого

соединения. При исследовании белков или пептидов, например, мишень после обработки атомарным тритием подвергают кислотному, щелочному или ферментативному гидролизу с последующим определением радиоактивности в пептидах и аминокислотных остатках [319, 320, 321, 322].

Температура (энергия) атомов трития определяется условиями их генерации и обычно соответствует относительно высоким значениям, обуславливающим их высокую реакционную способность. При исследовании особенностей мечения плёнок полиэтилена было показано, что уменьшение температуры атомизатора от 2000 К до 1660 К приводит к уменьшению вероятности реакции при первом соударении атомов трития с органическим соединением [323]. Тем не менее даже снижение температуры атомов трития в газовой фазе до 77 К не препятствует протеканию реакций изотопного замещения с полиэтиленом [324]. При обработке тирозина и фенилаланина атомарным тритием реакция замещения протия на тритий имеет большую скорость даже при температурах, близких к 4 К [325].

При низких температурах реакции замещения протия на тритий могут приводить к образованию иных продуктов. В некоторых работах высказано предположение об изменении механизма реакций при переходе к низким температурам. При низких температурах преобладают реакции, имеющие практически нулевую энергию активации, протекающие по туннельному механизму реакции. При проведении обычных экспериментов доля туннельных реакций не велика, и ими пренебрегают [326].

Модель реакции первого соударения не всегда объясняет включение тритиевой метки. При исследовании структуры вириона вируса табачной мозаики методом тритиевой планиграфии было показано введение тритиевой метки в остатки, которые соответствуют периферическим пептидам T1, T12, T3 и T4, и остатки пептида T8, который расположен на внутренней поверхности центрального канала вируса. Таким образом, исследование показало практически одинаковую доступность аминокислотных остатков на поверхности и внутри вириона, что противоречит модели первого соударения [327].

Реакции атомарного трития с липидными мембранами и адсорбционными слоями белок—ПАВ также идут по механизму, отличному от модели первого

соударения, горячие атомы трития способны проникать в липидный бислой на глубину 5 нм [328].

Проникновение атомов трития в среды с высокой электронной плотностью (белки, липидный бислой) может быть объяснено эффектом «соскальзывания» в полости с пониженной электронной плотностью без потери реакционной способности [328]. Способность атомов терять свою энергию зависит от пространственной структуры мишени. Потеря энергии атомом трития с массой m при взаимодействии с молекулой с массой M зависит от угла рассеяния Θ . Реакция отрыва атома трития от молекулы мишени может идти только при $|\Theta| \rightarrow \pi$. В случае нерекциионного столкновения, т.е. при $|\Theta| > \pi/2$, атом трития покидает мишень после столкновения. В случае скользящего удара, т.е. при $|\Theta| < \pi/2$, атом трития проникает внутрь мишени, но при этом относительная потеря энергии будет находиться в интервале от 0 до $2m$. Средняя потеря энергии для диапазона углов рассеяния $|\Theta| < \pi/2$ составляет $(\Delta E/E)_{\text{ср}} = 0,363m$. Наибольшие потери энергии происходят на частицах с такой же массой. Таким образом, в случае соударения атома трития с любой атомной группой, приводящего к проникновению атома трития вглубь мишени, потеря энергии атомом будет небольшой, и атом трития сохраняет способность вступать в реакции обмена с протием.

Если атом вторгается в среду с высокой электронной плотностью, при последующем соударении он или вступает в реакцию, или покидает мишень. При наличии внутри мишени полости с достаточно гладкими поверхностями после первого соударения атом вступает в новые столкновения с углом отражения $|\Theta| < \pi/2$, т.е. проникновение в такие полости будет происходить с минимальной потерей энергии атома трития, т.е. будет происходить «соскальзывание» атомов трития в полость. Эффект «соскальзывания» наблюдается при взаимодействии атомарного трития с структурированными объектами с параллельной ориентацией молекул, между которыми расположены полости с более низкой электронной плотностью, такие как бислойные липидные мембраны и адсорбционные слои ПАВ [329].

Отклонение от модели первого соударения наблюдается при взаимодействии атомарного трития с вирусом табачной мозаики [327]. Между соседними белковыми субъединицами, образующими оболочку вируса, имеются области с пониженной электронной плотностью с диаметром до 5 Å, этого достаточно для проникновения

через них атомов трития. Межсубъединичные области с пониженной энергией, через которые тритий «соскальзывает» во внутреннюю полость макромолекулярного комплексов, обнаружены у фага MS2 [330].

1.2.4. Метод тритиевой планиграфии

С помощью МТАТ могут быть получены меченые препараты с высокой удельной радиоактивностью и сохранением структуры и биологических функций, в т.ч. ферментативной активности. Для глобулярных белков характерна плотная упаковка составляющих их аминокислот, и включение метки происходит преимущественно в аминокислотные остатки, расположенные на поверхности белковой глобулы, поэтому распределение трития по аминокислотным остаткам белка коррелирует с третичной структурой [319, 320]. Исследование распределения метки по аминокислотным остаткам с последующим определением структуры белка лежит в основе метода тритиевой планиграфии [331].

Метод тритиевой планиграфии включает следующие стадии: приготовление водного раствора исследуемого соединения; нанесение водного раствора на стенки сосудов с последующей заморозкой жидким азотом; обработку адсорбционного слоя атомарным тритием; выделение и очистку белка, т.е. удаление лабильной метки и побочных продуктов с помощью диализа, хроматографии или электрофореза; тотальный гидролиз белка, включающий ферментативный гидролиз с помощью соответствующих ферментов (трипсина, химотрипсина и др.), разделение полученных пептидов с применением методов хроматографии, кислотный или щелочной гидролиз пептидов, выделение аминокислот; аминокислотный анализ с определением удельной радиоактивности всех аминокислот белка и последующее построение трёхмерной модели структуры белка с использованием полученных данных [327, 331].

Метод тритиевой планиграфии используется для определения доступной поверхности белка на уровне отдельных аминокислотных остатков и изучения пространственной структуры и конформационных переходов [327, 331]. Преимущество по сравнению с спектральными методами состоит в возможности исследования как кристаллов, так и растворов биологических макромолекул. Высокая чувствительность позволяет определять конформационные переходы, которые не могут быть обнаружены с помощью спектральных методов [327].

Метод используется для получения количественной информации о доступной поверхности – поверхности белков, которую могут достичь молекулы растворителя. Доступная поверхность белка определяет способность белка вступать во взаимодействие с другими соединениями и играет ключевую роль в процессах функционирования белков в организме. Удельная радиоактивность аминокислот коррелирует с теоретически рассчитанной площадью доступной поверхности аминокислот [320]. Для определения способности аминокислотного остатка вступать в реакцию с атомами трития с образованием меченого соединения используют нормирующие коэффициенты (K), полученные из экспериментов с различными модельными системами, которые приведены в таблице 3.

Введение метки в аминокислоту не зависит от соседних по цепи аминокислотных остатков и расположения остатка на N- или C-конце полипептидной цепи. Мечение аминокислот происходит с приблизительно равными вероятностями в расчёте на одну C-H-связь или на единицу площади доступной поверхности [327, 332]. В доступную для введения тритиевой метки поверхность не входят атомы, у которых нет связи с атомом водорода (в белках к таким относятся атомы кислорода карбонильной группы, атомы серы в цистеине и метионине), а также боковые группы, из которых тритиевая метка легко удаляется в результате обмена с водой ($-\text{NH}_2$, $=\text{NH}$, $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{CONH}_2$, $-\text{SH}$). Таким образом на поверхности, исследуемой методом тритиевой планиграфии, присутствуют разрывы, соответствующие участкам, содержащие перечисленные группы [331].

Изучение белков с известной пространственной структурой показало существование линейной зависимости между включением метки и площадью доступной поверхности белка, что может быть использовано при определении доступной поверхности белков с неизвестной структурой [322], таких как парвальбумин щуки [322] и ЧСА [333]. Исследование аминоксил-тРНК-синтетазы из *E.coli* и *Thermus thermophilus* показало значительное увеличение площади доступной поверхности Pro, Phe, Leu и Arg в термофильном ферменте, что, предположительно, указывает на роль электростатических и гидрофобных взаимодействий в стабилизации белка при высоких температурах [334].

Таблица 3. Нормировочные коэффициенты, характеризующие способность аминокислотных остатков взаимодействовать с атомами трития с образованием меченого соединения.

Аминокислотный остаток	<i>K</i> [335]	<i>K</i> [333]	<i>K</i> [336]
Asp, Asn	0,97	0,89	1,11
Thr	1,81	0,89	1,11
Ser	1,13	1,00	1,11
Glu, Gln	0,87	1,11	2,22
Pro	2,64	1,33	1,22
Gly	1,00	1,00	1,00
Ala	1,95	1,00	1,33
Val	15,05	0,89	1,22
Ile	20,40	0,44	1,11
Leu	19,10	0,44	0,89
Tyr	3,06	0,67	0,78
Phe	3,54	0,56	1,22
Lys	1,42	1,00	1,33

Метод используется для решения задач, связанных с выявлением областей контакта между элементами вторичной структуры в третичной структуре, определением взаимного расположения субъединиц в белках, обладающих четвертичной структурой, обнаружением участков связывания с белками низкомолекулярных лигандов и присоединения субстратов к ферментам, изучением влияния внутримолекулярных движений и конформационных переходов на доступную поверхность [327, 331]. Объектами исследования могут быть как белки и пептиды, так и супрамолекулярные структуры: рибосомы [298, 307, 337] и вирусы, например, вирус табачной мозаики [338, 339], Х-вирус картофеля [340], А-вирус картофеля [341], вирусы гриппа типа А [342] и М1 [343].

При исследовании поведения лизоцима на границе водный раствор/воздух с применением метода тритиевой планиграфии было показано, что включение

третичной метки происходит преимущественно в ту часть белка, в которой расположено «входное отверстие» активного центра фермента, и в аминокислоты, расположенные на противоположной стороне глобулы, что указывает на то, что молекулы лизоцима принимают две возможные ориентации на границе раздела фаз [344]. Удельная радиоактивность меченного тритием лизоцима возрастает с увеличением концентрации белка и выходит на постоянное значение при концентрации около $2,4 \times 10^{-5}$ М, что указывает на формирование на границе раздела фаз насыщенного адсорбционного слоя, непроницаемого для атомов трития [345]. Соотношение удельных радиоактивностей остатков фенилаланина и пролина Phe/Pro показало, что лизоцим в насыщенном слое принимает ориентацию, ориентированную остатками фенилаланина в воздушную фазу [345]. На основании полученных данных высказано предположение, что увеличение концентрации приводит к реорганизации молекул белка и формированию насыщенного адсорбционного слоя, в котором молекулы белка ориентированы перпендикулярно границе раздела фаз [345].

В присутствии катионных и анионных ПАВ (ДТАБ и ДСН) происходит уменьшение удельной радиоактивности лизоцима (трёхкратное в случае ДТАБ, двухкратное в случае ДСН), при этом увеличение концентрации ПАВ не влияет на удельную радиоактивность лизоцима, что указывает на вытеснение белка с границы раздела и формирование смешанного адсорбционного слоя. Добавление ДТАБ приводит к уменьшению удельной радиоактивности всех аминокислотных остатков, в первую очередь отрицательно заряженных аминокислот и таких аминокислот как аланин, лейцин, изолейцин, фенилаланин и валин, что указывает на формирование комплекса белка с ДТАБ с участием электростатических и гидрофобных взаимодействий. В присутствии обоих ПАВ соотношение Phe/Pro принимает другие значения, что указывает на изменение пространственной ориентации молекулы белка в составе комплекса с ПАВ: молекула принимает продольную ориентацию вдоль границы раздела. В присутствии ДСН все остатки фенилаланина ориентированы в сторону границы раздела фаз, т.е. происходит изменение конформации белка, в присутствии ДТАБ этот эффект не наблюдается. Полученные результаты подтверждают предположение [346], согласно которому ПАВ, имеющие противоположный глобуле белка заряд, оказывают большее влияние на

конформацию белка чем ПАВ, имеющие одинаковый с белком заряд. Удельная радиоактивность некоторых гидрофобных аминокислот при увеличении концентрации ДСН увеличивается, т.е. происходит увеличение их доступности атомам трития, предположительно, за счёт проникновения ДСН во внутреннюю полость фермента и частичное разворачивание белка. Таким образом, с помощью метода тритиевой планиграфии было показано образование комплексов лизоцима с ионогенными ПАВ за счёт гидрофобных и электростатических взаимодействий и изменение конформации белка [345].

1.2.5. Метод сцинтилляционной фазы

Для регистрации β -излучения меченных тритием соединений используют метод, основанный на измерении количества и яркости световых вспышек, возбуждаемых излучением трития в жидком органическом сцинтилляторе – метод жидкостного сцинтилляционного счёта (ЖСС). Люминесценция некоторых органических соединений под действием ионизирующего излучения (сцинтилляция) была открыта Лизелоттой Херфурт в 1948–1949-ые гг. [347]. Был показан высокий выход фотонов при регистрации β -излучения по сравнению с неорганическим сцинтиллятором, и было высказано предположение, что сцинтилляционные свойства органических соединений обусловлены их ароматической природой. В последствии ЖСС практически полностью вытеснил гейгеровские и пропорциональные счётчики из измерения низкоэнергетических β -излучателей.

При использовании ЖСС меченое соединение вводится непосредственно в жидкий сцинтиллятор путём растворения, эмульгирования или просто погружения фильтров или отрезков хроматограмм в органическую жидкость. Большая часть энергии β -излучения поглощается молекулами органического растворителя. Молекулы растворителя передают энергию возбуждения на молекулы сцинтиллятора. При переходе из возбуждённого состояния в основное молекулы сцинтиллятора испускают фотоны видимого света. Световые фотоны регистрируются с помощью фотоэлектронного умножителя [348].

В качестве растворителей используют толуол, *n*-ксилол, октан, гексан, циклогексан, декан, октанол, бензол. Соединения, молекулы которых содержат делокализованные π -электроны обладают сцинтиллирующими свойствами. Электронодонорные заместители (в т.ч. алкильные группы) увеличивают

электронную плотность и вероятность возбуждения молекулы. Поэтому эффективность регистрации растёт в ряду от бензола до триметилбензола. Для улучшения регистрационных характеристик добавляют соединения, в составе которых есть сопряжённые ароматические и гетероциклические ядра такие как *n*-терфенил, 2,5-дифенилоксазол, 2-фенил-5-(4-бифенилил)-1,3,4-оксадиазол, 2,5-дифенил-1,3,4-оксадиазол (PPD), 1,4-бис-2-(5-фенилоксазолил)бензол и др.. Для придания сцинтилляционных свойств несцинтиллирующим растворителям (октан, гексан, циклогексан) добавляют нафталин [348].

Метод ЖСС используется для прямого наблюдения за поведением меченых соединений на границе взаимодействующих фаз, одна из которых является органическим сцинтиллятором. В этом случае регистрируется β -излучение меченых соединений, которые находятся как в объёме органической фазы, так и в приповерхностном слое водного раствора. Пробег β -частиц трития в воде составляет около 2 мкм, величина пробега определяет объём приповерхностного слоя водного раствора, в котором может быть зарегистрировано меченое вещество [349, 350].

Определение меченого вещества на границе раздела фаз и в объёме органической фазы с помощью ЖСС лежит в основе метода сцинтиллирующей фазы (СФ) [350]. Метод используется также при исследовании адсорбции на границе раздела фаз соединений, меченных серой-35 [204] и углеродом-14 [207, 208, 209].

Регистрация β -излучения проводится в жидкостно-сцинтилляционных счётчиках, которые проводят измерение скорости счёта, т.е. количества сцинтилляций за единицу времени. Скорость счёта I складывается из «поверхностной» составляющей, т.е. скорости счёта β -излучения, испускаемого в сцинтилляционную фазу с границы раздела фаз (I_s), и «объёмной» составляющей, т.е. скорости счёта излучения, испускаемого растворённым в сцинтилляционном растворе меченым соединением (I_v) [351]. На основе полученных данных проводят вычисление величины адсорбции на межфазной границе жидкость/жидкость и коэффициента распределения. При изучении адсорбции меченого тритием БСА на границе вода/толуол и вода/бензол методом СФ [352] были получены величины адсорбции, близкие к данным, полученным другими методами, а также к данным по адсорбции ^{14}C -БСА на границе вода/толуол [209], что показывает точность метода при определении величин адсорбции.

Время установления равновесия в двухфазной системе зависит от молекулярной массы меченого соединения и составляет от пяти часов (третиевая вода H_2O) до шести дней (гуминовые соединения) [299]. Равновесное распределение меченого белка в двухфазных системах вода/октан, вода/октанол и вода/*n*-ксилол достигается за сутки [349]. Изучение кинетики сорбции ДТАБ и додецилсульфата натрия (ДСН) на границах вода/*n*-ксилол и вода/октан показало, что насыщение приповерхностного слоя молекулами ПАВ происходит за 2 часа [353].

Установление равновесия связано с концентрированием вещества на межфазной границе с образованием адсорбционных слоёв и перераспределением вещества между двумя взаимодействующими фазами. На примере ЦТАБ показано, что для ПАВ поверхностная составляющая скорости счёта достигала максимального значения за 30 – 40 минут. Дальнейшее увеличение скорости счёта связано с переходом меченого вещества через межфазную границу. В случае ЦТАБ уравнивание системы происходило через 24 часа. Константа скорости адсорбции для ЦТАБ на два порядка выше соответствующей величины для гуминовых кислот, что указывает на то, что скорость достижения равновесия определяется перемещением молекул через границу раздела фаз, которое зависит от проницаемости образующегося на границе раздела адсорбционного слоя [354].

Метод СФ был использован при исследовании влияния хлоридов щелочных металлов (лития, натрия, калия, цезия) на распределение БСА в системе вода/толуол в широком диапазоне концентраций белка [355, 356, 357]. Было показано, что в диапазоне 0,1 – 0,3 М с увеличением концентрации солей происходит относительное увеличение концентрации белка на межфазной границе и уменьшение его содержания в органической фазе. При больших значениях концентрации присутствие соли уже не влияет на концентрацию белка на межфазной границе и в органической фазе. Зависимость процесса накопления белка от природы катиона наиболее выражена при низких концентрациях БСА. При более высоких концентрациях влияние хлоридов щелочных металлов одинаково. Присутствие солей значительно уменьшает скорость формирования насыщенного адсорбционного слоя.

Метод СФ может быть использован при исследовании смесей. Третьея метка содержится в одном из компонентов смеси, второй компонент смеси метку не

содержит, что позволяет следить за адсорбцией меченого соединения в присутствии второго компонента. С помощью метода СФ было показано, что при добавлении ионных ПАВ – ДТАБ и ДСН – к раствору лизоцима происходит вытеснение белка с границы двухфазной системы водный раствор/*n*-ксилол в органическую фазу, когда молярное отношение ПАВ к белку составляет от 0,1 до 0,5. Расчёт параметров взаимодействия показывает, что в системе происходит формирование гидрофобных комплексов белок—ПАВ с неполным погашением заряда, что приводит к электростатическому отталкиванию между комплексами и молекулами ДТАБ и притяжению между комплексами и молекулами ДСН [358].

Такой же подход был использован при изучении смесей состава ЧСА—ДТАБ и ЧСА—ДСН в системе вода/*n*-ксилол. Было показано, что связывание ДТАБ с отрицательно заряженным белком препятствует переходу молекул ПАВ из водной фазы в органическую. Кроме того, было показано, что в системе одноимённо заряженных белка и ПАВ не происходит конкурентного замещения веществ в адсорбционном слое и в органической фазе [359].

Исследование поведения смесей лизоцим—ДТАБ и лизоцим—ДСН в системе водный раствор/октан в сочетании с измерением поверхностного натяжения по методу висячей капли показало, что в области малых концентраций ПАВ (10^{-7} – 10^{-6} М) образуется гидрофобный комплекс, в котором на одну молекулу белка приходится 8 – 10 молекул ПАВ. Комплекс обладает более высокой растворимостью в октане и адсорбцией на границе вода/октан по сравнению с белком. Комплексы лизоцим—ДТАБ и лизоцим—ДСН обладают одинаковой поверхностной активностью, несмотря на разный механизм образования. При более высоких концентрациях ПАВ происходит вытеснение комплексов с границы раздела. При соотношении ПАВ к лизоциму свыше 10÷100:1 адсорбция белка уменьшается за счёт конкурентной адсорбции с ПАВ и за счёт формирования в водной фазе гидрофильного комплекса [360].

При изучении взаимодействия лизоцима и цвиттер-ионного ПАВ – кокоамидопропил бетаина (КАПБ) – было показано отсутствие какого-либо взаимного влияния белка и ПАВ на адсорбцию компонентов смеси [361]. Смешанные адсорбционные слои лизоцим—ПАВ на границе вода/октан обогащены молекулами ПАВ; концентрация ПАВ возрастает в ряду ДТАБ < ДСН < КАПБ.

На примере цитируемых работ видно, что введение тритиевой метки в органические соединения с последующим измерением β -излучения трития с помощью метода ЖСС является удобным и эффективным инструментом, позволяющим непосредственно следить за распределением и адсорбцией веществ в системе двух несмешивающихся жидкостей.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. МАТЕРИАЛЫ

В работе использовали лизоцим куриного яйца (MP Biomedicals, США), плуроники P123, L121 («Aldrich», США) и F127 («BASF», Германия) и полиоксиэтиленлауриновый эфир Бридж-35 («Fluka», Швейцария). Таким образом были использованы плуроники, имеющие одинаковые по длине гидрофильные цепи ПЭО и разные по длине гидрофобные цепи ППО, что отражается в значениях ГЛБ, которые имели различные значения в широком диапазоне от 1 до 22. Действие плуроников сравнивали с Бридж-35, имеющим одинаковую с P123 длину гидрофильной цепи ПЭО, но отличающийся по строению и молекулярной массе гидрофобный фрагмент. Физико-химические характеристики плуроников и Бридж-35, приведённые в научной литературе, представлены в таблице 4.

Таблица 4. Физико-химические характеристики плуроников и Бридж-35.

НПАВ	Формула	М, Да	ККМ, мкМ	ГЛБ*
Бридж-35	$C_{12}H_{25}EO_{24}$	1221	8 (при 37 °C) [362] 30 (при 22 °C) [363] 40 (при 37 °C) [364] 60 (при 25 °C) [365] 68 (при 22 °C) [363] 74 (при 25 °C) [366]	16
L121	$EO_5PO_{68}EO_5$	4400	1 (при 37 °C) [28] 10 (при 37 °C) [55]	1 – 7
P123	$EO_{20}PO_{70}EO_{20}$	5700	0,5 (при 37 °C) [364] 2,6 (при 25 °C) [367] 4,4 (при 37 °C) [28] 5,2 (при 25 °C) [367] 56 (при 25 °C) [368]	7 – 9
F127	$EO_{100}PO_{65}EO_{100}$	12600	0,08 (при 25 °C) [42] 610 (при 37 °C) [364] 800 (при 25 °C) [53]	22
*Приведены значения ГЛБ по данным фирм-производителей.				

При приготовлении буферных растворов использовали 0,9% раствор хлорида натрия («Мосфарм», Россия), гидрофосфаты натрия и калия («Sigma», США), а

также азид натрия в качестве консерванта («Ленреактив», Россия). Все растворы лизоцима, плуроников и Бридж-35 готовили в фосфатных буферах (pH 7,3±0,1): (1) 8 мМ Na₂HPO₄, 2 мМ K₂HPO₄, 0,146 М NaCl, 8 мМ NaN₃ (фосфатно-солевой буфер, PBS); (2) 8 мМ Na₂HPO₄, 2 мМ K₂HPO₄, 8 мМ NaN₃; (3) 29 мМ Na₂HPO₄, 21 мМ NaH₂PO₄, 5 мМ NaN₃ (натрий-фосфатный буфер). Для получения спектров кругового дихроизма в присутствии НПАВ использовали буфер без хлорида натрия, чтобы избежать сильного поглощения УФ-излучения при низких длинах волн хлорид-ионами [369].

Выбор PBS обусловлен тем, что это один из основных буферов, используемых при проведении биологических исследований, осмолярность и концентрации ионов в буфере соответствуют концентрациям в биологической клетке, мембраны которой моделирует система водный раствор/органическая жидкость.

При очистке меченных тритием плуроников и Бридж-35 использовали этанол, метанол, хлороформ, диоксан. При анализе распределения трития в белке использовали смесь соляной и трифторуксусной кислот 2:1 (v/v), содержащую 0,001% β-меркаптоэтанола. В качестве органической фазы при исследовании адсорбционного слоя на границе раздела фаз водный раствор/органическая жидкость использовали *n*-ксилол, содержащий 8 г/л 2,5-дифенилоксазола.

При изучении бактериолитической активности лизоцима в присутствии плуроников и Бридж-35 в качестве субстрата, участвующего в ферментативной реакции, использовали лиофилизированные грамположительные бактериальные клетки *Micrococcus luteus* («Sigma», США). При приготовлении суспензии клеток и растворов лизоцима и плуроников использовали буфер (1) без добавления азид натрия.

2.2. МЕТОДЫ

2.2.1. Определение молекулярно-массового распределения плуроников

Значения молекулярно-массового распределения плуроников были определены с помощью гелепроникающей хроматографии (ГПХ). Измерения проводили при 35°C на жидкостном хроматографе «Waters» (США) с рефрактометрическим детектором и колонками, заполненными ультрастирогелем с размером пор от 103 до 105 Å, и линейной колонкой. В качестве подвижной фазы использовали тетрагидрофуран. Анализ был проведен на кафедре высокомолекулярных соединений Химического факультета МГУ старшим научным сотрудником Гариной Е. С. Хроматограммы обрабатывали на интеграторе «Data Module-730» с использованием калибровки по стандартным препаратам полиэтиленгликоля.

2.2.2. Радионуклидные методы для исследования системы белок – НПАВ

Исследование системы белок – НПАВ с использованием радионуклидных методов включает: обработку атомарным тритием исследуемого вещества (метод термической активации) с последующим выделением и очисткой; использование полученных меченых соединений в двух независимых друг от друга исследованиях; первое состоит в анализе распределения трития в исследуемом объекте; второе заключается в использовании полученных меченых соединений для определения их взаимного влияния при конкурентной адсорбции на границе раздела фаз (метод жидкостно-сцинтилляционного счёта (ЖСС) в варианте сцинтиллирующей фазы). В работе использовали смесь газообразного трития и протия (ПО «Маяк», Россия). Реакцию с атомарным тритием проводили на специальной установке.

2.2.1.1. Введение трития в лизоцим и НПАВ

Введение тритиевой метки проводили по описанной в литературе методике [300]. Введение радиоактивной метки методом термической активации трития включало: подготовку образца (мишени), проведение реакции, сбор продукта, очистку и анализ продукта. Водный раствор, содержащий 0,3 мг белка или 0,5 мг плуроника Р123, наносили на стенки стеклянного реакционного сосуда, вещество равномерно распределяли по поверхности сосуда, замораживали жидким азотом и затем лиофилизировали. Раствор 0,6 мг Бридж-35 в этиловом спирте наносили на стенки реакционного сосуда и удаляли растворитель током воздуха.

Реакционный сосуд с готовой мишенью подсоединяли к установке для работы с газообразным тритием и вакуумировали до давления 0,01 Па. Затем сосуд наполняли смесью трития и водорода до давления 1,3 Па. Во время реакции стеклянный сосуд охлаждали жидким азотом до 77 К. В середине реакционного сосуда помещалась вольфрамовая проволока. При проведении реакции через проволоку пропускали электрический ток, нагревая до 1800 К. Реакцию проводили в течение 10 с. По завершении реакции оставшийся газ откачивали, реакционный сосуд отсоединяли от установки и оставляли оттаивать при комнатной температуре.

При исследовании адсорбционных слоёв лизоцима и смешанных адсорбционных слоёв лизоцим-НПАВ обработке атомарным тритием подвергали замороженные растворы лизоцима и его смесей с НПАВ. Растворы готовили в PBS и наносили на стенки реакционного сосуда, после чего закрытый сосуд выдерживали в течение 30 мин. Времени выдерживания было достаточно для формирования адсорбционного монослоя, что было подтверждено путём измерения поверхностного натяжения (п. 3.4).

Концентрация лизоцима была постоянной и составляла 0,5 г/л. Концентрации плюроники P123 составляли 0,7 и 7 мкМ, плюроники F127 – 0,3 и 1 мкМ, плюроники L121 – 0,2 и 1 мкМ, Бридж-35 – 5 и 50 мкМ. Концентрации были выбраны на основании результатов экспериментов, полученных с помощью метода сцинтиллирующей фазы (п. 3.3). Реакционный сосуд с замороженным раствором подсоединяли к установке и вакуумировали до давления 0,01 Па. Затем наполняли смесью трития и водорода до давления 0,5 Па. После проведения реакции с атомарным тритием проводили очистку меченых соединений от лабильного трития и радиоактивных побочных продуктов.

2.2.1.2. Очистка и выделение меченых соединений

Очистку меченого лизоцима от лабильного трития, тритиевой воды и низкомолекулярных продуктов проводили методом равновесного диализа против PBS в течение семи дней с использованием полупроницаемых мембран, поры которых не пропускают молекулы с массой более 12000 Да. Последующую очистку лизоцима проводили с использованием эксклюзионной хроматографии (размер колонки – 85×14, неподвижная фаза – фрактогель TSKHW-40, подвижная фаза – PBS, объёмная скорость – 0,2 мл/мин). Очистку меченных тритием плюроники P123

и Бридж-35 проводили методом тонкослойной хроматографии с использованием пластин с неподвижной фазой силикагеля Sigma-Aldrich. В качестве подвижной фазы использовали смеси хлороформ-метанол 13:1 (v/v) для плюроники P123 и диоксан-вода 1:1 (v/v) для Бридж-35.

2.2.1.3. Анализ распределения трития в аминокислотных остатках

После выделения лизоцима с помощью гельпроникающей хроматографии (ГПХ) фракции белка объединяли, после чего проводили диализ против воды с использованием мембран с размером пор 12000 cut-off для удаления солей. После этого раствор упаривали досуха на роторном испарителе, и затем проводили тотальный гидролиз с применением смеси соляной и трифторуксусной кислот 2:1 (v/v), содержащей 0,001% β -меркаптоэтанола. Тотальный гидролиз проводили в запаянных стеклянных ампулах при температуре 155 °C в течение 1 часа. После этого ампулу вскрывали, смесь лиофилизовали, растворяли сухой остаток в воде, после чего упаривали с помощью роторного испарителя. Процедуру растворения/упаривания повторяли до исчезновения запаха β -меркаптоэтанола. Затем осадок растворяли в 0,1 М растворе соляной кислоты. Анализ аминокислот проводили на аминокислотном анализаторе Hitachi L-8800 (Hitachi, Япония) по описанной в литературе методике с контролем количества вещества с помощью нингидриновой реакции и радиоактивности с помощью проточного жидкостного-сцинтилляционного счётчика [370].

2.2.1.4. Определение коэффициента распределения меченых веществ и адсорбции на межфазной границе водный раствор/n-ксилол методом сцинтиллирующей фазы

Исследование взаимного влияния лизоцима и НПАВ при конкурентной адсорбции на границе раздела фаз проводили методом сцинтиллирующей фазы, основанном на использовании меченых соединений и регистрации β -излучения в объёме органического сцинтиллятора и около межфазной поверхности. Тритиевая метка содержалась либо в НПАВ, либо в лизоциме, при этом второй компонент смеси радиоактивную метку не содержал. Раствор меченого вещества смешивали с немеченым веществом, а также со вторым компонентом смеси. Удельная радиоактивность белка составляла 0,1 МБк/мл, удельная радиоактивность НПАВ составляла 37 кБк/мл. Концентрация лизоцима была постоянной и составляла 0,1 или 0,5 мг/мл, концентрацию НПАВ варьировали в диапазоне от 0,015 до 7 мкМ в

случае плуроника P123 и от 0,15 до 50 мкМ в случае Бридж-35. Концентрация плуроника L121 составляла 0,2 и 1 мкМ, концентрация плуроника F127 – 0,3 и 1 мкМ. В экспериментах с плурониками L121 и F127 тритиевая метка содержалась только в лизоциме.

Эксперимент проводили в сцинтилляционных полиэтиленовых флаконах объёмом 7 мл. В сцинтилляционный флакон вносили 1 мл водного раствора, содержащего меченое вещество и второй компонент, и затем аккуратно добавляли 3 мл органического сцинтиллятора (*n*-ксилол, содержащий 8 г/л 2,5-дифенилоксазола). Двухфазную систему выдерживали в течение 48 часов при температуре 25 °С для достижения взаимного насыщения фаз и равновесного распределения веществ между фазами и межфазным адсорбционным слоем, поскольку такое время требуется для равновесного распределения лизоцима в системе вода/*n*-ксилол согласно данным литературы [349].

Затем проводили измерение суммарной скорости счёта радиоактивных распадов трития в двухфазной системе (I , имп/мин), которая складывается из двух составляющих: объёмной (I_V) и поверхностной (I_s). Измерения проводили на жидкостном сцинтилляционном спектрометре Rack Beta 1215 (LKB Wallac, Финляндия). Для определения концентрации меченого компонента в объёме сцинтиллирующей фазы (V_{org}) и адсорбции на межфазной поверхности, отбирали 1 мл органической фазы (V_{al}) и после этого измеряли скорость счёта (I_{al}). Для определения концентрации меченого вещества в органической фазе (c_{org}) использовали формулу 1.

$$c_{org} = \frac{I_{al}/V_{al}}{\varepsilon a_{sp}} = \frac{I_V}{\varepsilon a_{sp} V_{org}} \quad (1)$$

где a_{sp} – удельная (массовая или молярная) радиоактивность меченого тритием соединения, ε – эффективность регистрации трития, которую определяли экспериментально из регистрируемого спектра для каждого измеряемого флакона. Кривая гашения β -излучения трития в сцинтилляционной жидкости приведена на рисунке 1.

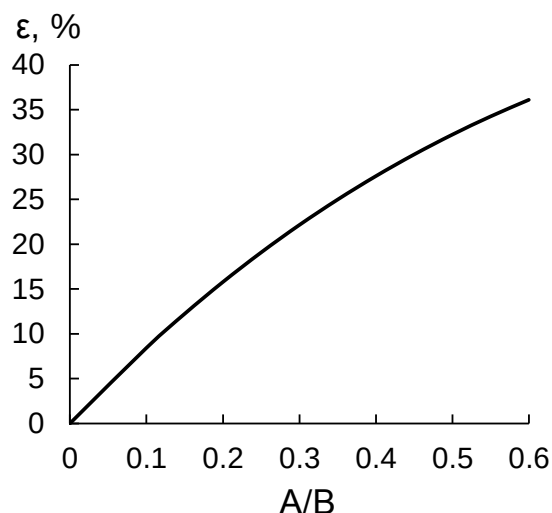


Рис. 1. Зависимость эффективности регистрации (ϵ) от отношения счета в усечённом (А) и полном (В) энергетических каналах жидкостного сцинтилляционного спектрометра RackBeta 1215.

Концентрацию меченого вещества в водной фазе (c_w) рассчитывали по разности между содержанием в исходном водном растворе и содержанием в органической фазе. Полученные значения использовали при вычислении коэффициентов распределения веществ в системе вода/ n -ксилол по уравнению:

$$D = \frac{c_{org}}{c_w} \quad (2)$$

Расчёт адсорбции меченого компонента смеси на межфазной границе водный раствор/ n -ксилол проводили согласно уравнению:

$$\Gamma = \frac{I - I_{al} \frac{V_{org}}{V_{al}}}{\frac{1}{2} \epsilon a_{sp} S} = \frac{I_{res} - I_{al} \frac{V_{org} - V_{al}}{V_{al}}}{\frac{1}{2} \epsilon a_{sp} S} = \frac{I_s}{\frac{1}{2} \epsilon a_{sp} S} \quad (3)$$

где I_{res} – скорость счёта двухфазной системы после отбора аликвоты органической фазы, S – площадь межфазной границы.

2.2.3. Определение поверхностного натяжения на границе раздела

жидкость/жидкость и жидкость/воздух с помощью метода висящей капли

Для измерения межфазного натяжения водных растворов индивидуальных веществ и смесей лизоцима с плурониками и Бридж-35 на границе водный раствор/воздух использовали метод висящей капли с применением исследовательской системы «Contact Angles System OCA25» (Dataphysics,

Германия) или горизонтального микроскопа, оборудованного цифровой видеокамерой DCM-130, рассчитывающего поверхностное натяжение с помощью программного пакета Drop Shape Analysis (Kruss) по профилю капли. Система «Contact Angele Syatem OCA25» была использована при определении ККМ плуроников и Бридж-35 и при изучении кинетики изменения поверхностного натяжения на границе PBS/воздух растворов, содержащих лизоцим и плуроники F127, P123, L121. Микроскоп с камерой DCM-130 был использован при изучении влияния ионной силы и НПАВ (плуроника P123 и Бридж-35) на поведение белка на межфазной границе.

Установление равновесной адсорбции белка и НПАВ на границе раздела фаз требует времени, обусловленного диффузией веществ к межфазной поверхности и переориентацией молекул в поверхностном слое. Метод висящей капли позволяет проводить наблюдение за межфазной поверхностью в течение длительного времени и измерять поверхностное натяжение в равновесных условиях.

Метод основан на измерении формы капли исследуемой жидкости при её помещении в среду с плотностью, отличной от плотности исследуемого раствора. Под действием гравитационных и капиллярных сил происходит деформация капли до тех пор, пока капиллярное давление не уравнивает гидростатическое. В этом случае форма капли может быть описана уравнением:

$$\Delta\rho gz = \sigma\left(\frac{1}{r_1z} + \frac{1}{r_2z}\right) \quad (4)$$

где $\Delta\rho$ – это разность плотностей жидкости в капле и в окружающей среде (плотность водного раствора принимали за 1,000 г/см³, плотность воздуха – 0,0012 г/см³), $r_1(z)$ и $r_2(z)$ – главные радиусы кривизны на уровне z . Плотность измеряли с помощью «Density/Specific Gravity Meter DA-640». Полученные значения плотности PBS и индивидуальных растворов плуроника P123 и Бридж-35 составляли 1,0059±0,0001 г/см³, плотности растворов лизоцима и смесей лизоцима—НПАВ составляли 1,0061±0,0001 г/см³.

При измерении межфазного натяжения на границе раздела фаз водный раствор/воздух отбирали 1 мл жидкости, а затем в течение 30 минут формировали каплю исследуемого раствора в стеклянной кювете, на дно которой был помещён исследуемый раствор с целью уменьшения испарения капли.

Перед проведением измерений межфазного натяжения на границе раздела фаз водный раствор/*n*-ксилол во флакон помещали 1 мл водного раствора индивидуального вещества или смеси и 3 мл *n*-ксилола. Двухфазную систему оставляли на 48 часов при температуре 25 °С. С помощью дозатора точно отбирали 1 мл водного раствора, в течение 30 – 60 минут формировали каплю водного раствора в среде *n*-ксилола. Межфазное натяжение рассчитывали с помощью метода численного интегрирования уравнения Юнга-Лапласа и приближением теоретически рассчитанного профиля капли к полученному экспериментально.

2.2.4. Исследования комплексов лизоцим-НПАВ методами молекулярной спектроскопии

Для исследования структуры белков используются преимущественно различные методы молекулярной спектроскопии [371]. Для изучения влияния НПАВ на структуру лизоцима были использованы следующие методы: спектрофотометрия, спектрофлуориметрия, спектроскопия кругового дихроизма, малоугловое рентгеновское рассеяние.

2.2.3.1. Спектрофотометрия

Концентрация лизоцима составляла 0,1 г/л (7 мкМ), концентрация плуроников варьировалась от 0 до 2,4 мкМ для плуроников L121 и F127 и от 0 до 7,4 мкМ для плуроника P123, концентрация Бридж-35 варьировалась от 0 до 50 мкМ. Для измерения спектров поглощения лизоцима в присутствии НПАВ использовали однолучевой спектрофотометр Hitachi U-5100 (Hitachi, Япония). Все измерения проводили в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см при температуре 25 °С. В качестве раствора сравнения использовали PBS. Спектры поглощения снимали в диапазоне длин волн 240 – 340 нм.

2.2.3.2. Флуоресцентный анализ

Использовались такие же концентрации, как и при исследовании методом спектрофотометрии (п. 2.2.3.1). Измерения интенсивности флуоресценции проводили на спектрофлуориметре FluoroMax-3 (Horiba Jobin Yvon, Франция) в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см. Измерения проводили на длине волны возбуждающего света 280 нм. Спектры эмиссии флуоресценции снимали в диапазоне длин волн 300 – 450 нм. Время измерения одной точки составляло 0,5 с.

При сопоставлении спектров флуоресценции исходного лизоцима и лизоцима в присутствии НПАВ были получены величины относительной флуоресценции (за 100% принимали интенсивность флуоресценции для лизоцима без НПАВ). Данные были использованы при расчёте константы ассоциации комплекса лизоцим-плюроник по описанным в литературе уравнениям [393].

2.2.3.3. Спектроскопия кругового дихроизма

Концентрация лизоцима составляла 0,5 г/л (35 мкМ), концентрация плюроников варьировалась от 0 до 0,7 мкМ. Для измерения спектров кругового дихроизма лизоцима в присутствии НПАВ использовал КД-спектрометр CHIRASCAN (Applied Photophysics Ltd., Великобритания). Измерения проводили в кварцевых кюветах при температуре 25 °С. Спектры поглощения снимали в диапазоне длин волн 200 – 260 нм.

2.2.3.4. Метод малоуглового рентгеновского рассеяния

Концентрация лизоцима составляла 0,35 мМ, концентрация плюроников составляла 1 мкМ. Спектры малоуглового рентгеновского рассеяния были сняты в EMBL (Гамбург, Германия) с помощью оборудования PETRA III (DESY, Германия) и проанализированы к.ф.-м.н., н.с. Петуховым М.В. по описанным в литературе методикам [372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379].

2.2.5. Измерение ферментативной активности

Определение бактериолитической активности лизоцима в присутствии ПАВ по отношению к субстрату, грамположительным бактериальным клеткам *Micrococcus lysodeikticus* (*luteus*), проводили с использованием турбидиметрического метода [380, 381]. Скорость dA/dt , с которой происходит уменьшение оптической плотности суспензии клеток в первое время после добавления фермента, пропорциональна уменьшению количества клеток в реакционной смеси, и является характеристикой активности фермента.

Концентрация лизоцима была постоянной – 0,5 г/л (35 мкМ). Концентрация НПАВ в смешанных растворах варьировалась от 0,001 мкМ до 1 мкМ для плюроников L121 и F127, от 0,001 мкМ до 10 мкМ для Бридж-35 и от 0,001 мкМ до 10 мкМ плюроника P123. Навеску лиофилизированных клеток *M. luteus* (Sigma, США)

массой $4,9 \pm 0,2$ мг растворяли в 1 мл PBS. Суспензию клеток использовали в течение двух часов после её приготовления.

В кювету вносили 950 мкл буфера и 30 мкл суспензии клеток. Концентрацию суспензии подбирали таким образом, чтобы оптическая плотность полученной суспензии была примерно равна 0,5 на длине волны 650 нм ($5,5 \pm 0,5$ мг сухого препарата клеток на 1 мл буфера). Для определения оптической плотности исследуемых растворов использовали двухлучевой спектрофотометр UV-1601PC (Shimadzu, Япония). Измерения проводили в термостатируемых кюветах с длиной оптического пути 1 см и объёмом 1 мл.

В начале кювету с суспензией термостатировали при 37°C в течение 5 мин для определения фонового осаждения клеток в отсутствие лизоцима. Затем к суспензии клеток в кювете добавляли 20 мкл раствора смеси лизоцим – НПAB, смесь тщательно перемешивали, после чего проводили измерение изменения оптической плотности. Каждый эксперимент повторяли 3 раза. Каждое измерение повторяли 3-5 раз.

Для определения каталитических свойств лизоцима в присутствии плюроника P123 проводили измерение зависимости скорости лизиса клеток от концентрации субстрата ($0,05 - 0,21$ мг/мл) при постоянной концентрации лизоцима $0,5$ мг/мл, концентрацию плюроника варьировали от $0,1$ мМ до 10 мМ. Полученные значения были проанализированы с помощью уравнения Михаэлиса-Ментен для расчёта значений K_M и $V_{\text{макс}}$:

$$v = \frac{V_{\text{макс}}[S]}{K_M + [S]} \quad (5)$$

$$V_{\text{макс}} = k_{\text{cat}}[E] \quad (6)$$

где v – скорость начальной стадии лизиса, V_M – максимальная скорость реакции, $[S]$ – это концентрация субстрата, $[E]$ – концентрация фермента, k_{cat} – каталитическая константа, K_M – константа Михаэлиса-Ментен. Для обработки полученных результатов и вычисления кинетических параметров было использовано программное обеспечение OriginPro.

Для определения вклада адсорбции P123 на субстрате в уменьшение скорости лизиса клеток проводили отдельную серию экспериментов по исследованию адсорбции меченого тритием плюроника P123 на клетках *M. luteus*. К навеске

клеток добавляли [³H]P123 и немеченый плюроник («носитель»). Общая концентрация плюроника составляла от 0,1 до 5 мкМ, концентрация клеток была постоянной и составляла 0,15 г/л. Суспензию инкубировали при 37°C в течение суток, затем центрифугировали. После этого проводили измерение радиоактивности осадка и раствора над осадком в жидком сцинтилляторе «Ultima Gold» (PerkinElmer, США) с помощью жидкостного сцинтилляционного счётчика Rackbeta 1215, и по значениям удельной радиоактивности определяли концентрацию плюроника.

2.2.6. Молекулярный докинг

Для оценки взаимного расположения плюроника и лизоцима были использованы методы молекулярного моделирования с использованием Nex 8.0.0. Для визуализации комплексов была использована программа Chimera 1.3.1.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ПЛЮРОНИКОВ

Анализ с помощью геляпроникающей хроматографии выявил состав исследуемых плюроникиков:

- плюроник F127 содержит основной компонент с молекулярной массой $M_w = 12600$, соответствующей полноразмерному плюронику F127, и примесь с $M_w = 5500$, $M_w/M_n = 1,05$;
- плюроник P123 содержит основной компонент с молекулярной массой $M_w = 5800$, соответствующей полноразмерному плюронику P123, и примесь с $M_w = 1900$, $M_w/M_n = 1,52$;
- плюроник L121 содержит основной компонент с молекулярной массой $M_w = 4400$, соответствующей полноразмерному плюронику L121, и примесь с $M_w = 1400$, $M_w/M_n = 1,61$.

Таким образом, препараты, с которыми проводилась работа, полностью соответствуют заявленным характеристикам.

Поскольку эксперименты проводили в PBS, а физико-химические характеристики плюроникиков, в частности ККМ, известные из литературы (табл. 4), получены для водных растворов при разных температурах, были проведены измерения ККМ плюроникиков в PBS с помощью метода висящей капли. Полученные изотермы поверхностного натяжения плюроникиков приведены на рис. 2.

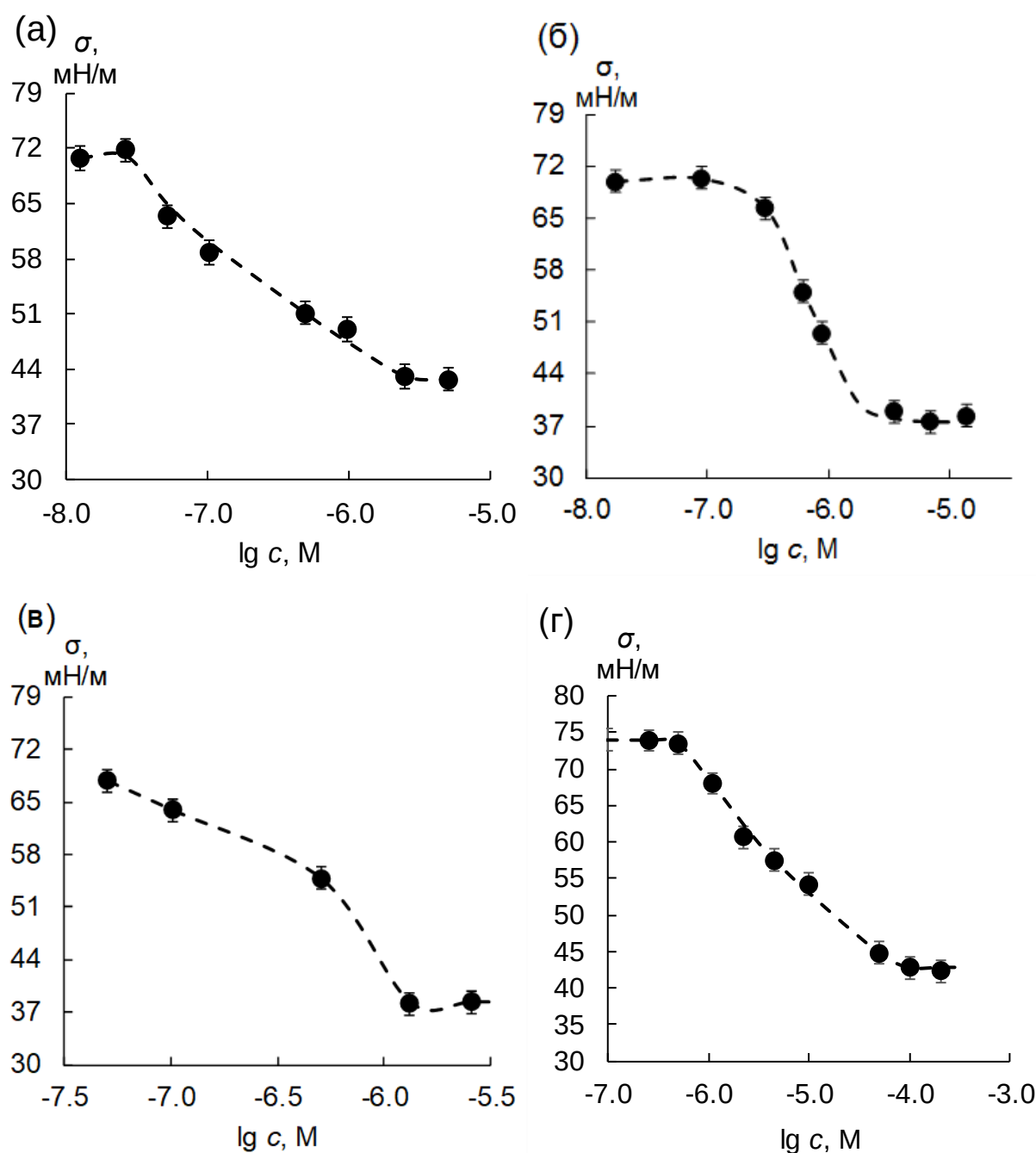


Рис. 2. Изотермы равновесного поверхностного натяжения на границе PBS/воздух для плуроников (а) F127, (б) P123, (в) L121, (г) Бридж-35.

Полученные значения ККМ составили 2,7, 1,8, 1,3 и 70 мкМ для F127, P123, L121 и Бридж-35 соответственно. Показано, что значения ККМ плуроников уменьшаются с уменьшением длины цепей ПЭО, что согласуется с данными литературы [41, 37]. Значения ККМ коррелируют с данными, приведёнными в табл. 4, что свидетельствует о том, что тензиометрия является приемлемым методом для определения ККМ.

3.2. ПОЛУЧЕНИЕ МЕЧЕННЫХ ТРИТИЕМ ЛИЗОЦИМА, P123 И БРИДЖ-35

Для проведения экспериментов по изучению взаимного влияния лизоцима и НПАВ на межфазных границах с помощью метода сцинтиллирующей фазы были получены меченные тритием лизоцим, плуроник P123 и Бридж-35. Данные по анализу меченых препаратов представлены на рис. 3-5. Радиохимический выход меченых соединений (без учёта трития в лабильных положениях) составил 35%, 48%, 17% для лизоцима, плуроника P123 и Бриджа-35 соответственно. Условия анализа и очистки препаратов приведены в п. 2.2.2.

Удельная радиоактивность полученных меченных тритием соединений составила 0,3 ТБк/ммоль для лизоцима, 1 ТБк/ммоль для плуроника P123, 0,14 ТБк/ммоль для Бридж-35. Чистота полученных меченых соединений была подтверждена с помощью хроматографического анализа, представленного на рис. 3 – 5, и составила не менее 95 %.

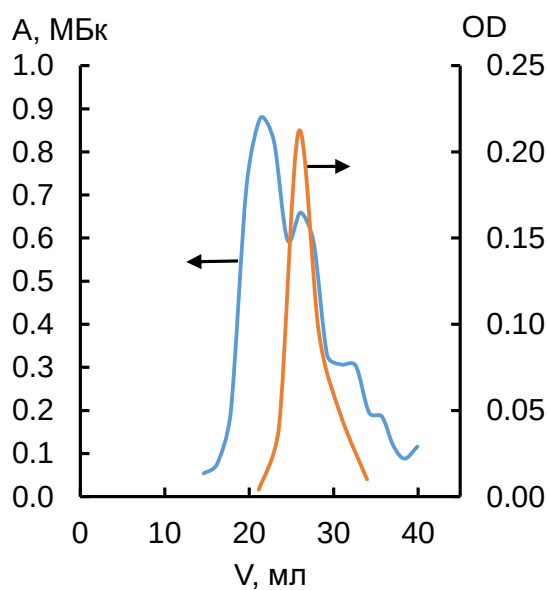


Рис. 3. Анализ меченого тритием лизоцима с помощью ГПХ: профиль радиоактивности и УФ-поглощения.

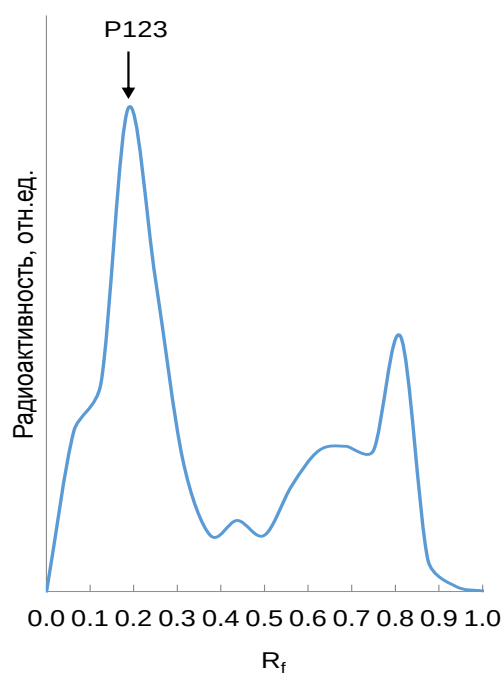


Рис. 4. Профиль радиоактивности меченного тритием плуроника P123 при хроматографическом анализе.

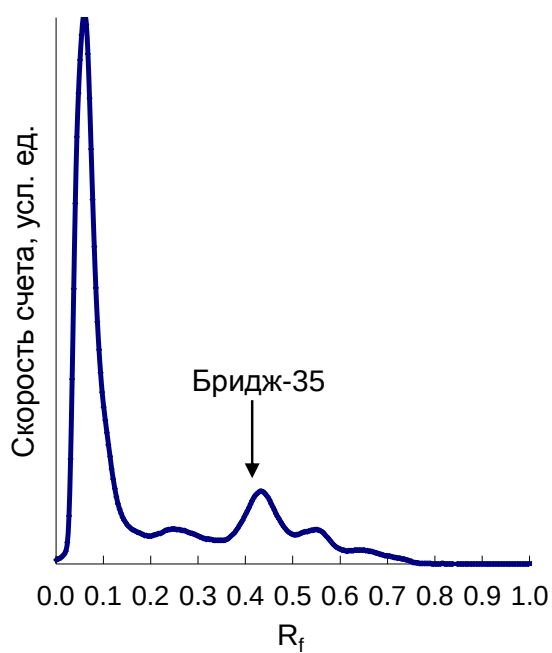


Рис. 5. Профиль радиоактивности меченного тритием Бридж-35 при хроматографическом анализе.

3.3. ВЛИЯНИЕ ИОННОЙ СИЛЫ И ПРИРОДЫ АНИОНОВ НА ПОВЕДЕНИЕ ЛИЗОЦИМА НА МЕЖФАЗНОЙ ГРАНИЦЕ

На адсорбцию белка на межфазных границах может оказывать влияние ионная сила раствора. В данной работе большинство экспериментов было проведено в PBS (рН $7,3 \pm 0,1$, $0,16$ М). Чтобы учесть влияние хлорид-иона, были проведены дополнительные эксперименты по изучению влияния ионной силы и природы аниона на поведение белка в двухфазной системе.

Согласно данным, представленным в литературе, электрофоретическая подвижность лизоцима зависит от концентрации хлорид-ионов [345]. На рис. 6 приведено влияние концентрации хлорида натрия на полученную в предыдущих исследованиях электрокинетическую подвижность лизоцима [345] и полученную в данной работе адсорбцию лизоцима на межфазной границе водный раствор/*n*-ксилол.

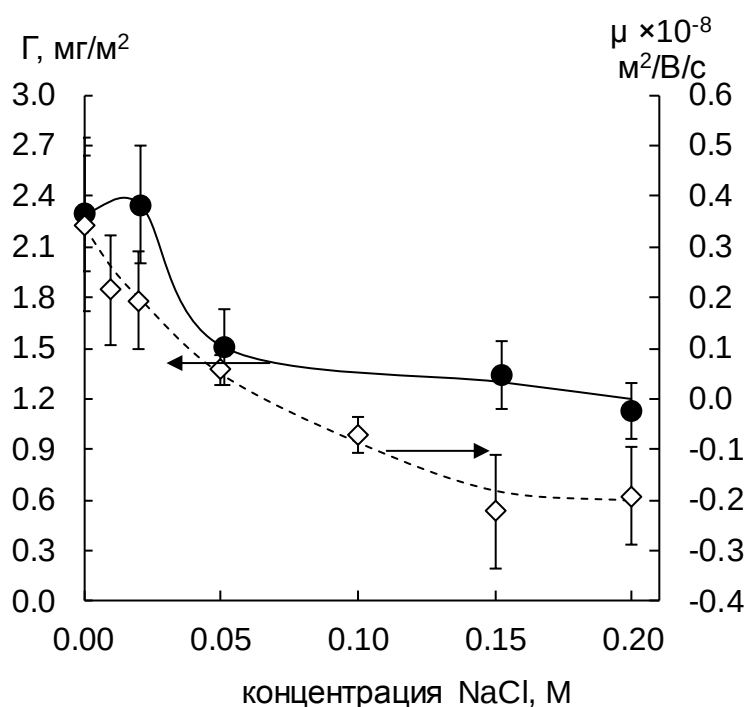


Рис. 6. Зависимость адсорбции 0,1 г/л лизоцима на границе водный раствор/*n*-ксилол от концентрации хлорида натрия (●), полученная в ходе данной работы. Ромбами (◊) показано значение электрокинетической подвижности лизоцима по данным литературы [345].

Показано, что добавление хлорид-ионов к 0,01 М фосфатному буферу практически не влияет на распределение лизоцима в системе, коэффициент

распределения составлял $(5,5 \pm 0,5) \times 10^{-4}$. При этом происходит двукратное уменьшение адсорбции лизоцима – от $2,0 \pm 0,6$ в отсутствии хлорид-ионов до $1,1 \pm 0,2$ мг/м², когда концентрация хлорид-ионов составляет 0,2 М.

Согласно литературным данным увеличение концентрации фосфат-ионов, проявляющих свойства космотропных агентов, способствует уменьшению адсорбции лизоцима. Такие ионы как Cl⁻, Br⁻ и I⁻, напротив, проявляют свойства хаотропных агентов, нарушающих упорядоченную структуру воды. В их присутствии адсорбция лизоцима на границе раздела фаз вода/воздух значительно возрастает, увеличиваясь в ряду Гофмейстера. При концентрации хаотропных ионов, близкой к 1 М, адсорбция лизоцима на границе раздела фаз водный раствор/воздух выше, чем в присутствии космотропных ионов при тех же условиях [382]. Данный эффект объясняется изменением структуры белка (рефолдингом) на границе раздела фаз вода/воздух. При низких концентрациях солей адсорбция более поляризованных молекул усиливается ионно-поверхностными дисперсионными взаимодействиями. Повышенная адсорбция экранирует поверхностный заряд лизоцима обратно Гофмейстера [383].

В нашей работе было проведено сравнение поведения лизоцима в системах PBS/*n*-ксилол, в которых NaCl заменили на NaF и NaBr. Нами было показано, что замена хлорид-иона на бромид- и фторид-ионы приводит к небольшому увеличению коэффициента распределения в системе водный раствор/*n*-ксилол до $(7,7 \pm 0,7) \times 10^{-4}$ и $(8,1 \pm 0,8) \times 10^{-4}$ для NaF и NaBr соответственно. Адсорбция на межфазной границе практически не поменялась, как показано на рис.7.

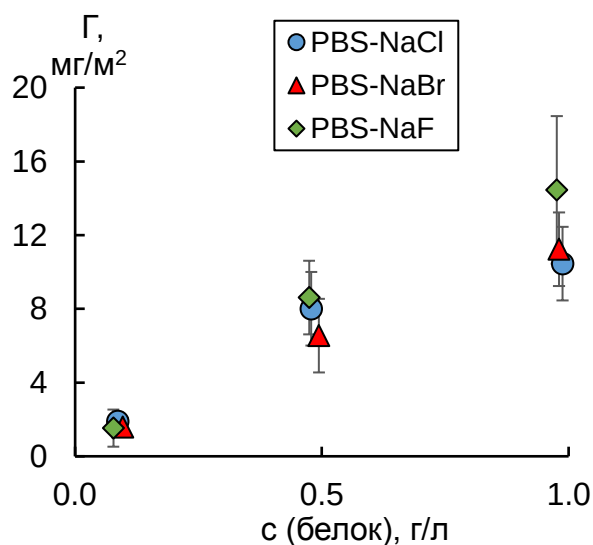


Рис. 7. Зависимость адсорбции лизоцима на границе PBS /п-ксилол от концентрации белка в присутствии различных галогенид-ионов при концентрации 0,15 М: ● - Cl, ▲ – Br, ◆ -F.

На рис. 8 показано, что поверхностное натяжение на границе растворов лизоцима в PBS (0,16 М) и в 0,055 М натрий-фосфатном буфере с воздухом достигает одинаковых значений, но за различное время.

Когда поверхность границы раздела фаз полностью занята молекулами белка, они начинают проникать в межфазный слой, образованный адсорбированными молекулами белка. Чем больше молекул белка адсорбируется на поверхности, тем больший энергетический барьер должны преодолеть молекулы белка для адсорбции на границе раздела фаз. Когда поверхность раздела фаз полностью заполнена, проникновение новых молекул вызывает изменение пространственной ориентации и конформации адсорбированных молекул. Поскольку при адсорбции белка эффекты первого слоя определяют значения поверхностного натяжения, изменения поверхностного натяжения обеспечивают удобный способ контроля проникновения в поверхность и конфигурационных перестроек адсорбированных молекул белка. Изменение поверхностного натяжения обусловлено тремя последовательными или параллельными процессами: диффузией молекул белка к поверхности раздела фаз; проникновением молекул белка через образованный адсорбционный слой к поверхности раздела фаз; изменением

пространственной ориентации и конформации молекул белка. Скорости этих процессов могут быть проанализированы с помощью уравнений вида [382, 384]:

$$\ln\left(1 - \frac{\Delta\sigma_i}{\Delta\sigma_{eq}}\right) = -\frac{t}{\tau} = -kt \quad (7)$$

где $\Delta\sigma_i$ и $\Delta\sigma_{eq}$ соответствуют поверхностному натяжению в момент времени t и в состоянии равновесия, а k ($= 1/\tau$) – константа скорости изменения поверхностного натяжения, τ – время наступления равновесия. Как показано в одной из работ [382], константе диффузии k_d соответствует участок $t < 100$ с, а константе проникновения k_p – участок $t > 100$ с. Константы проникновения (k_p) и диффузии (k_d) могут быть получены из зависимости $\ln(1 - \Delta\sigma_t/\Delta\sigma_{eq})$ от времени t .

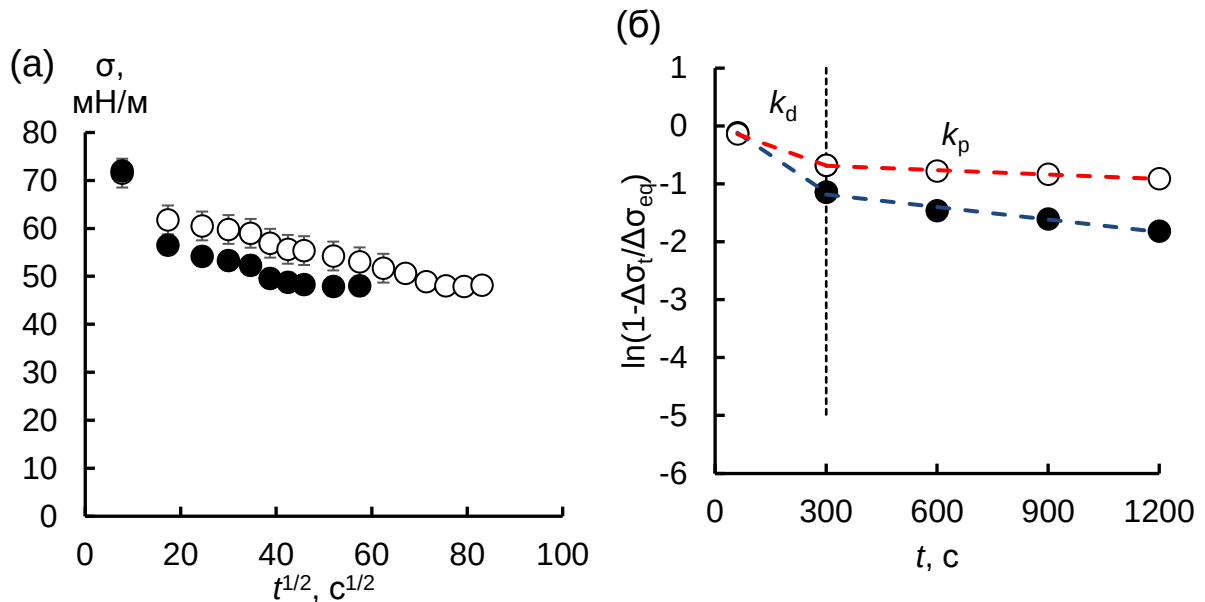


Рис. 8. Изменение во времени: (а) поверхностного натяжения растворов 0,1 г/л лизоцима в PBS(●) и 0,055 М Na-фосфатном буфере (○); (b) $\ln(1 - \Delta\sigma_t/\Delta\sigma_{eq})$ как функции времени.

Для раствора лизоцима в PBS $k_d = 4,3 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ и $k_p = 7 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$; для раствора лизоцима в 0,05 М Na-фосфатном буфере $k_d = 2,2 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ и $k_p = 3 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$. Таким образом, лизоцим в физиологическом растворе диффундирует и проникает в адсорбционный слой в два раза быстрее, чем в растворе, содержащем только фосфат-ионы. Константы проникновения и диффузии в десять раз ниже соответствующих констант, полученных для растворов с более высокой ионной силой (1 М), и они близки к постоянным для бессолевых растворов [382].

3.4. ВЗАИМНОЕ ВЛИЯНИЕ ЛИЗОЦИМА И НПАВ ПРИ КОНКУРЕНТНОЙ АДСОРБЦИИ НА МЕЖФАЗНЫХ ГРАНИЦАХ ВОДНЫЙ РАСТВОР/*n*-КСИЛОЛ И ВОДНЫЙ РАСТВОР/ВОЗДУХ

Взаимное влияние лизоцима и НПАВ при конкурентной адсорбции на межфазной границе было исследовано на примере Бридж-35 и плуроника Р123, имеющих примерно одинаковые по длине гидрофильные цепи ПЭО и различные по структуре и размеру гидрофобные фрагменты. В таблице 5 представлены полученные с помощью метода СФ коэффициенты распределения лизоцима и НПАВ по отдельности и в составе смеси состава лизоцим-НПАВ.

В большинстве случаев наблюдается увеличение коэффициента распределения лизоцима в присутствии Бридж-35 и плуроника Р123, что указывает на возможность некоторых структурных изменений в белке или образования комплекса белок-НПАВ, при этом присутствие лизоцима не влияет на величину коэффициента распределения плуроника Р123 и Бридж-35 в двухфазной системе.

Можно предположить, что образование комплексов между лизоцимом и плуроником Р123 или Бридж-35 происходит посредством взаимодействия гидрофобного фрагмента ПАВ ($C_{12}H_{25}^-$ у Бридж-35 и цепи ПЭО плуроников) и гидрофобных аминокислот в составе белка, что приводит к образованию гидрофильного комплекса, имеющего меньшее сродство к поверхности раздела. Поскольку значения коэффициента распределения НПАВ превосходят на два порядка коэффициент распределения лизоцима, связывание НПАВ с белком облегчает переход белка в органическую фазу подобно тому, как это происходит по данным литературы при взаимодействии $C_{10}DMPO$ с β -лактоглобулином [116].

Таблица 5. Распределение лизоцима и НПАВ в системе вода/*n*-ксилол плуроника по отдельности и в составе смеси состава лизоцим-НПАВ.

Тип водной фазы	Состав раствора	Коэффициент распределения		
		Лизоцим	Плюроник P123	Бридж-35
Вода	индивидуальное вещество	$(1,2 \pm 0,5) \times 10^{-3}$	$0,13 \pm 0,07$	-
	смесь	$(1,3 \pm 0,5) \times 10^{-3}$	$0,21 \pm 0,06$	-
К,Na-фосфатный буфер (0,018 M)	индивидуальное вещество	$(5,5 \pm 0,6) \times 10^{-4}$	$0,15 \pm 0,07$	-
	смесь	$(7,8 \pm 0,8) \times 10^{-4}$	$0,11 \pm 0,02$	-
PBS	индивидуальное вещество	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^{-3}$	$0,28 \pm 0,06$	$0,27 \pm 0,01$
	смесь	$(7,8 \pm 0,8) \times 10^{-4}$ $(1,5 \pm 0,2) \times 10^{-3(*)}$	$0,30 \pm 0,08$	$0,24 \pm 0,02$
Na-фосфатный буфер (0,05 M)	индивидуальное вещество	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^{-3}$	-	$0,26 \pm 0,01$
	смесь	$(1,5 \pm 0,2) \times 10^{-3(*)}$	-	$0,22 \pm 0,02$
(*) Смесь с Бридж-35				

Коэффициенты распределения плуроника P123 и Бридж-35 в двухфазной системе одинаковы несмотря на различие в строении гидрофобных фрагментов и составляют 0,27 – 0,28, что указывает на роль цепей ПЭО в адсорбции на границе раздела фаз с последующим проникновением в органическую фазу. Комплексы лизоцима с плуроником P123 и Бридж-35 ведут себя примерно одинаково при распределении в двухфазной системе. Формирование комплексов лизоцима с P123 и Бридж-35 сопровождается значительным уменьшением приповерхностной концентрации белка в присутствии плуроника P123 и Бридж-35, как показано на рис. 9.

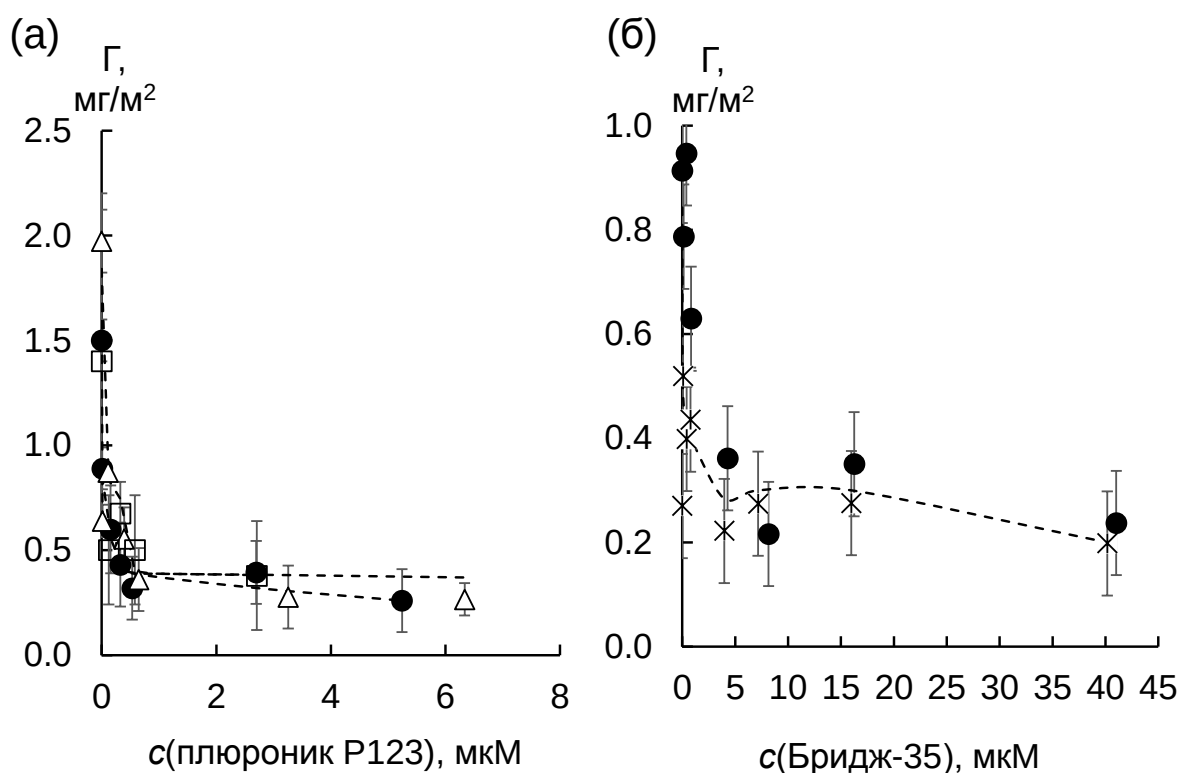


Рис. 9. Адсорбция 0,1 г/л лизоцима на межфазной границе водный раствор/*n*-ксилол в присутствии P123 (а) и Бридж-35 (б) в PBS (●), 0,018 М К,Na-фосфатном буфере (△), 0,0055 М Na-фосфатном буфере (×), воде (■). Пунктирными линиями показаны значения адсорбции, рассчитанные по модели Файнермана.

Существует два процесса, обуславливающих вытеснение белка плурониками с границы раздела фаз [79]: связывание плуроников посредством гидрофобных взаимодействий с границей раздела фаз и создание цепями ПЭО стерических препятствий сорбции белков; связывание плуроников за счёт вандерваальсовых, водородных и гидрофобных взаимодействий с белками и уменьшение сродства образующихся комплексов к границе раздела фаз. От структуры белков и плуроников зависит, какой из механизмов будет задействован. Взаимодействие цепей ПЭО с молекулами белка также носит сложный характер [77, 78]: цепи ПЭО с одной стороны создают стерические препятствия сорбции белков, а с другой стороны и вступают во взаимодействие с молекулами белков посредством водородных, вандерваальсовых и гидрофобных взаимодействий. Сближение молекул белка с цепями ПЭО приводит к сжатию цепей ПЭО и уменьшению их свободной энергии, которая передаётся молекулами белка, увеличивая их подвижность и препятствуя связыванию с границами раздела. При этом основную

роль во взаимодействии белков с цепями ПЭО авторы приведённого исследования отводят гидрофобным взаимодействиям.

В присутствии плуроника Р123 и Бридж-35 адсорбция белка достигает значений, близких к $0,3 \text{ мг/м}^2$, когда молярное отношение НПАВ к белку близко к 0,1, и остаётся постоянной с увеличением концентрации НПАВ, что подтверждает предположение, что белок не полностью вытесняется молекулами НПАВ на границе раздела фаз, а значит присутствует на границе раздела фаз в виде комплекса с НПАВ. Плуроник Р123 и Бридж-35, имеющие различные по структуре и молекулярной массе, а значит и по степени сродства к белку гидрофобные фрагменты, оказывают одинаковый эффект на вытеснение белка с границы раздела фаз, что позволяет предположить, что основную роль в вытеснении белка с границы раздела играет взаимодействие белка с цепями ПЭО. Поскольку адсорбция лизоцима уменьшается в присутствии НПАВ не зависимо от ионной силы раствора или присутствия различных анионов, можно предположить, что формирование комплексов происходит посредством не столько гидрофобных, сколько водородных и вандерваальсовых взаимодействий, в которых могут участвовать не только гидрофобные фрагменты ППО, как описано в литературе, но и цепи ПЭО. При этом молекулы НПАВ взаимодействуют как с «сплюснутым» (в присутствии фосфат-ионов), так и с «компактным» (в присутствии хлорид-ионов) белком.

Сам белок не влияет на адсорбцию НПАВ: адсорбция Бридж-35 и плуроника Р123 с увеличением концентрации одинаково возрастает в присутствии и отсутствии лизоцима (рис. 10). По данным литературы белок может способствовать разрушению агрегатов, что приводит к увеличению концентрации ПАВ у границы раздела фаз и усилению адсорбции, или участвовать в образовании стабильных комплексов белок—ПАВ, что мало влияет или не влияет на адсорбцию ПАВ [79]. Таким образом, наблюдаемое отсутствие изменений в адсорбции плуроника Р123 и Бридж-35 при увеличении концентрации белка также указывает на формирование стабильных комплексов белок-НПАВ.

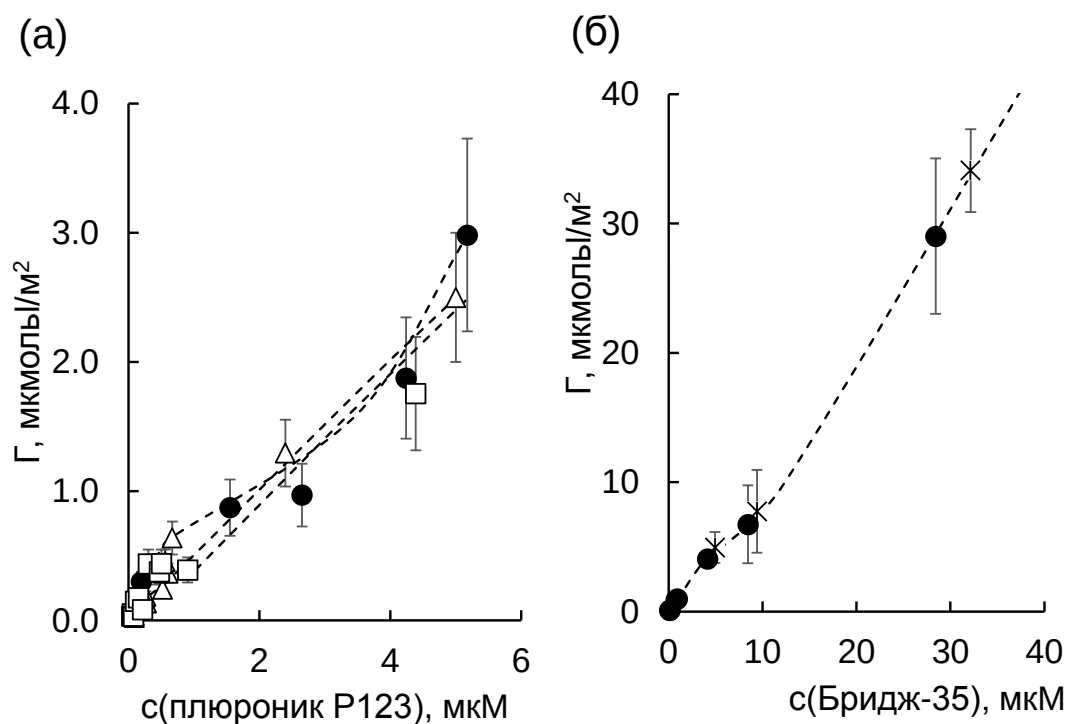


Рис. 10. Адсорбция плуроника P123 (а) и Бридж-35 (б) в присутствии 0,1 г/л лизоцима на границе вода/*n*-ксилол в PBS (●), 0,018 М К,Na-фосфатном буфере (Δ), 0,0055 М Na-фосфатном буфере (×), воде (■). Пунктирными линиями показаны значения адсорбции, рассчитанные по модели Файнермана.

Для определения параметров межмолекулярного взаимодействия между белком и НПАВ в поверхностном слое для плуроника P123 и Бридж-35 было проведено измерение поверхностного натяжения на межфазных границах водный раствор/*n*-ксилол для исследуемых смесей лизоцим-плуроник P123 и лизоцим-Бридж-35 с помощью метода висящей капли. Полученные результаты представлены на рис. 11.

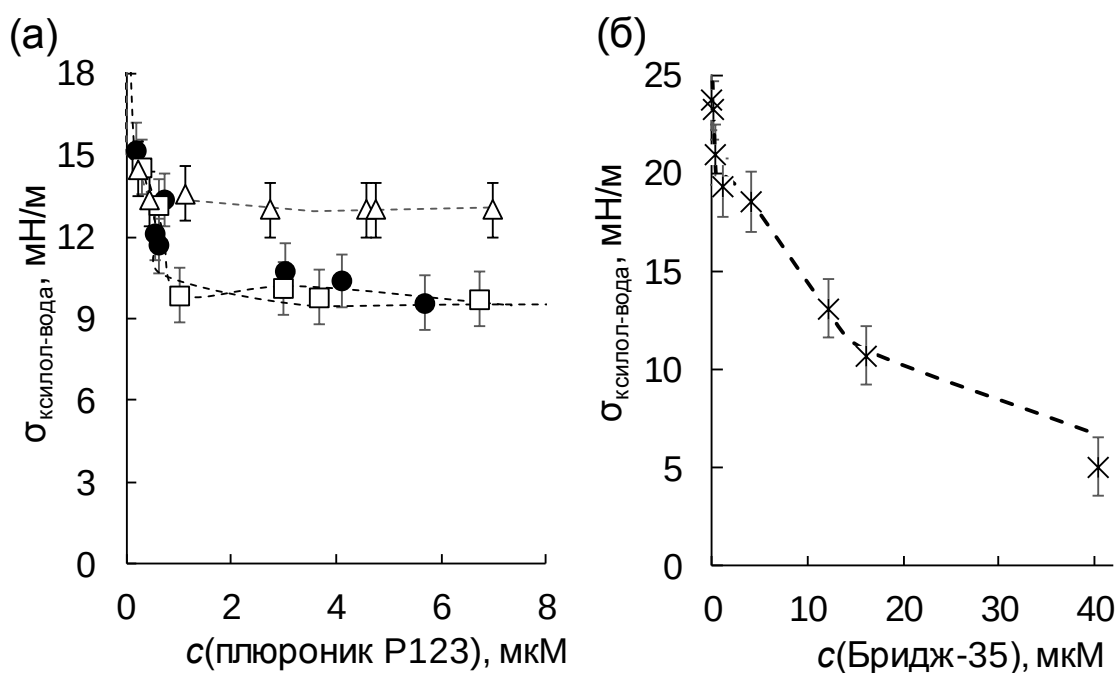


Рис. 11. Поверхностное натяжение растворов плуроника Р123 (а) и Бридж-35 (б) в присутствии 0,1 г/л лизоцима на границе водный раствор/п-ксилол в PBS (●), 0,018 М К,Na-фосфатном буфере (Δ), 0,0055 М Na-фосфатном буфере (×), воде (■). Пунктирными линиями показаны значения поверхностного натяжения, рассчитанные по модели Файнермана.

Была использована предложенная Файнерманом и соавторами модель адсорбции белка и ПАВ по отдельности и в составе смеси белок-ПАВ [99, 107 – 112]. В основу модели положено уравнение двумерного давления Фрумкина, в котором учтены площадь, занимаемая молекулой адсорбированного вещества в насыщенном слое и парные взаимодействия между молекулами в адсорбционном слое. При этом модель учитывает различия в значениях площади, занимаемой молекулами белка и ПАВ, наличие заряда на поверхности молекулы белка и возможное агрегирование. Согласно этой модели, при адсорбции белка большая ось белковой молекулы может принимать как перпендикулярную, так и параллельную ориентацию по отношению к поверхности раздела. Площадь, которую занимает молекула белка в насыщенном адсорбционном слое, варьирует от минимального значения w_{min} , соответствующего перпендикулярной ориентации оси, до максимального значения w_{max} , которое соответствует параллельной ориентации молекулы белка. Величины w_{min} и w_{max} могут быть рассчитаны из размеров белковой глобулы. По модели Файнермана для i -ого состояния площадь, занимаемая молекулой белка, определяется как:

$$w_i = w_{min} + (i - 1)w_{max} \quad (8)$$

Уравнения, описывающие изотерму двумерного давления и адсорбцию белка в i -м состоянии, имеют вид:

$$-\frac{Pw_0}{RT} = \ln(1 - \theta_p) + \theta_p \left(1 - \frac{w_0}{w}\right) + a_p \theta_p^2 \quad (9)$$

$$b_p c_p = \frac{w \Gamma_i}{(1 - \theta_p)^{w_i/w}} \exp \left(-2a_p \left(\frac{w_i}{w} \right) \theta_p \right) \quad (10)$$

где P – двумерное давление, R – универсальная газовая постоянная, T – температура, a_p – параметр межмолекулярного взаимодействия молекул белка в адсорбционном слое, $\theta_p = \Gamma w$ – степень заполнения слоя молекулами белка, c_p – концентрация белка в объеме раствора, b_p – константа адсорбционного равновесия.

Для смесей уравнение двумерного давления и адсорбции принимают следующий вид:

$$-\frac{Pw_0}{RT} = \ln(1 - \theta_p - \theta_s) + \theta_p \left(1 - \frac{w_0}{w}\right) + a_p \theta_p^2 + a_s \theta_s^2 + 2a_{ps} \theta_p \theta_s \quad (11)$$

$$b_p c_p = \frac{w \Gamma_i}{(1 - \theta_p - \theta_s)^{w_i/w}} \exp \left(-2a_p \left(\frac{w_i}{w} \right) \theta_p - 2a_{ps} \theta_s \right) \quad (12)$$

Индексы p и s в данном случае относятся к белку и ПАВ соответственно.

В случае лизоцима параметры поверхностного натяжения на границе имеют следующие значения: $w_0 = 4,95 \times 10^5$ м²/моль, $w_{min} = 7,72 \times 10^6$ м²/моль, $w_{max} = 2,54 \times 10^7$ м²/моль [100, 110]. Эти параметры были использованы при описании изотерм поверхностного натяжения и изотерм адсорбции белка.

Как следует из уравнения 11 в классическом эксперименте, когда имеются данные только по поверхностному натяжению смеси веществ, необходимо подобрать шесть неизвестных параметров. В нашем случае, есть абсолютные значения концентрации веществ в смешанном адсорбционном слое, полученные с помощью метода сцинтиллирующей фазы. Таким образом, задача свелась к определению только параметров межмолекулярного взаимодействия, которые подбирали с помощью метода наименьших квадратов, после чего с помощью полученных параметров описывали изотерму поверхностного натяжения и

изотермы адсорбции каждого компонента смеси. Полученные значения приведены в таблице 6.

Таблица 6. Параметры межмолекулярного взаимодействия между лизоцимом и плюронином Р123, лизоцимом и Бридж-35.

Параметр	Значение
лизоцим	
w_0	$4,95 \times 10^5 \text{ м}^2/\text{моль}$
w_{min}	$7,72 \times 10^6 \text{ м}^2/\text{моль}$
w_{max}	$2,54 \times 10^7 \text{ м}^2/\text{моль}$
a_p	0,69
b_p	$1,0 \times 10^4 \text{ м}^3/\text{моль}$
Бридж-35	
w_s	$4,2 \times 10^5 \text{ м}^2/\text{моль}$
a_s	2,75
a_{ps}	0
b_s	$6 \times 10^5 \text{ м}^3/\text{моль}$
Плюроник Р123	
w_s	$2,95 \times 10^8 \text{ м}^2/\text{моль}$
a_s	1,3
a_{ps}	0
b_s	$4,9 \times 10^5 \text{ м}^3/\text{моль}$

Полученные параметры, характеризующие адсорбцию на границе водный раствор/*n*-ксилол, были использованы для описания изотерм поверхностного натяжения лизоцима, плюроника Р123 и Бридж-35 на границе водный раствор/воздух (рис. 12), поскольку адсорбционные слои на границе раздела жидкость/жидкость и жидкость/воздух структурно идентичны [385, 386].

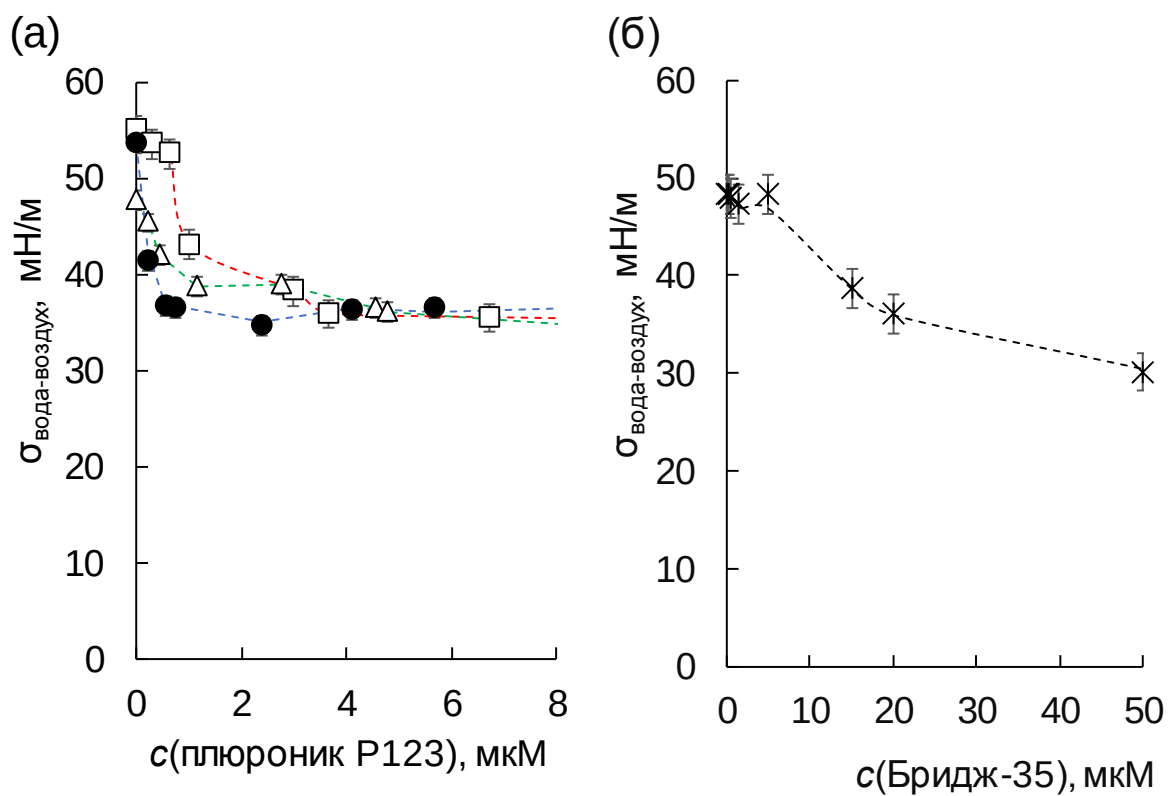


Рис. 12. Поверхностное натяжение растворов плуроника Р123 (а) и Бридж-35 (б) в присутствии 0,1 г/л лизоцима на границе водный раствор/воздух в PBS (●), 0,018 М К,Na-фосфатный буфер (Δ), 0,0055 М Na-фосфатный буфер (×), вода (■). Пунктирными линиями показаны значения поверхностного натяжения, рассчитанные по уравнению Файнермана.

С помощью параметров из таблицы 6 и уравнения для двумерного давления на границах с воздухом был определен состав адсорбционного слоя по мере заполнения молекулами белка и ПАВ (рис. 13).

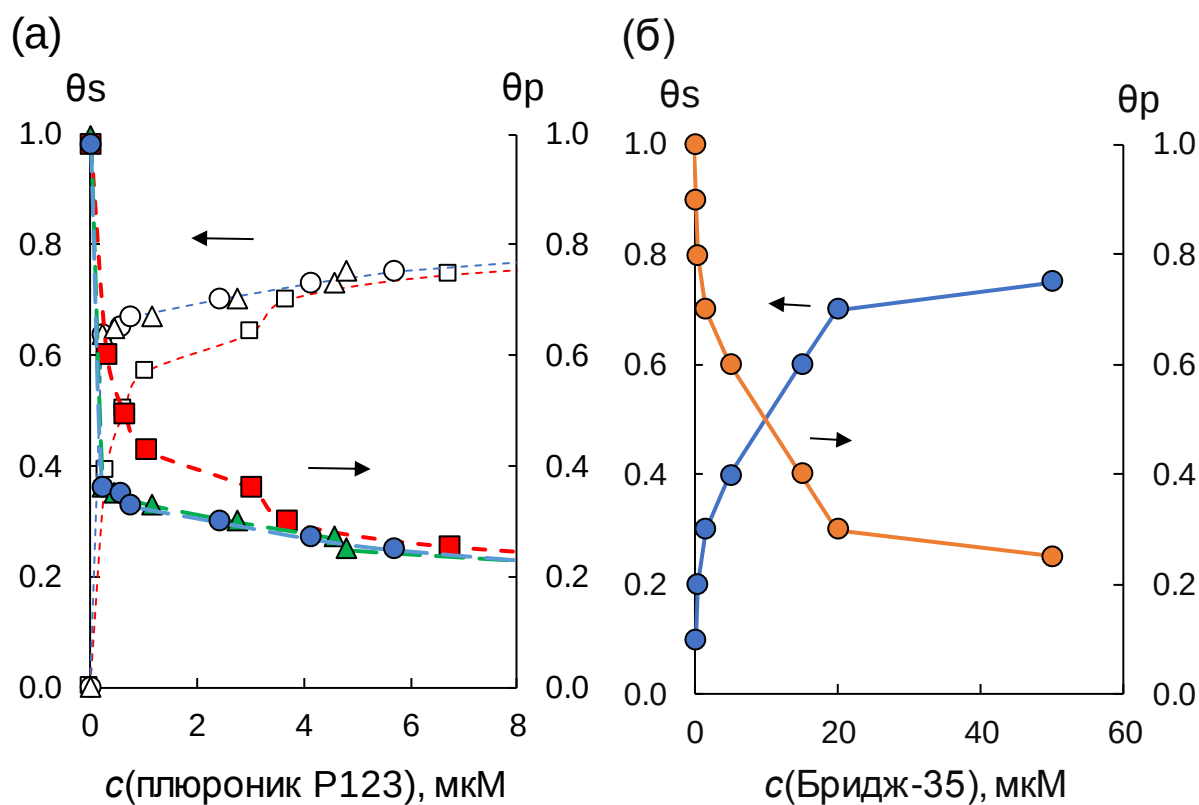


Рис. 13. Степень заполнения адсорбционного слоя на границе водный раствор/воздух молекулами белка (θ_p) и НПАВ (θ_s) при увеличении концентрации плуроника Р123 (а) и Бридж-35 (б) в присутствии 0,1 г/л лизоцима в PBS (●), 0,018 М К,Na-фосфатном буфере (▲), воде (■).

Способность вытеснять лизоцим с границы раздела фаз выше у плуроника Р123 по сравнению с Бридж-35, но значения адсорбции лизоцима в присутствии максимальных концентраций плуроника Р123 и Бридж-35 одинаковы при том, что плуроник Р123 и Бридж-35 различаются по структуре и длине гидрофобных фрагментов, имея лишь одинаковые по длине цепи ПЭО, что указывает на то, что вытеснение белка с границы раздела обусловлено не столько уменьшением сродства к поверхности раздела комплексов лизоцим-НПАВ, сколько стерическим препятствием, которые создают цепи ПЭО молекул плуроника или Бридж-35. Поэтому следующим этапом исследовательской работы было изучение того, как длина ПЭО цепи влияет на адсорбцию лизоцима. Для этого были проведены эксперименты с плурониками L121 и F127.

3.5. ВЛИЯНИЕ ДЛИНЫ ПЭО ЦЕПИ ПЛЮРОНИКОВ НА АДсорбЦИЮ ЛИЗОЦИМА НА МЕЖФАЗНЫХ ГРАНИЦАХ ВОДНЫЙ РАСТВОР/*n*-КСИЛОЛ И ВОДНЫЙ РАСТВОР/ВОЗДУХ

С помощью меченного тритием лизоцима и метода сцинтиллирующей фазы было показано, что степень вытеснения лизоцима плюрониками из поверхностного слоя на границе PBS/*n*-ксилол зависит от длины ПЭО цепи (рис. 14).

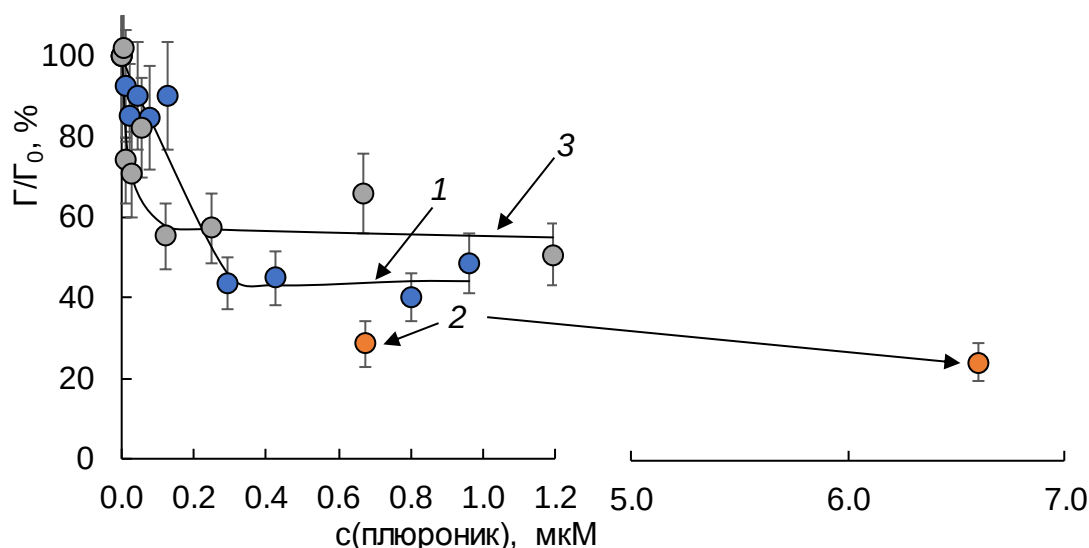


Рис. 14. Зависимость изменения адсорбции лизоцима в смеси с плюрониками F127 (1), P123 (2) и L121 (3) от их концентрации нормированная на адсорбцию лизоцима без добавок плюроника (Γ/Γ_0). 100 % соответствует адсорбции лизоцима без добавок плюроников (концентрация лизоцима в экспериментах с P123 составляет 0,5 г/л).

Показано, что снижение содержания лизоцима в адсорбционном слое происходит при увеличении концентрации растворов плюроников до 0,1, 0,3 и 0,7 мкМ для L121, F127 и P123 соответственно. При более высоких концентрациях плюроников содержание лизоцима в адсорбционном слое мало изменялось. Максимальное вытеснение белка составило 40%, 60% и 75% для L121, F127, P123 соответственно. Плюроники P123 и F127, которые обладают более высоким значением ГЛБ, в большей степени вытесняют лизоцим из поверхностного слоя. Несмотря на высокую поверхностную активность плюроников на границах раздела, часть лизоцима остаётся на границе раздела фаз. Вероятно, это связано с тем, что белок образует устойчивый комплекс с НПАВ. Это следует учитывать при интерпретации данных по поверхностному натяжению на межфазных границах.

На рис. 15 показаны изотермы равновесного поверхностного натяжения на границе PBS/воздух для растворов лизоцим-плюроник.

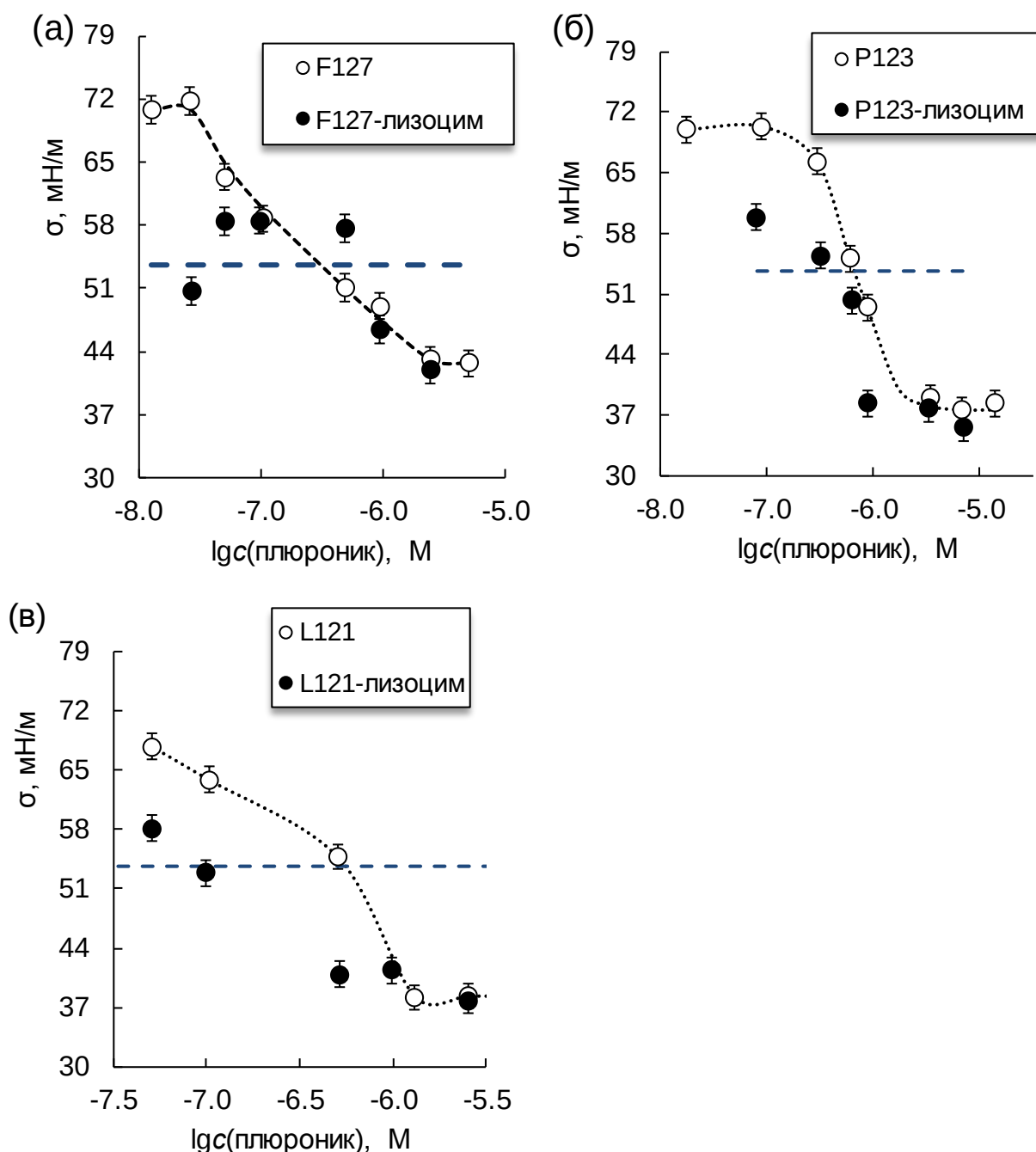


Рис. 15. Изотермы поверхностного натяжения плюроников (а) F127, (б) P123, (в) L121 в присутствии 0,5 г/л лизоцима и в отсутствие. Пунктирной линией показано поверхностное натяжение лизоцима в отсутствие НПАВ.

Поверхностное натяжение в системах лизоцим-плюроник в области высоких концентраций плюроника не зависит от присутствия лизоцима, в области низких концентраций плюроника присутствие лизоцима приводит к уменьшению поверхностного натяжения до значений, характерных для свободных плюроников

при концентрации выше ККМ. Поверхностное натяжение достигает постоянных значений для смесей лизоцим-плюроник при концентрациях плюроника 0,96, 0,88 и 0,52 мкМ для F127, P123 и L121 соответственно, что в 2,8, 2,0 и 2,5 раза меньше соответствующих значений ККМ плюроников.

По данным литературы добавление белков приводит к увеличению КТМ плюроников и уменьшению энтальпии и энтропии мицеллообразования, на основании чего выдвинуто предположение о взаимодействии плюроников с белками за счёт гидрофобных взаимодействий между ППО и белком [52]. Приведённые в данной работе данные показывают, что на формирование комплексов лизоцима с плюрониками и вытеснение белка с границы раздела оказывает влияние длина цепи ПЭО.

Следует добавить, что в присутствии лизоцима не происходило помутнения растворов, содержащих плюроник L121, а в отсутствие белка происходило. По данным литературы в области низких концентраций L121 присутствует в растворе в виде агрегатов и образует мутные дисперсии [18]. Отсутствие помутнения растворов в присутствии белка указывает на разрушение агрегатов плюроника и согласуется с предположением о связывании лизоцима с плюроником.

3.6. ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИЗОЦИМА С НПАВ С ПОМОЩЬЮ АТОМАРНОГО ТРИТИЯ

Существует предположение, что на границах жидкость/жидкость и жидкость/воздух структура смешанного адсорбционного слоя, образованного белками и НПАВ, одинакова [386], поэтому при изучении взаимодействия лизоцима с НПАВ на границе водный раствор/органическая жидкость могут быть использованы данные, полученные для лизоцима с НПАВ на границе водный раствор/воздух. Для выявления особенностей взаимодействия лизоцима с плюрониками и Бридж-35 в адсорбционном слое на границе раздела PBS/воздух использовали метод тритиевого зонда. Ранее аналогичный эксперимент был проведён с ионогенными ПАВ (ДСН и ДТАБ) [345].

Растворы лизоцима и смесей лизоцима с НПАВ равномерно распределяли по стенкам реакционного сосуда и выдерживали в течение 30 мин при комнатной температуре. Далее сосуд быстро замораживался жидким азотом, удаляли воздух, заполняли газообразным тритием и обрабатывали адсорбционные слои атомарным

трением, который получали нагреванием вольфрамовой проволоки электрическим током.

По данным кинетики изменения поверхностного натяжения в системе лизоцим-НПАВ 30 мин достаточно для образования адсорбционного слоя (рис. 16).

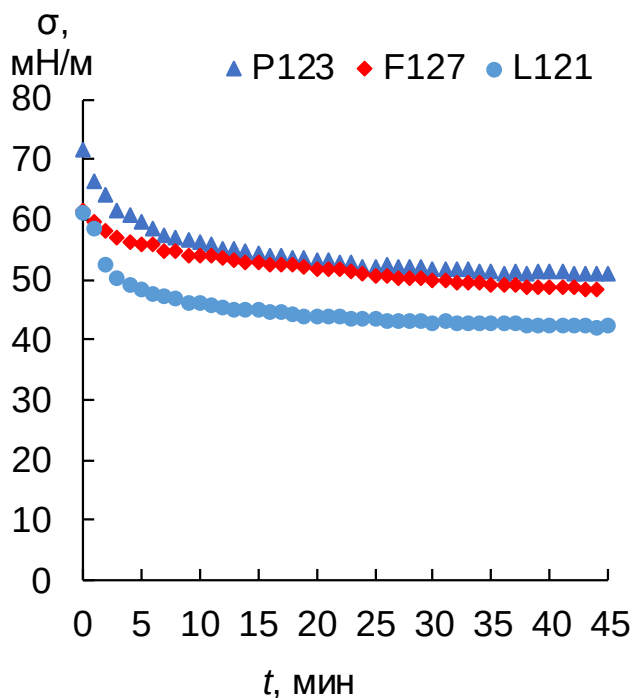


Рис. 16. Кинетика изменения поверхностного натяжения на границе PBS/воздух растворов, содержащих 0,5 г/л лизоцим и плуроники F127 (♦), P123 (▲), L121 (●).

На основании результатов, полученных с помощью метода сцинтиллирующей фазы, были использованы концентрации НПАВ, при которых адсорбция лизоцима достигала постоянных значений, и максимальные использованные концентрации: F127 – 0,3 и 1,0 мкМ, P123 – 0,7 и 7 мкМ, L121 – 0,2 и 1 мкМ, Бридж-35 – 5 и 50 мкМ. Использовали концентрацию белка 0,5 г/л (35 мкМ), т.к. согласно данным литературы при этой концентрации лизоцима в отсутствии ПАВ на границе раздела образуется плотный адсорбционный слой, в котором молекулы белка ориентированы перпендикулярно границе раздела фаз [103].

После очистки белка от лабильной метки и его гидролиза с помощью аминокислотного анализа была определена удельная радиоактивность аминокислотных остатков по ранее отработанной методике [345]. На рис. 16

приведено распределение трития в аминокислотных остатках белка в виде долей от общей радиоактивности, которые были получены с помощью следующего уравнения:

$$\omega, \% = \frac{a_i \times n_i}{\sum_{i=1}^n a_i \times n_i} \times 100 \quad (13)$$

где a_i – молярная радиоактивность аминокислотного остатка, а n_i – количество аминокислотных остатков в глобуле белка. Радиоактивность аминокислотных остатков была рассчитана с учётом поправочных коэффициентов, характеризующих вероятность включения трития, и нормирована на содержание трития в газовой фазе при проведении реакции.

Ранее было показано, что плюроники и Бридж-35 вытесняют лизоцим с границы раздела фаз. Можно было ожидать уменьшения радиоактивности лизоцима в присутствии НПАВ. Однако показано, что в присутствии НПАВ радиоактивность аминокислотных остатков и белка в целом может как уменьшаться, так и увеличиваться. Наибольшее увеличение происходило в присутствии плюроника P123 по сравнению с L121 и F127. Таким образом, полученные результаты вошли в кажущееся на первый взгляд противоречие с данными о вытеснении белка плюрониками с границы раздела фаз.

При концентрации, близкой к 1 мкМ, радиоактивность аминокислотных остатков лизоцима изменяется, как показано на рис. 17 – 21. В присутствии плюроника F127 радиоактивность аминокислот значительно ниже, чем в присутствии P123 и L121, несмотря на то, что плюроники F127 и P123 одинаково вытесняют лизоцим с границы раздела фаз. По всей видимости это связано с различием в структуре формируемых адсорбционных слоёв. Плюроники P123 и L121 формируют мицеллообразные агрегаты в отличие от плюроника F127, что следует из данных поверхностного натяжения, представленных на рис. 15. В литературе приводятся данные о том, что плюроники L121 и P123 формируют пластиноподобные ламеллярные структуры в водных растворах [43]. Можно предположить, что плюроники L121 и P123 формируют такие структуры на границах раздела, а плюроник F127 формирует адсорбционный слой, состоящий из отдельных молекул полимера.

По данным литературы образование таких агрегатов нарушает структуру воды [387]. В литературе для взаимодействия белок-ПЭГ приводится несколько возможных механизмов взаимодействия белков с ПЭГ, включающих эффект исключённого объёма, неспецифическое взаимодействие с белком и вытеснение молекул воды с поверхности белковых глобул [120, 119].

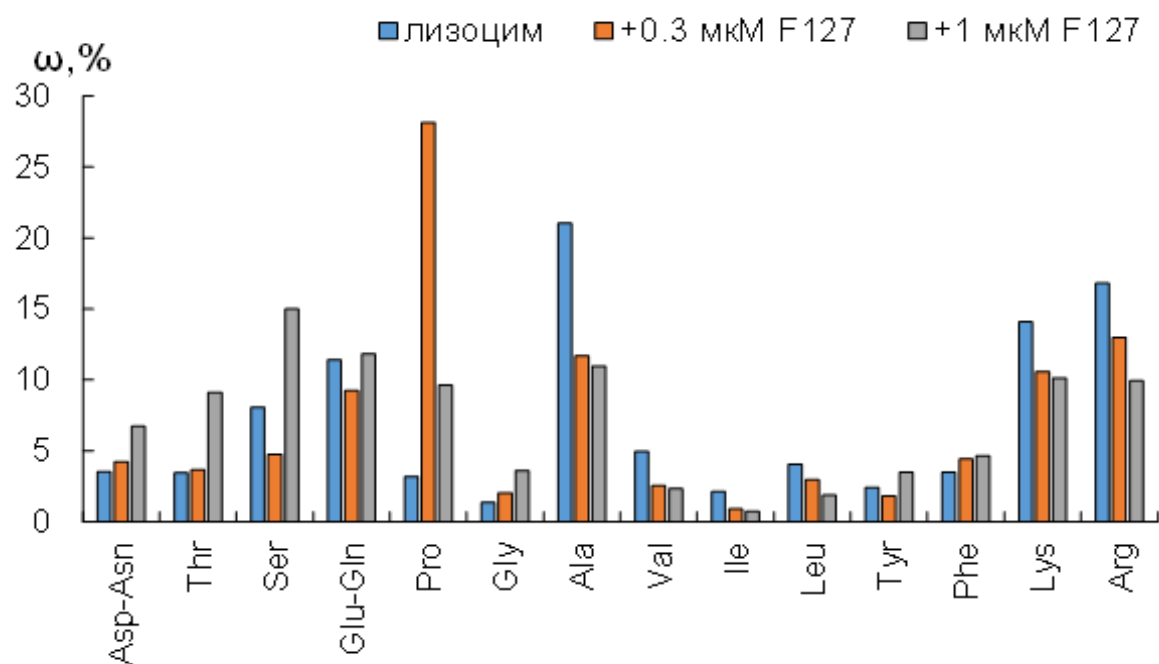


Рис. 17. Распределение трития в аминокислотных остатках лизоцима в присутствии плуроника F127.

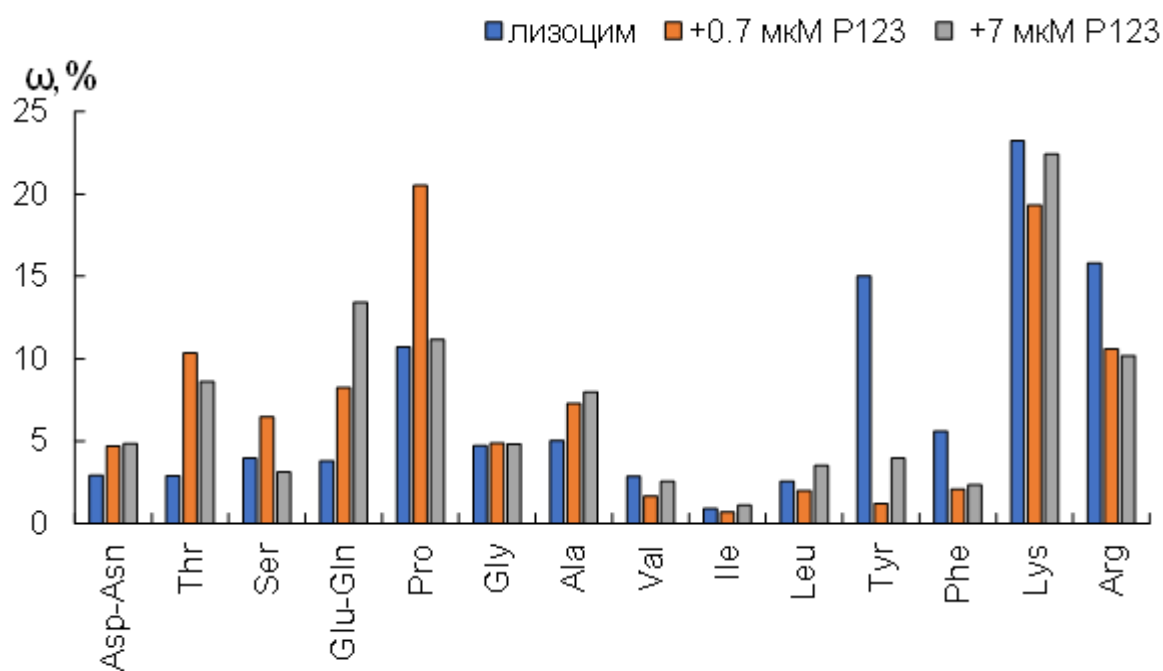


Рис. 18. Распределение трития в аминокислотных остатках лизоцима в присутствии плуроника P123.

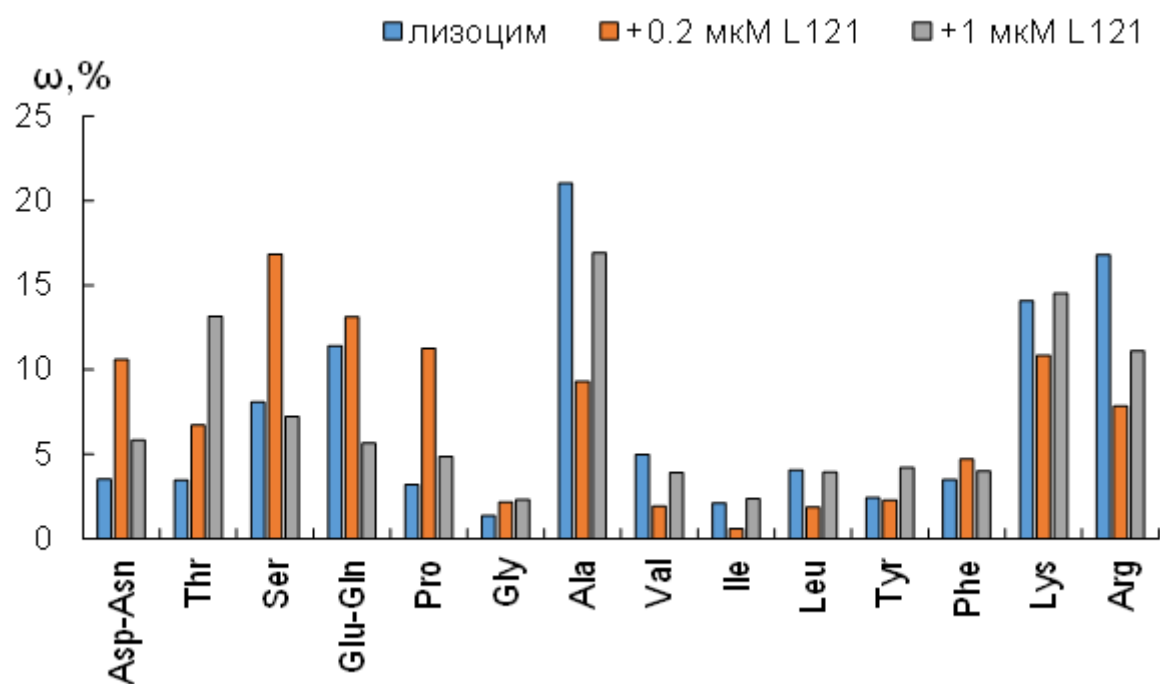


Рис. 19. Распределение трития в аминокислотных остатках лизоцима в присутствии плуроника L121.

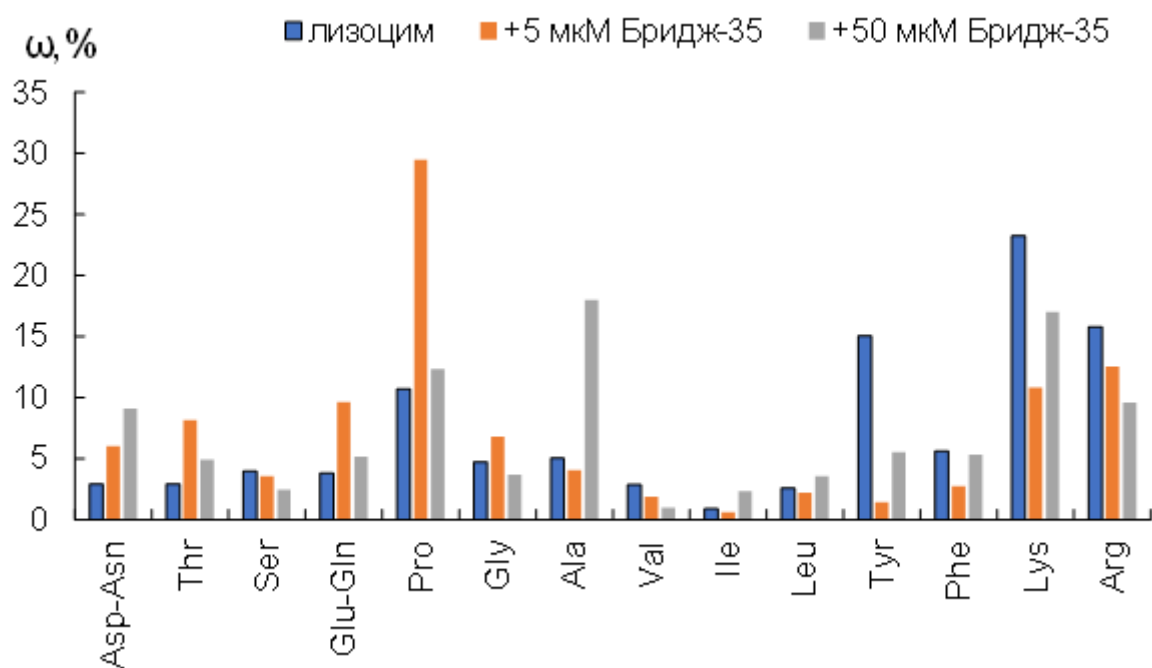


Рис. 20. Распределение трития в аминокислотных остатках лизоцима в присутствии Бридж-35.

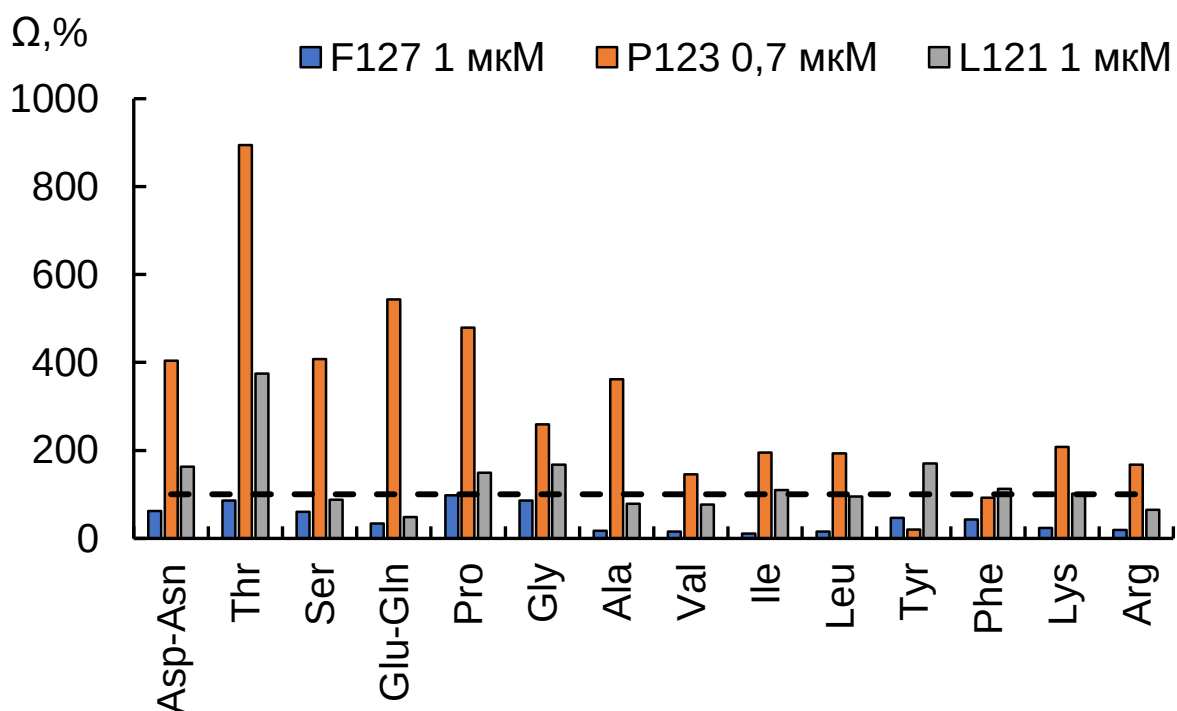


Рис. 21. Относительное изменение радиоактивности аминокислот в составе смешанного адсорбционного слоя лизоцима с плурониками (за 100 % принята радиоактивность аминокислот в адсорбционном слое лизоцима в отсутствие НПАВ). Смешанные адсорбционные получали для лизоцима (0,5 г/л) в присутствии плуроников F127 (1 мкМ), P123 (0,7 мкМ), L121 (1 мкМ).

Для интерпретации полученных данных необходимо учесть специфику взаимодействия атомарного трития с структурно организованными адсорбционными слоями [329] и бислойными липидными мембранами [328]. В приведённых работах показана способность атомарного трития проникать в структуры, содержащие слои молекул с параллельной ориентацией, без существенной потери реакционной способности. Структуры, содержащие области с меньшей электронной плотностью, будут более проницаемы для атомарного трития по сравнению с водой. Поэтому наблюдаемое увеличение удельной радиоактивности аминокислотных остатков и белка в целом в присутствии плуроников обусловлено тем, что образованные плурониками адсорбционные слои более проницаемы для атомов трития по сравнению с водным окружением белка в отсутствие плуроников, при этом цепи ПЭО вытесняют молекулы воды из окружения молекул белка, делая белок более доступным для взаимодействия с атомарным тритием.

Значительное увеличение удельной радиоактивности пролина в присутствии всех исследуемых НПАВ позволяет предположить, что НПАВ взаимодействуют с остатками пролина или с соседними аминокислотами. С учётом пространственного распределения аминокислотных остатков в глобуле лизоцима (рис. 22) отношение удельных радиоактивностей пролина и фенилаланина Phe/Pro может характеризовать ориентацию молекулы лизоцима на поверхности водный раствор/воздух [345].

Отношение удельной радиоактивности остатков фенилаланина и пролина ($A_{\text{Phe}}/A_{\text{Pro}}$) в присутствии и в отсутствие НПАВ представлено в таблице 7. Показано, что отношение $A_{\text{Phe}}/A_{\text{Pro}}$ становится меньше единицы для всех случаев смесей лизоцим—НПАВ и уменьшается с увеличением числа этиленоксидных звеньев. Для адсорбционного слоя на поверхности вода/воздух при концентрации белка 0,5 мг/мл, молекулы лизоцима ориентированы таким образом, что фенилаланин направлен в сторону границы раздела фаз. Добавление НПАВ приводит к изменению структуры адсорбционного слоя: происходит не только вытеснение 40-75% белка молекулами НПАВ, но и изменение пространственной ориентации белка (или белка в составе комплекса с НПАВ), таким образом, что остатки пролина направлены к границе раздела, что подтверждает предположение о том, что остатки пролина или соседние с ним аминокислоты участвуют во взаимодействии с цепями ПЭО.

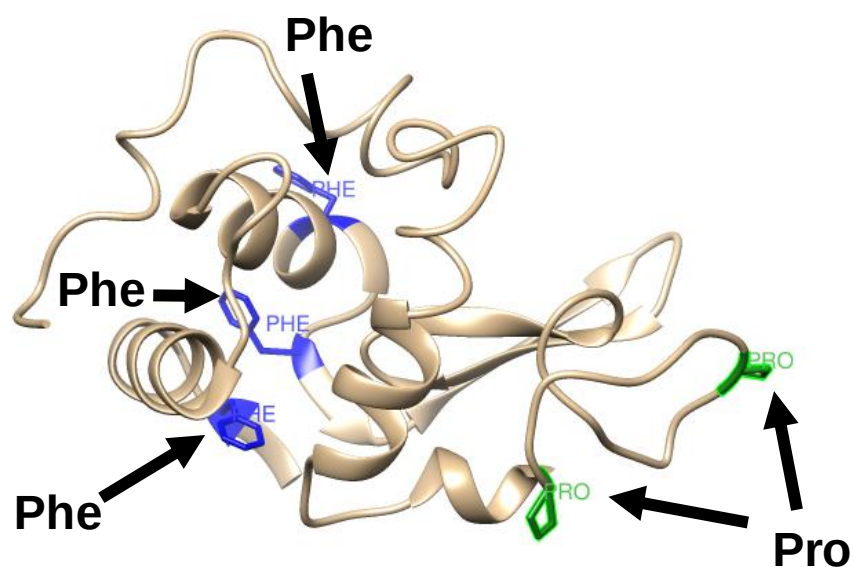


Рис. 22. Положение аминокислотных остатков фенилаланина (Phe) и пролина (Pro) в структуре лизоцима (PDB: 6LYZ).

Таблица 7. Отношение удельной радиоактивности $A_{\text{Phe}}/A_{\text{Pro}}$.

Смесь	$A_{\text{Phe}}/A_{\text{Pro}}$
лизоцим	1,3
+ Бридж-35 (5×10^{-6} M)	0,1
+ Бридж-35 (5×10^{-6} M)	0,4
+ плюроник P123 (7×10^{-7} M)	0,1
+ плюроник P123 (7×10^{-6} M)	0,4
+ плюроник F127 (3×10^{-7} M)	0,2
+ плюроник F127 (1×10^{-6} M)	0,5
+ плюроник L121 (2×10^{-7} M)	0,4
+ плюроник L121 (1×10^{-6} M)	0,8

3.7. ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЛИЗОЦИМЕ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Чтобы выявить возможные структурные изменения лизоцима при взаимодействии с плурониками, растворы смесей лизоцим-плуроник были исследованы с помощью молекулярной спектроскопии. Были использованы концентрации плуроников, при которых происходило максимальное вытеснение белка с поверхности раздела. На рис. 23 представлены спектры кругового дихроизма в дальнем УФ-диапазоне раствора лизоцима и смесей лизоцима с плурониками и Бридж-35.

Спектр кругового дихроизма лизоцима показывает два отрицательных пика на длинах волн 207 и 220 нм, которые соответствуют α -спирали белка [388]. Области поглощения пептидной связи в спектрах лизоцима в присутствии и отсутствии плуроников практически совпадают, что указывает на отсутствие значительных изменений во вторичной структуре лизоцима. Полученные данные демонстрируют различие в характере взаимодействий лизоцима с НПАВ и с ионными ПАВ, поскольку в присутствии последних наблюдаются значительные изменения в спектрах кругового дихроизма согласно данным литературы [90, 389].

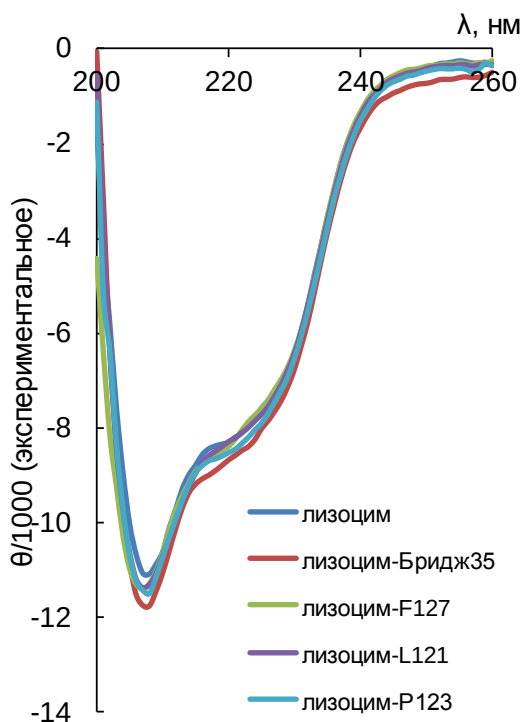


Рис. 23. Спектр КД лизоцима (0,5 г/л) в присутствии плуроников и Бридж-35.

На рис. 24 представлены спектры малоуглового рентгеновского рассеяния лизоцима в присутствии и отсутствие плуроников. Полученные параметры, приведённые в таблице 8, показывают, что лизоцим присутствует в виде мономеров. Данные согласуются с моделью лизоцима из банка данных белка (PDB 6LYZ). Результаты SAXS показали отсутствие значительных изменений в структуре лизоцима в присутствии НПАВ и образования агрегатов, характерного для некоторых белков в присутствии ПЭГ [157, 161]. Полученные результаты согласуются с данными литературы, согласно которым связывание лизоцима с плурониками предотвращает его агрегирование [80].

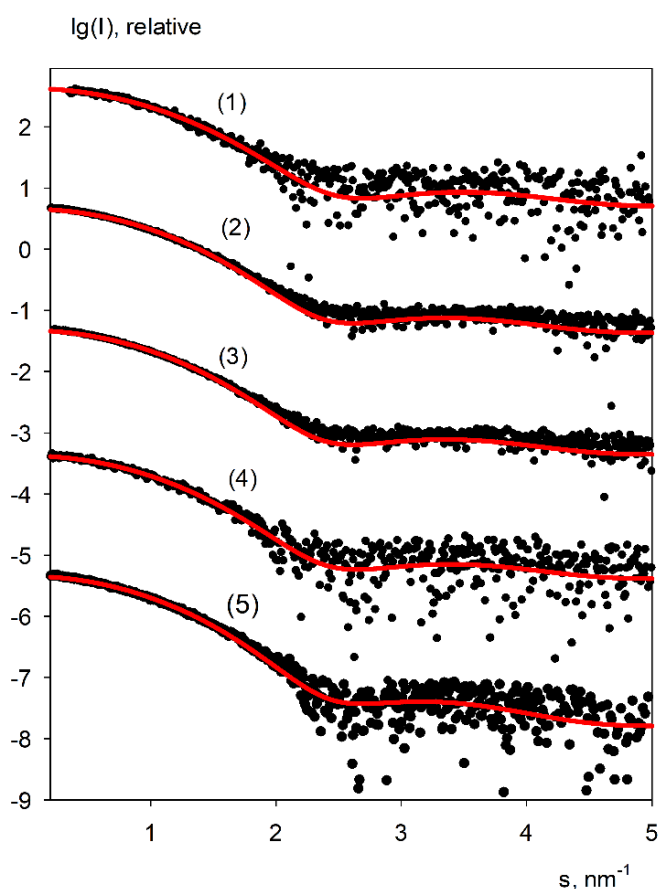


Рис. 24. Спектры малоуглового рентгеновского рассеяния для 0,5 мг/мл лизоцима в присутствии 1 мкМ плуроников L121 (1), P123 (2) and F127 (3) и в отсутствие (4), а также в присутствии Бридж-35 (5). Экспериментальные данные обозначены черными точками, совпадения с моделью лизоцима показаны в виде красных сплошных линий. Кривые рассеяния показаны в логарифмическом масштабе.

Таблица 8. Параметры, полученные с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния.

Смесь	R_g , нм	D_{max} , нм	V_p , нм ³	M_w , кДа	χ^2
лизоцим	1,6±0.1	4,5±0.1	22,3±0.1	13,5	1,1
лизоцим-Бридж-35	1,7±0.1	5,4±0.1	27,1±0.1	16,0	1,6
лизоцим-плюроник L121	1,5±0.05	4,5±0.1	19,8±0.1	12,0	1,1
лизоцим-плюроник P123	1,6±0.1	5,0±0.1	26,0±0.1	15,8	3,2
лизоцим-плюроник F127	1,6±0.1	4,8±0.1	26,0±0.1	15,8	3,1

На рис. 25 показаны спектры оптического поглощения лизоцима в присутствии плюроников. Спектрофотометрический анализ показал незначительное (на 5–7%) увеличение оптического поглощения лизоцима на длине волны 280 нм в присутствии плюроников L121 и P123, при этом эффект не зависел от концентрации НПАВ. В присутствии плюроника F127 увеличение интенсивности пика поглощения не велико, но в области высоких концентраций происходит значительное увеличение оптического поглощения (более чем на 50%). Сдвигов пиков поглощения не происходит, форма спектра не меняется. В области длин волн 200 – 230 нм не наблюдается каких-либо изменений в интенсивности пиков поглощения лизоцима в присутствии НПАВ.

Спектр поглощения лизоцима имеет два максимума. Первый максимум лежит в области 200 – 230 нм и обусловлен поглощением света карбонильной группой пептидной связи –CO– в результате $\pi \rightarrow \pi^*$ перехода. В области 260 – 290 нм расположен второй максимум, обусловленный поглощением ароматических остатков в составе аминокислот триптофана, тирозина и фенилаланина (хромофоров). На поглощение света в этой области влияет микроокружение хромофорных группы [371, 390].

Таким образом, увеличение интенсивности пика поглощения лизоцима на длине волны 280 нм без изменения формы спектра в присутствии плюроников говорит об изменении плотности микроокружения ароматических кислот (увеличении экспозиции хромофорных остатков аминокислот в объём растворителя), и наибольший эффект оказывает плюроник с наибольшей длиной этиленоксидных звеньев.

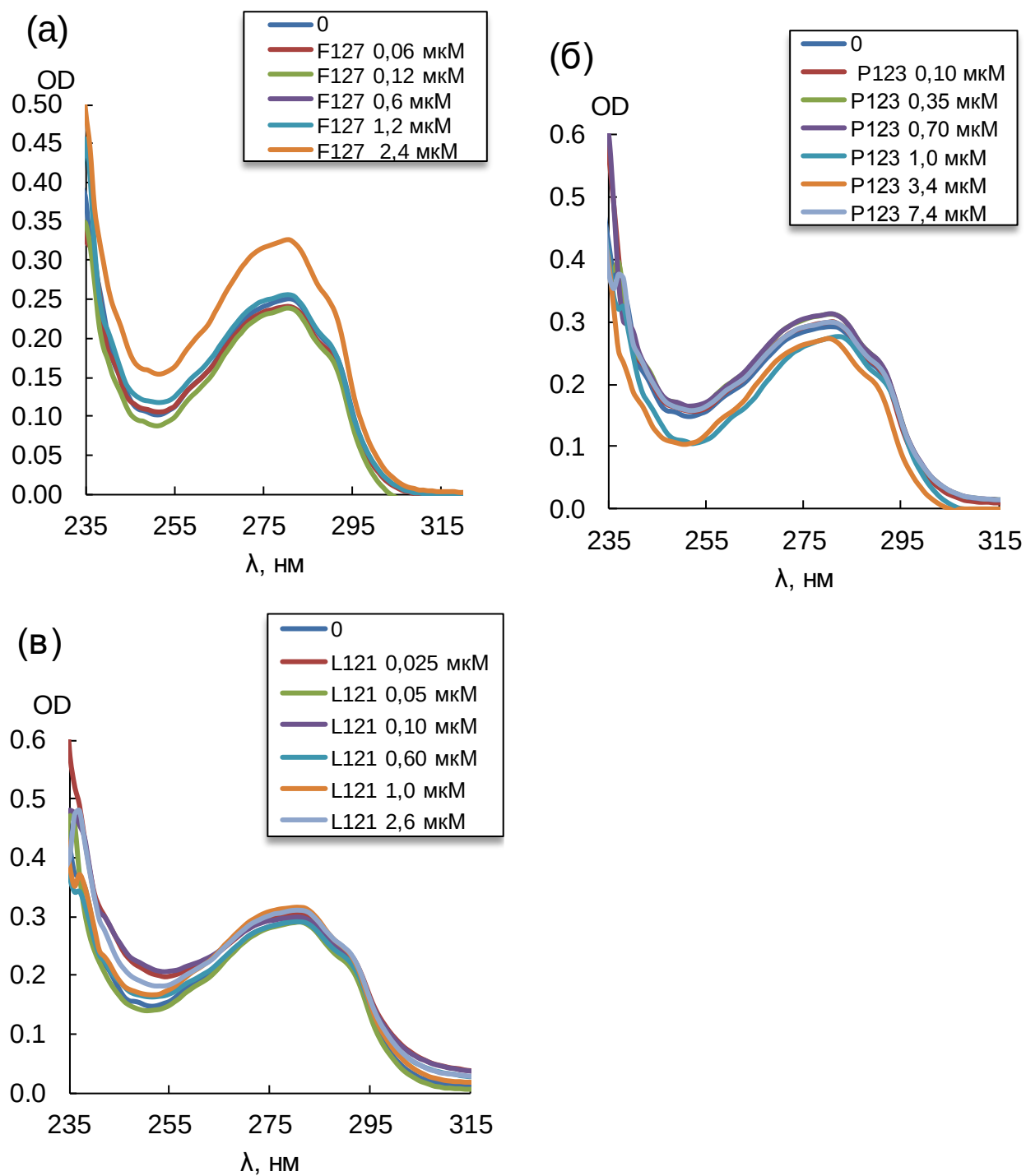


Рис. 25. Спектры оптического поглощения лизоцима (0,1 г/л) в присутствии плуроников F127 (а), P123 (б) и L121 (в). Концентрации плуроников показаны в мкМ.

На рис. 26 представлены спектры флуоресценции в виде зависимости от длины волны относительной интенсивности флуоресценции ($F/F_{\text{макс}} \times 100\%$, где $F_{\text{макс}}$ – интенсивность флуоресценции лизоцима в отсутствие плуроников). Показано, что интенсивность флуоресценции значительно возрастает в присутствии плуроников. Наибольшее увеличение флуоресценции (более чем на 40%) наблюдается в присутствии плуроника P123, кроме того происходит незначительный (~ 2 нм) сдвиг в синюю область спектра. В присутствии плуроника F127 эффект выражен в меньшей степени. В присутствии плуроников P123 и F127 интенсивность флуоресценции увеличивается в области низких концентраций, достигая наибольшего значения в области, соответствующей 0,5 ККМ, затем происходит ее снижение, после чего интенсивность флуоресценции снова увеличивается в области ККМ. В присутствии плуроника L121 эффект не такой сильный, как в присутствии плуроников P123 и F127, имеющих большую длину цепей ПЭО по сравнению с плуроником L121. В литературе описано увеличение флуоресценции лизоцима в присутствии мономерного этиленгликоля, в то время как в присутствии ПЭГ наблюдается как рост, так и уменьшение флуоресценции [119].

Флуоресценция белков обусловлена присутствием в их структуре ароматических аминокислот – триптофана, тирозина и пролина, основной вклад в собственную флуоресценцию белка вносит триптофан. В глобуле лизоцима присутствуют шесть остатков триптофана, при этом три остатка, Trp62, Trp63 и Trp108, расположены в активном центре фермента и участвуют в связывании субстрата, два остатка, Trp28 и Trp111, расположены во внутренней гидрофобной области и менее подвержены влиянию растворителя, а последний остаток, Trp12, расположен на внешней стороне глобулы фермента [187]. Почти 80% флуоресценции лизоцима обусловлено флуоресценцией Trp62 и Trp108, в то время как флуоресценция Trp63, Trp111 и Trp123 гасится из-за наличия рядом дисульфидных связей Cys76-Cys94 и Cys6-Cys127 [391]. Чистый триптофан в водном растворе имеет пик флуоресценции на длине волны 360 нм [392].

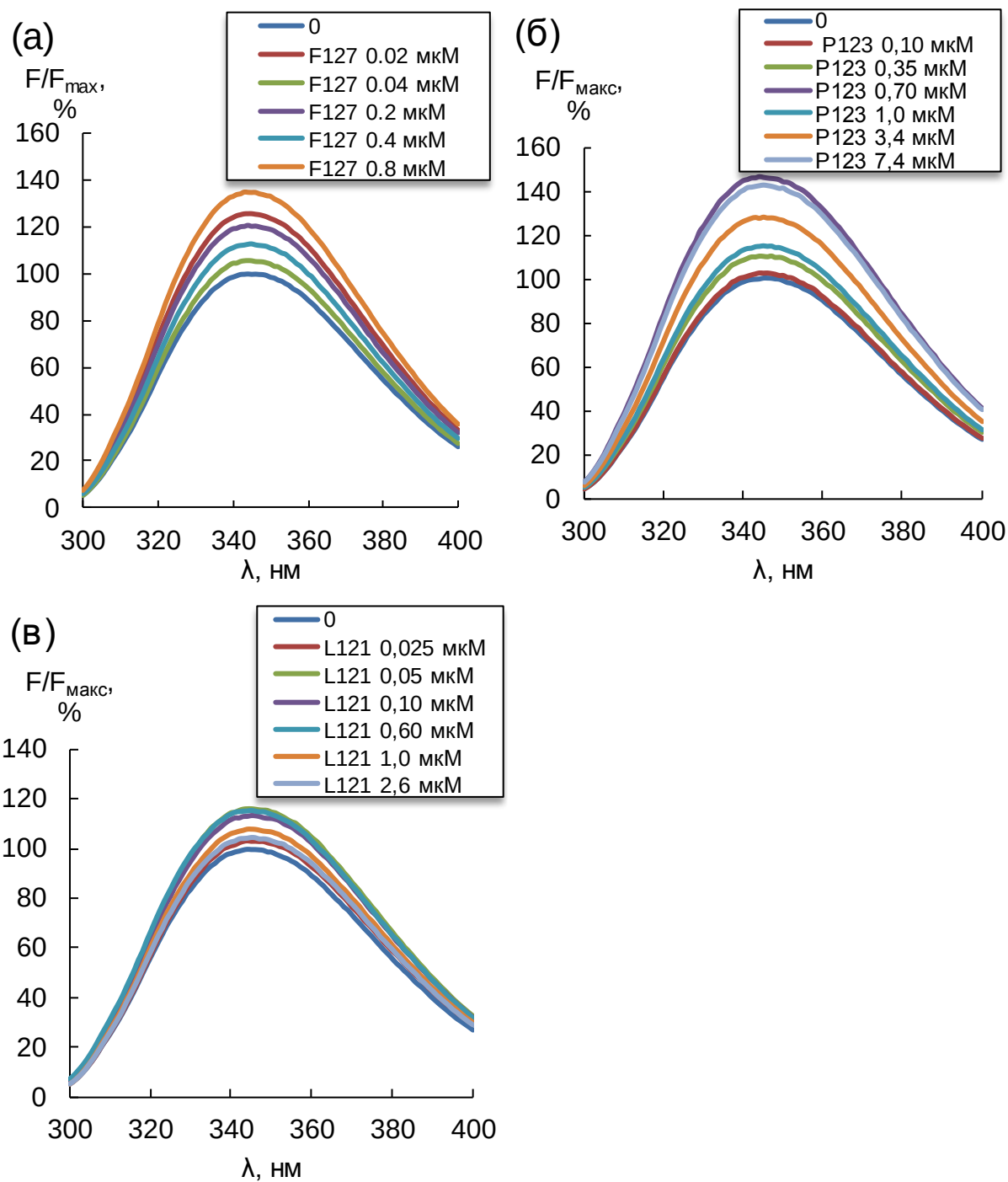


Рис. 26. Спектры флуоресценции при длине волны возбуждающего света 280 нм лизоцима (0,1 г/л) в присутствии плуроников F127 (а), P123 (б) и L121 (в). Концентрации плуроников показаны в мкМ.

Наблюдаемое увеличение флуоресценции коррелирует с данными литературы: увеличение флуоресценции в присутствии ПЭГ происходит у лизоцима [119], ЧСА [156, 120], β -циклодекстрингликозилтрансферазы [130], амилазы [129], рекомбинантной креатинкиназы [393], трипсиногена [394]. Уменьшение плотности микроокружения триптофана приводит к увеличению интенсивности флуоресценции и смещению пика флуоресценции белка в сторону пика флуоресценции чистого триптофана [395]. Другие источники, наоборот, связывают увеличение интенсивности флуоресценции с стабилизацией структуры белка из-за эффекта молекулярного краудинга, увеличением гидрофобных взаимодействий между ароматическими аминокислотами белка или уменьшением локальной полярности растворителя, из-за вытеснения молекул растворителя цепями ПЭО [119, 129, 394]. Поэтому наблюдаемое увеличение интенсивности флуоресценции лизоцима в присутствии плуроников согласуется с высказанным ранее предположением о вытеснении молекул воды цепями ПЭО и взаимодействии цепей ПЭО с остатками белка посредством водородных и вандерваальсовых взаимодействий, при этом эффект возрастает с увеличением длины цепи, поэтому плуроники P123 и F127 способствуют большему увеличению интенсивности флуоресценции.

Данные флуоресценции были использованы для вычисления константы ассоциации по модели, описанной в литературе [396]. В случае низких концентраций при взаимодействии белка с лигандом формируется комплекс белок-лиганд 1:1:



$$K = \frac{[\text{белок} - \text{лиганд}]}{[\text{белок}][\text{лиганд}]} \quad (15)$$

Константа равновесия может быть также выражена следующим уравнением:

$$K = \frac{[\text{белок} - \text{лиганд}]}{([\text{белок}]_0 - [\text{белок} - \text{лиганд}])([\text{лиганд}]_0 - [\text{белок} - \text{лиганд}])} \quad (16)$$

В приведённом уравнении $[\text{белок}]_0$ и $[\text{лиганд}]_0$ – начальные концентрации белка и лиганда, $[\text{белок-лиганд}]$ – концентрация комплекса белок-лиганд. Интенсивность флуоресценции белка в присутствии и отсутствии лигандов пропорциональна концентрациям:

$$\frac{[\text{белок} - \text{лиганд}]}{[\text{белок}]_0} = \frac{I_0 - I}{I_0 - I_1} \quad (17)$$

где I_0 – флуоресценция белка в отсутствии лиганда, I_1 – флуоресценция белка в составе комплекса, I – флуоресценция белка в присутствии заданной концентрации лиганда. Комбинация уравнений даёт выражение вида:

$$\frac{1}{I - I_0} = \frac{1}{K(I_1 - I_0)} \frac{1}{[\text{лиганд}]_0} + \frac{1}{I_1 - I_0} \quad (18)$$

Данное уравнение может преобразовано к виду:

$$I = \frac{I_0 + K[\text{лиганд}]_0}{1 + K[\text{лиганд}]_0} \quad (19)$$

Полученные значения константы связывания лизоцима с плюронидами F127, P123 и L121 составляют соответственно $(6,7 \pm 3,4) \times 10^6$, $(6,7 \pm 3,4) \times 10^6$, $(1,1 \pm 0,9) \times 10^6$ л/моль. Свободная энергия Гиббса G , вычисленная из значений константы равновесия, составляет -39, -33 и -34 кДж/моль для плюроидов F127, P123 и L121 соответственно. Полученные значения энергии Гиббса для плюроида P123 коррелируют с данными о взаимодействии плюроида P123 с БСА [97], что указывает на уместность используемой модели [396].

На основании полученных данных флуоресцентного анализа и спектрофотометрии можно сделать вывод о том, что связывание плюроида с лизоцимом меняет микроокружение остатков флуорофоров, но при этом структура белка сохраняется даже при концентрации, близкой к ККМ, что следует из данных спектроскопии КД и малоуглового рентгеновского рассеяния. Поскольку остатки триптофана, который вносит основной вклад в собственную флуоресценцию белка, участвуют в связывании субстрата, участвующего в ферментативной реакции, следующим шагом было исследование того, как связывание с плюроидами влияет на ферментативную активность лизоцима.

3.7. ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИЗОЦИМА В СОСТАВЕ КОМПЛЕКСОВ С ПЛЮРОНИДАМИ

Исследование влияния плюроидов и Бридж-35 на лизоцим включало измерение ферментативной активности по отношению к субстрату

(лиофилизированным клеткам *Micrococcus luteus*) – после инкубации лизоцима в присутствии плуроников или Бридж-35 в течение 24 ч.

Предварительно было исследовано, как лизоцим и выбранные НПАВ по отдельности взаимодействуют с суспензией клеток. Установлено, что НПАВ не влияют на фоновое изменение оптической плотности во времени и соответственно на фоновый лизис. Добавление лизоцима к суспензии бактерий приводит к значительному уменьшению оптической плотности суспензии в течение пяти минут. Зависимость бактериолитической активности лизоцима (dA/dt) от концентрации приведена на рис. 27. В исследуемой области концентраций лизоцима скорость лизиса прямо пропорциональна концентрации фермента ($v = 0,19 \times [E]$, $R^2 = 0,97$), т.е. ферментативный процесс является скоростью-лимитирующей стадией лизиса.

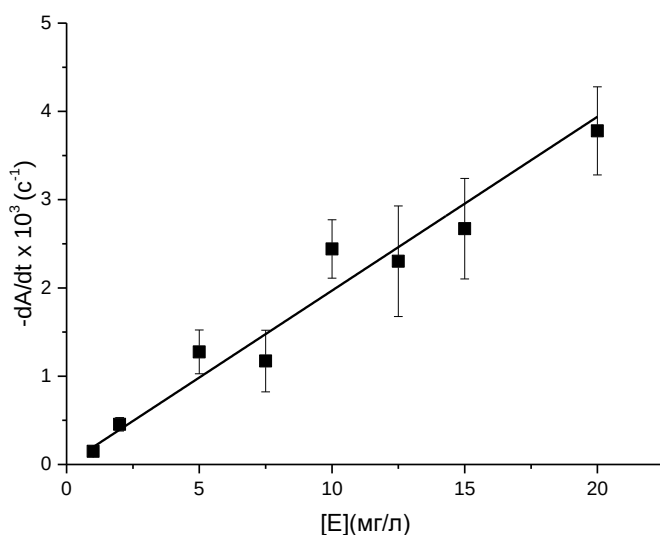


Рис. 27. Зависимость скорости лизиса клеток *M. luteus* при 37 °С от концентрации лизоцима в кювете ($n = 3$, $P = 0,9$).

На рис. 28 приведена зависимость ферментативной активности от продолжительности инкубации в присутствии плуроника.

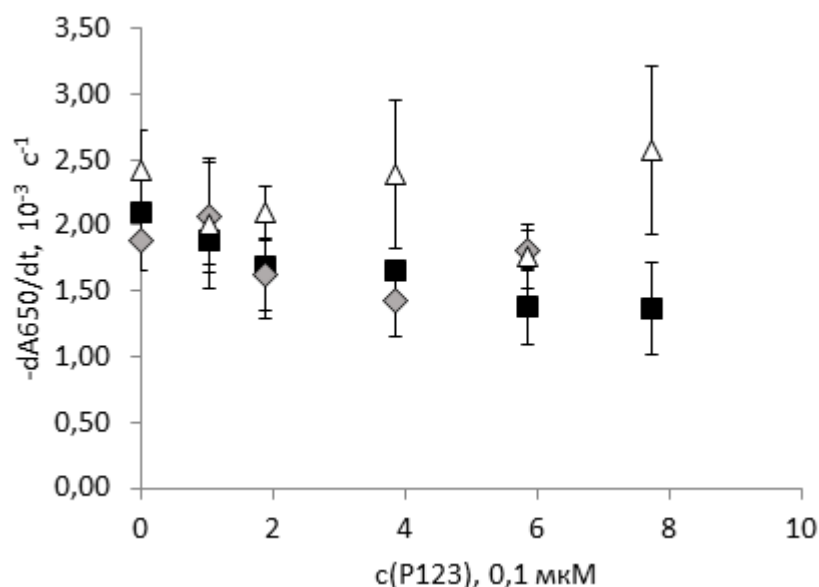


Рис. 28. Значения бактериолитической активности 0,5 г/л лизоцима при 37 °С после инкубации в присутствии плуроника P123 в течение 1 ч (треугольники), в течение 24 ч (ромбы) и в течение 48 ч (квадраты).

В момент приготовления смеси плуроник не оказывает влияния на активность лизоцима. После инкубирования смеси в течение суток наблюдается снижение ферментативной активности лизоцима.

На рис. 29 приведена зависимость относительной бактериолитической активности лизоцима (Ω): активности лизоцима в присутствии НПАВ к активности лизоцима от концентрации НПАВ. Концентрация белка в кювете составляла 0,01 г/л. Бактериолитическая активность в отсутствие НПАВ составляла $(2,2 \pm 0,2) \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$.

$$\Omega = \frac{dA_{650}(\text{лизоцим} + \text{НПАВ})/dt}{dA_{650}(\text{лизоцим})/dt} \quad (19)$$

Показано, что плуроники и Бридж-35 вызывают уменьшение бактериолитической активности лизоцима.

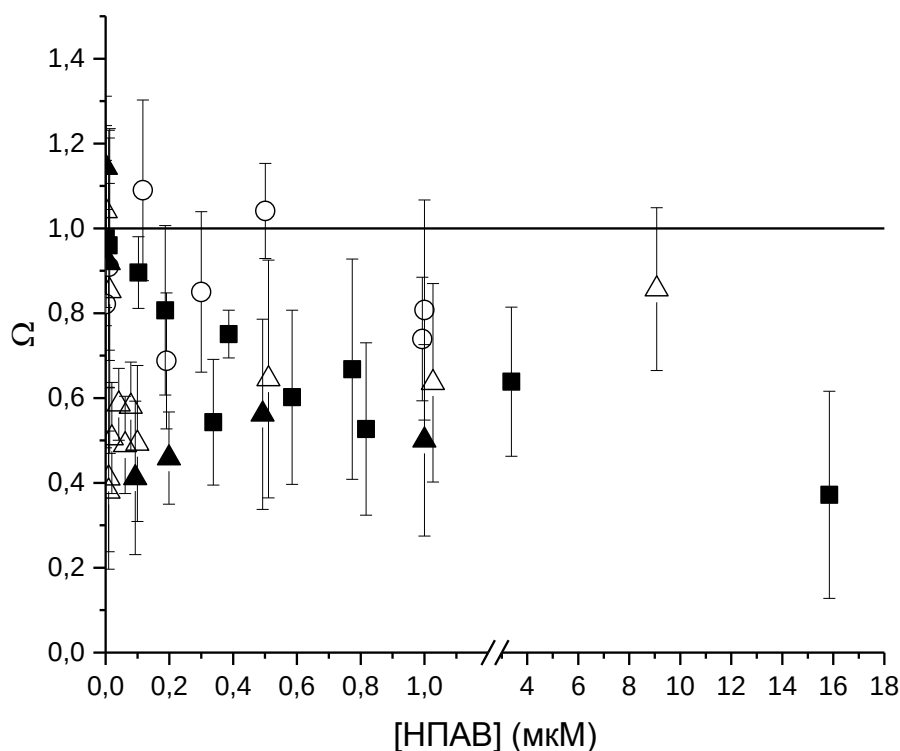


Рис. 29. Зависимость относительной активности лизоцима от концентрации НПАВ ($n = 3$, $P = 0,9$) после предварительной инкубации в течение 24 ч лизоцима в присутствии плуроников P123 (■), F127 (○) и L121 (▲), а также Бридж-35 (Δ). Прямая линия показывает значение бактериолитической активности лизоцима в отсутствие НПАВ.

Бридж-35 при концентрации около 0,1 мкМ уменьшает активность лизоцима более чем в два раза. При больших концентрациях эффект менее выражен. При концентрации Бридж-35 около 10 мкМ активность фермента близка к значениям в отсутствие НПАВ, что может быть объяснено. Похожий эффект наблюдается при добавлении плуроника L121. В области концентраций до 0,1 мкМ относительная активность лизоцима в присутствии плуроника L121 составляет около 40%. При больших концентрациях относительная активность лизоцима в присутствии L121 была равна примерно 60%. Восстановление ферментативной активности при увеличении концентрации плуроника L121 может быть объяснено тем, что с увеличением концентрации плуроник L121 агрегирует и в меньшей степени взаимодействует с белком. При добавлении P123 активность фермента уменьшается во всей исследуемой области концентраций плуроника, и при концентрации плуроника 1 мкМ относительная активность составляет около 60%. С увеличением концентрации плуроника относительная активность продолжает уменьшаться и

достигает значений около 40% при концентрации выше 10 мкМ. Плуороник F127 вызывает небольшое уменьшение бактериолитической активности лизоцима, эффект не зависит от концентрации плуороника. При концентрации около 1 мкМ относительная активность лизоцима составляет примерно 80%. Таким образом, эффект НПАВ на активность лизоцима увеличивается с уменьшением длины цепи ПЭО в ряду: F127 < P123 < L121 $\approx$ Бридж-35.

Полученные данные входят в кажущееся противоречие с полученными ранее результатами, согласно которым влияние плуороников на лизоцим усиливается с увеличением длины цепи ПЭО. Это может быть объяснено тем, что короткие цепи ПЭО плуороника L121 легче проникают во внутреннюю полость фермента, препятствуя взаимодействию фермента и субстрата, чем длинные цепи плуороника P123 и F127.

Наблюдаемое уменьшение активности лизоцима в присутствии плуороников и Бридж-35 согласуется с данными, описанными в литературе. Бактериолитическая активность лизоцима уменьшается в присутствии ЭГ и ПЭГ [119]. Добавки ПЭГ приводят к снижению активности некоторых других ферментов: химотрипсина [118], пуриннуклеозидфосфорилазы [143], нерибосомной энтеробактинсинтетазы [144], каталитической уреазы [145]. Описано уменьшение бактериолитической активности лизоцима в составе конъюгатов с плуороником F127, однако следует принимать во внимание, что речь идёт об уменьшении активности фермента после ковалентного присоединения плуороника к белку и адсорбции образующихся конъюгатов на твёрдой поверхности [397].

Данные спектрофотометрии и флуоресцентного анализа указывают на изменение микроокружения остатков триптофана, расположенных в активном центре фермента. Это может быть вызвано тем, что молекулы плуороников и Бридж-35 взаимодействуют с аминокислотами в активном центре фермента, «раздвигая» глобулу фермента, и (или) с аминокислотами на поверхности глобулы белка, уменьшая её компактность. Наблюдаемое снижение активности лизоцима подтверждает связывание плуороников и Бридж-35 с аминокислотами во внутренней полости фермента и (или) с аминокислотами, расположенными у входа во внутреннюю полость фермента, в результате чего молекулы НПАВ создают стерические затруднения для связывания субстрата с активным центром фермента.

Активный центр фермента образован остатками Glu-35 и Asp-52, в то время как расположенные в активном центре фермента остатки аминокислот Trp-62, Trp-63, Asp-101, Trp-108 участвуют в связывании субстрата [187]. В научной литературе сообщается о наличии гидрофобных взаимодействий между этиленоксидными звеньями полиэтиленгликоля и аминокислотами активного центра лизоцима, при этом наиболее сильное взаимодействие характерно для остатков триптофана (Trp-62 и Trp-63) и аргинина (Arg-61 и Arg-73) [123].

Наличие взаимодействий между плюронином и белком не является единственным фактором, влияющим на уменьшение ферментативной активности. Подобно тому, как вытеснение белка с границы раздела фаз может быть обусловлено стерическим барьером, создаваемым адсорбированным на границе раздела фаз плюронином, и образованием комплексов лизоцима с плюронином, уменьшение ферментативной активности лизоцима может быть связано с наличием взаимодействий не только между ферментом и плюронином, но и между субстратом и плюронином, как это было показано для ПЭГ [398]. В состав N-ацетилмурамовой кислоты пептидогликана клеточной стенки *M. luteus* входят остатки гидрофобных аминокислот D- и L-аланина [399], которые могут вступать в гидрофобные взаимодействия с этиленоксидом [400] [155].

Для установления возможности плюроника связываться с поверхностью клеток *M.luteus* провели адсорбционный эксперимент с использованием меченного тритием плюроника P123. Для этого раствор меченного тритием плюроника добавляли к клеткам, выдерживали в течение пяти минут, затем центрифугировали, декантировали клетки, отмывали их от остаточного плюроника и измеряли радиоактивность.

На рис. 30 показана изотерма адсорбции плюроника P123 на клетках в присутствии и в отсутствие лизоцима. С ростом концентрации плюроника в растворе происходило увеличение адсорбции на клетках с выходом на насыщение при концентрации 1 мкМ. Значения адсорбции оказались одинаковыми в экспериментах без лизоцима и с ним. Полученные данные показывают связывание плюроника P123 с клетками, которое может оказывать дополнительное влияние на уменьшение бактериолитической активности лизоцима в присутствии плюроника, однако оно не может являться основной причиной уменьшения активности лизоцима в

присутствии плуроника, поскольку на степень уменьшения ферментативной активности оказывает влияние время выдерживания лизоцима в присутствии плуроника, как показано на рис 27.

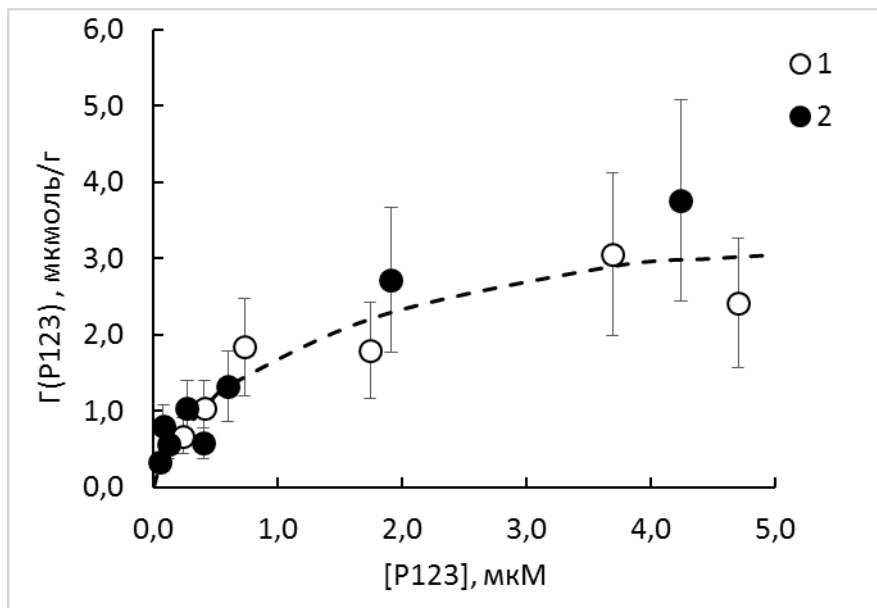


Рис. 30. Адсорбция плуроника P123 на 0,15 мг клеток *M. luteus* в отсутствие (1) и в присутствии 0,5 г/л лизоцима (2).

На уменьшение ферментативной активности может оказывать влияние эффект «исключённого объёма» и вытеснение молекул растворителя плурониками, тем более что молекулы воды участвуют в каталитической реакции. Соотношение перечисленных факторов определяет изменение ферментативной активности в присутствии плуроника. То, что наибольшее влияние оказывает плуроник с короткой цепью ПЭО, которой проще проникнуть во внутреннюю полость фермента, даёт основание предположить, что основную роль в уменьшении ферментативной активности играет связывание плуроника с активным центром лизоцима.

Было также исследовано влияние плуроника P123 на кинетические параметры ферментативной реакции. Показано, что скорость реакции, катализируемой лизоцимом в отсутствие плуроника, изменяется согласно гиперболической зависимости Михаэлиса—Ментен (рис. 31).

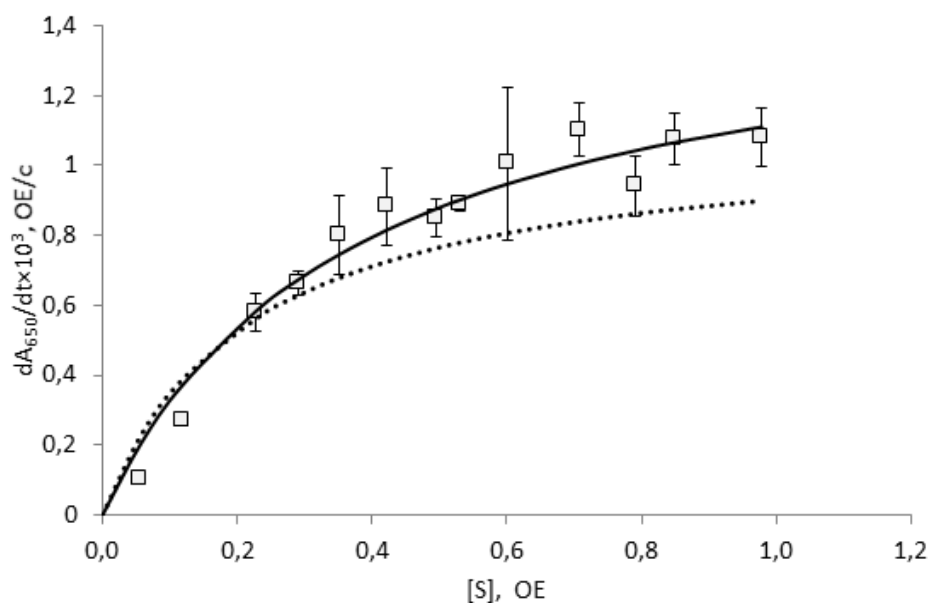


Рис. 31. Зависимость скорости лизиса клеток *M. luteus* при 37 °С от концентрации субстрата для лизоцима. Линиями показаны рассчитанные значения ферментативной активности с использованием кинетических параметров: пунктирной линией – значения, полученные в OriginPro при аппроксимации уравнением Михаэлиса-Ментен ($r = 0,984$), сплошной линией – полученные по методу линеаризации Лайнуивера-Берка ($r = 0,938$).

При аппроксимации уравнением Михаэлиса-Ментен зависимости скорости лизиса клеток *M. luteus* от концентрации субстрата для лизоцима с помощью программного пакета OriginPro получены значения константы Михаэлиса и каталитической константы: $K_M = 0,22$ OE или $90,6 \text{ мг} \times \text{л}^{-1}$, $k_{cat} = 3,16 \times 10^3 \text{ OE} \times \text{с}^{-1} \times \text{М}^{-1}$ или $1,31 \times 10^6 \text{ мг} \times \text{л}^{-1} \times \text{с}^{-1} \times \text{М}^{-1}$ ($r=0,984$). Значение константы Михаэлиса, характеризующей сродство фермента и субстрата, является близким к значениям, приведённым в литературе и для реакции лизоцима с *M. luteus* в 0,01 М натрий-фосфатном буфере с pH 7,4 при 20 °С при [119, 401]. Значение каталитической константы, характеризующей скорость реакции, отличается от литературных данных из-за различия в условиях (ионная сила, температура). При использовании метода линеаризации полученные значения кинетических параметров составляют: $K_M = 0,36$ OE и $k_{cat} = 3,16 \times 10^3 \text{ OE} \times \text{с}^{-1} \times \text{М}^{-1}$ ($r=0,938$).

В присутствии плюроники P123 наблюдается отклонение от кинетики Михаэлиса-Ментен (рис. 32 – 35). С увеличением концентрации субстрата до 0,15 г/л скорость ферментативной реакции возрастает, в области концентрации 0,15–

0,25 г/л – скорость реакции достигает постоянных значений, а при дальнейшем увеличении концентрации субстрата – снова возрастает до значений, больших чем активность лизоцима без плуроника. Вид кривой воспроизводится при любых концентрациях плуроника в диапазоне от 1 до 10 мМ, точки «перегиба» находятся при одних и тех же концентрациях субстрата.

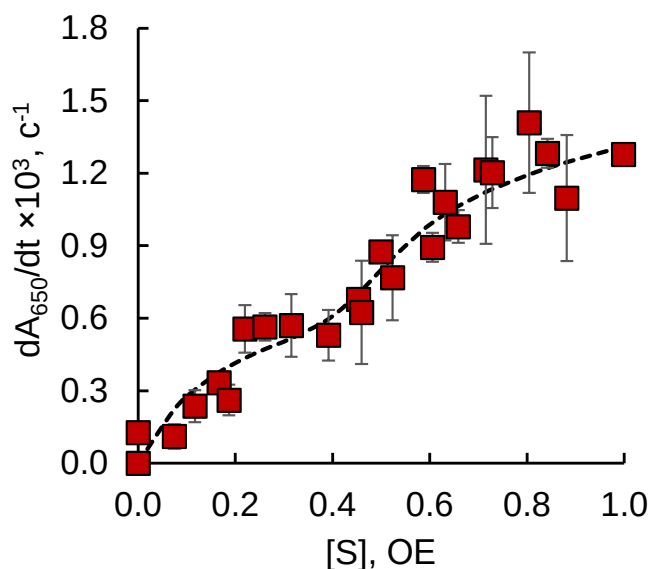


Рис. 32. Зависимость скорости лизиса клеток *M. luteus* при 37 °С от концентрации субстрата в присутствии 1 мкМ плуроника Р123. Пунктирной линией показано рассчитанное значение ферментативной активности ($r = 0,970$).

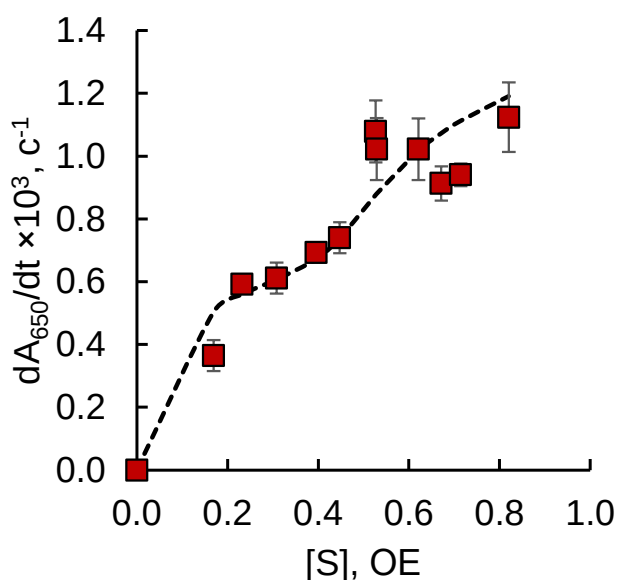


Рис. 33. Зависимость скорости лизиса клеток *M. luteus* при 37 °С от концентрации субстрата в присутствии 3 мкМ плуроника Р123. Пунктирной линией показано рассчитанное значение ферментативной активности ($r = 0,975$).

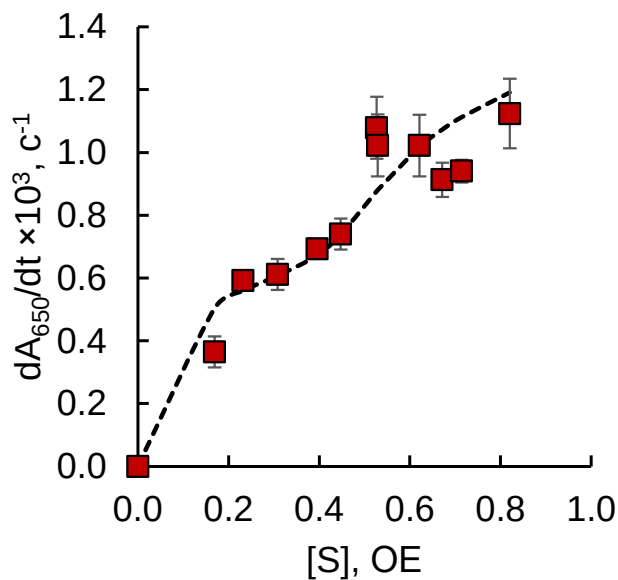


Рис. 34. Зависимость скорости лизиса клеток *M. luteus* при 37 °С от концентрации субстрата в присутствии 7 мкМ плуроника Р123. Пунктирной линией показано рассчитанное значение ферментативной активности ($r = 0,943$)

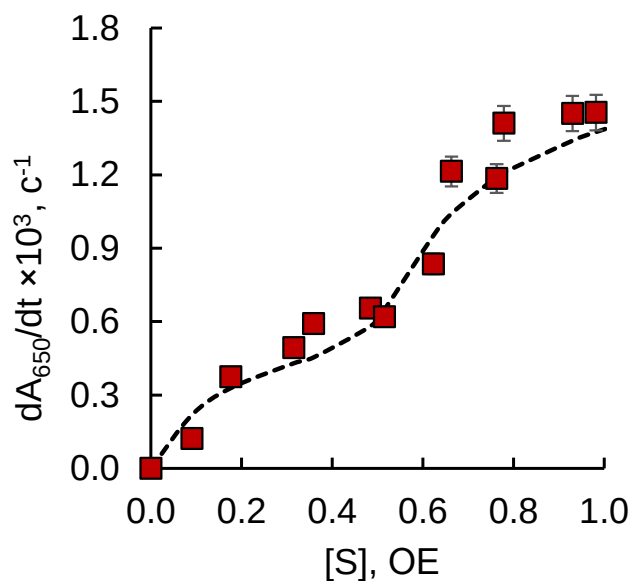


Рис. 35. Зависимость скорости лизиса клеток *M. luteus* при 37 °С от концентрации субстрата в присутствии 10 мкМ плуроника Р123. Пунктирной линией показано рассчитанное значение ферментативной активности ($r = 0,980$).

Похожие случаи отклонения от кинетики Михаэлиса-Ментен и появление второго плато на графике зависимости скорости реакции от концентрации субстрата объясняют тем, что некоторые ферменты под влиянием субстрата или других лигандов могут испытывать структурные превращения, которые приводят к изменению каталитических свойств их активных центров [402] [403]. В таких случаях кинетика ферментативных реакций описывается не уравнением Михаэлиса-Ментен, а более сложными выражениями, из которых наиболее известным является уравнение Хилла [404]

$$v = \frac{V_M [S]_0^n}{([S]_{0,5}^n + [S]_0^n)} \quad (20)$$

где v – скорость ферментативной реакции, V_M – предельное значение скорости реакции при концентрации субстрата $[S] \rightarrow \infty$, $[S]_{0,5}$ – концентрация субстрата при $v = V_M/2$, а n – коэффициент Хилла.

Предположим, что белковый комплекс E под влиянием субстрата S претерпевает обратимое превращение в фермент-субстратный комплекс ES_n за счёт присоединения молекул субстрата к активному центру фермента. Обе формы – E и ES_n – обладают каталитической активностью, которая характеризуется V и K_M , и кинетические параметры для ES_n отличаются от параметров для E из-за структурных изменений в активном центре фермента. При условии, что $[S]_0 \gg [E]_0$, доля фермента, который находится в той или иной конформации, будет определяться отношениями вида [403]:

$$g_1 = \frac{[E]}{[E]_0} = \frac{K_D}{K_D + [S]_0^n} \quad (21)$$

$$g_2 = 1 - g_1 = \frac{[ES_n]}{[E]_0} = \frac{[S]_0^n}{K_D + [S]_0^n} \quad (22)$$

Где K_D – константа диссоциации комплекса ES_n . В этом случае суммарную скорость ферментативной реакции можно представить в виде:

$$v = V_M^{(1)} g_1 \frac{[S]_0}{K_M^{(1)} + [S]_0} + V_M^{(2)} g_2 \frac{[S]_0}{K_M^{(2)} + [S]_0} = g_1 v_1 + g_2 v_2 \quad (23)$$

где $K_M^{(i)}$ и $V_M^{(i)}$ – константа Михаэлиса-Ментен и предельная скорость i -ой формы фермента. На графике зависимости скорости лизиса от концентрации субстрата в обратных координатах линейные участки должны соответствовать областям

преимущественного существования одного вида комплексов, а нелинейные – их смеси с сопоставимыми вкладами в ферментативную активность. Следует подчеркнуть, что предложенная модель (модель обобщённого уравнения Хилла) отличается от модели одновременного взаимодействия двух ферментов или фермента с двумя каталитическими центрами с одним субстратом [405], поскольку в первом случае образование второго каталитически активного центра зависит от концентрации субстрата.

Для лизоцима подобное отклонение от кинетики Михаэлиса-Ментен наблюдается только в присутствии плюроника P123. Можно предположить, что в результате связывания плюроника с ферментом (обозначим как E_0) происходит изменение третичной структуры и, как следствие, каталитических свойств лизоцима. Образовавшийся комплекс лизоцим—плюроник обозначим как E_1 . При одновременном связывании плюроника и субстрата с лизоцимом происходит образование нового комплекса состава белок—субстрат—плюроник (обозначим как E_2), в активном центре лизоцима происходят структурные изменения, приводящие к изменению его каталитических свойств.

При низких и высоких концентрациях субстрата в присутствии плюроника фермент находится преимущественно в виде одной из форм (E_1 или E_2). В области малых концентраций субстрата $[S]_0^n \ll K$, в этом случае $g_1 \approx K/K = 1$, и $g_2 = 1 - g_1 = 0$. В этом случае скорость ферментативной реакции сводится к уравнению Михаэлиса-Ментен:

$$v = V_M^{(1)} \frac{[S]_0}{K_M^{(1)} + [S]_0} \quad (24)$$

Для области низких концентраций субстрата кинетические параметры были получены с помощью линеаризации уравнения по методу Лайнуивера-Берка. Для описания всей кривой вместе с переходной областью нужна уже полная формула. Приблизительные значения $K_M^{(1)}$ и $V_M^{(1)}$ были использованы, чтобы подобрать значения $K_M^{(2)}$, $V_M^{(2)}$, K_D и n , которые давали бы наименьшее отклонение для полной кривой. Полученные значения приведены в таблице 9. Расчёты показывают, что в присутствии плюроника P123 лизоцим связывается более чем с восемью лигандами, а не шесть, как описано в литературе [188], что подтверждает высказанные ранее

предположения о изменении микроокружения активного центра фермента из-за связывания с плюроником. Полученные значения $K_M^{(1)}$ и $V_M^{(1)}$ близки к значениям K_M и V_M в отсутствие P123, а $K_M^{(2)}$ и $V_M^{(2)}$ превышают значения K_M и V_M в 2 и 3-4 раза соответственно. Увеличение константы Михаэлиса говорит об уменьшении сродства фермента к субстрату, которое вызвано взаимодействием плюроника с лизоцимом. На рис. 32-35 пунктирными линиями показаны значения ферментативной активности лизоцима в присутствии плюроника P123, рассчитанные с помощью полученных параметров.

Таблица 9. Параметры обобщённого уравнения для реакций лизиса, катализируемого лизоцимом в присутствии плюроника P123.

Добавление плюроника	$V_M^{(1)}$, ОЕ/с	$K_M^{(1)}$, ОЕ	$V_M^{(2)}$, О/с	$K_M^{(2)}$, ОЕ	K_D	n	r
+ 1 мкМ плюроника P123	$8,5 \times 10^{-4}$	0,20	$2,1 \times 10^{-3}$	0,65	0,003	8	0,970
+ 3 мкМ плюроника P123	$8,0 \times 10^{-4}$	0,15	$2,0 \times 10^{-3}$	0,55	0,003	8	0,975
+ 7 мкМ плюроника P123	$7,0 \times 10^{-4}$	0,15	$2,5 \times 10^{-3}$	0,55	0,003	8	0,943
+ 10 мкМ плюроника P123	$7,0 \times 10^{-4}$	0,20	$2,5 \times 10^{-3}$	0,80	0,003	10	0,980

Таким образом, можно сделать вывод о переходе комплекса лизоцим-плюроник от одного состояния к другому при критической концентрации субстрата. При переходе комплекса происходит изменение структуры активного центра фермента, сопровождающееся изменением каталитических свойств.

3.8. МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИЗОЦИМА С ПЛЮРОНИКАМИ

С помощью сочетания радиохимических и спектроскопических методов было проведено исследование механизмов связывания между лизоцимом и плюрониками. Образование комплексов лизоцима с плюрониками является термодинамически выгодным процессом. В составе комплексов лизоцим сохраняет вторичную структуру (как показывают данные спектроскопии КД и SAXS), а данные флуоресцентного анализа и спектрофотометрии указывают на изменения в

локальном окружении остатков флуорофорных аминокислот. Связывание лизоцима с плюрониками приводит к изменению его ферментативных свойств.

Для определения положения взаимного расположения лизоцима и плюроники в составе комплексов были использованы методы компьютерного моделирования. Структура плюроника была оптимизирована в силовом поле AMBER с помощью программного обеспечение Нех. Структура лизоцима была взята из PDB (6LYZ), которая хорошо согласуется с данными SAXS, как показано на рис. 27. Влияние молекул воды не учитывалось. На рис. 29 показаны результаты моделирования. Остатки фенилаланина и пролина показаны фиолетовым и зелёным цветом соответственно.

При помощи Нех были рассчитаны энергия взаимодействия и показатель стерической комплементарности – вклад неэлектростатических сил в общую энергию взаимодействия белка с лигандом. Согласно данным литературы [406] общая энергия взаимодействия E_{total} складывается из энергии электростатических взаимодействий E и показателя стерической комплементарности $K_H S$.

$$E_{total} = \left(\frac{1391,4}{K_R} \right) E + K_H S \quad (25)$$

где K_R – это относительная диэлектрическая проницаемость, безразмерная величина, K_H – фактор свободной гидрофобной энергии, выраженный в кДж/(моль×Å³). Электростатическая энергия вычисляется как внутренняя энергия покоящихся заряженных частиц. Стерическая комплементарность S взаимодействия двух молекул А и В вычисляется из характеристик «двойного слоя» белка и лиганда – пространственного соотношения молекулярной поверхности и доступной поверхности белка и лиганда.

Значения энергии взаимодействия и показателя стерической комплементарности связывания лизоцима с плюрониками представлены в таблице 11, полученные значения и указывают на стабильные и хорошо совпадающие по форме комплексы, образованные за счёт водородных связей. Водородные связи образованы Lys13, Arg14, Gly16, Asp18, Asn19, Tyr20, Asn93 и Leu129 в случае комплекса с F127; Arg14, Gly16, Asp18, Asn19 и Tyr20 в случае комплекса с P123; и Ser36, Thr43, Asn44, Ala122 и Asp119 в случае комплекса с L121. Т.о. плюроники связываются посредством водородных связей с 13 аминокислотами,

преимущественно с полярными незаряженными аминокислотами, которые практически все расположены на внешней стороне глобулы. Аминокислотные остатки, с которыми взаимодействуют плюроники, находятся вне α -спиральных участков за исключением Lys13 и Arg14, входящих в состав α -спирали, расположенной между 5 и 15 аминокислотными остатками [407], что согласуется с тем, что плюроники не оказывают влияние на спиральность лизоцима по данным спектроскопии КД. Взаимодействие с плюрониками затрагивает остатки аргинина и лизина, которые расположены на внешней стороне глобулы, где создают положительный заряд, участвуя в связывании субстрата [186]. Следует принимать во внимание, что расчёты не учитывают возможное участие вандерваальсовых и гидрофобных взаимодействий в связывании лизоцима с плюрониками.

Связывание плюроника L121 с остатками, расположенными около остатка Glu-35, который образует активный центр фермента [187], что коррелирует с тем, что L121 оказывает наибольший эффект на ферментативную активность и подтверждает выдвинутое предположение, что короткая цепь ПЭО более эффективно проникают во внутреннюю полость фермента. Характерно, что плюроник L121 в отличие от плюроников P123 и F127 проникает в «складку», образованную изгибом полипептидной цепи с 41 по 54 аминокислотные остатки [407].

Таблица 10. Энергия взаимодействия и показатель стерической комплементарности связывания лизоцима с плюрониками, вычисленная с помощью Nex 8.

Энергия	лизоцим- F127	лизоцим- P123	лизоцим- L121
Энергия взаимодействия	- 616,8	- 671,6	- 676,8
Показатель стерической комплементарности связывания	- 430	- 422,1	- 353,4

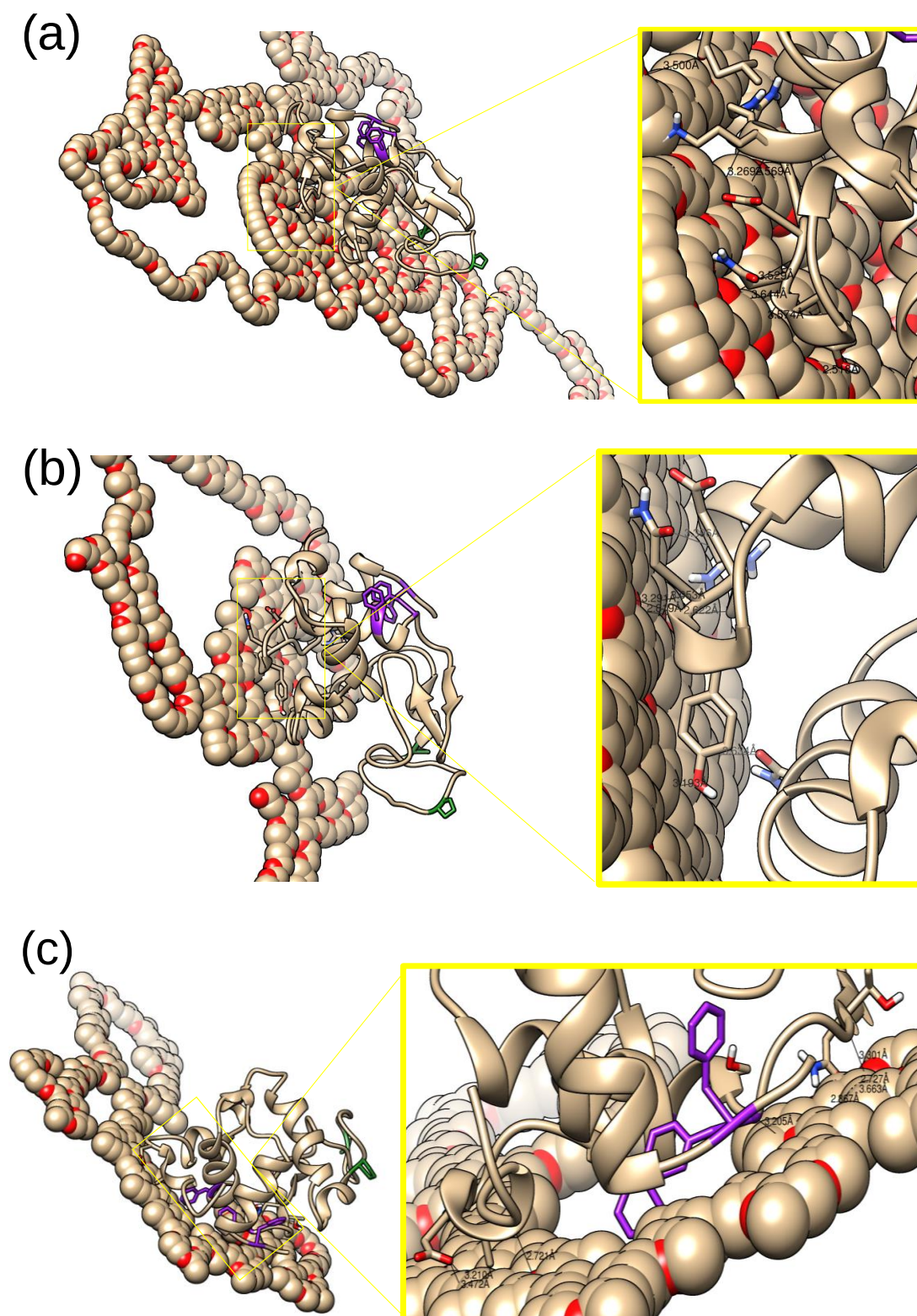


Рис. 36. Схема комплексообразования с участием лизоцима и плуроников F127 (a), P123 (b) и L121 (c).

Значения энергий, полученные с помощью компьютерного моделирования, не согласуются со значениями, которые были получены из расчётов данных флуоресцентного анализа. Одной из причин могут быть расхождения в методике расчётов, которые не учитывают влияние растворителя и ионной силы [408, 409]. При обсуждении результатов, полученных с помощью радиохимических и спектроскопических методов, было выдвинуто предположение об участии гидрофобных взаимодействий в связывании лизоцима с плюрониками, что подтверждают данные литературы [123]. Компьютерное моделирование показало образование водородных связей, которое объясняет результаты радиохимического анализа. Остатки, расположенные вблизи Phe3, Phe34 и Phe38, образуют водородные связи и обеспечивают гидрофильное окружение соответствующего участка белковой глобулы, тогда как Pro70 и Pro79 остаются в гидрофобной среде и в результате оказываются расположены на границе раздела. Взаимодействие плюроники с аминокислотами лизоцима приводит к уменьшению его ферментативной активности.

Как следует из представленных в таблице данных, показатель стерической комплементарности связывания увеличивается с уменьшением длины цепи ПЭО, а энергия взаимодействия уменьшается в ряду F127 > P123 > L121. Свободная энергия Гиббса связывания лизоцима с плюроником ниже для комплексов с плюроником F127 по сравнению с комплексами лизоцима с P123 и L121.

Результаты докинга подтверждают высказанное в предыдущих главах предположение, что связывание происходит за счёт взаимодействия белка с этиленоксидными группами. Это объясняет, почему плюроники не вытесняют полностью белок с границы раздела фаз. Более высокая концентрация белка в поверхностном слое и высокая проникающая способность адсорбционных слоёв, образованных молекулами плюроника, обеспечивают высокую удельную радиоактивность остатков аминокислот после взаимодействия с атомарным тритием.

В образовавшемся адсорбционном слое молекулы лизоцима отделены друг от друга и, как следствие, более доступны взаимодействию с атомарным тритием по сравнению с адсорбционным слоем, образованным чистым лизоцимом. При этом происходит изменение ориентации оставшегося белка (или белка в составе

комплекса белка с плюроником) из-за взаимодействия цепей ПЭО с определёнными остатками аминокислот на поверхности белковой глобулы. Полученные результаты могут внести существенный вклад в понимание структурных и функциональных особенностей более сложных систем, в том числе и биологических.

ВЫВОДЫ

I. Показано, что на межфазных границах жидкость/жидкость и жидкость/воздух, а также в объёме водной фазы посредством водородных и ван-дер-ваальсовых взаимодействий между цепями ПЭО и аминокислотными остатками происходит образование устойчивых комплексов между лизоцимом и неионогенными поверхностно-активными веществами (плурониками и Бридж-35). Образование комплексов не приводит к изменениям вторичной структуры белка, но приводит к двукратному уменьшению ферментативной активности и изменению каталитических свойств.

II. С применением метода жидкостной сцинтилляционной спектроскопии в варианте сцинтиллирующей фазы найдено, что из-за наличия взаимодействий между цепями ПЭО и молекулами белка лизоцим не полностью замещается из межфазного слоя молекулами неионогенных ПАВ вплоть до концентраций последних близких к критической концентрации мицеллообразования.

III. Из совокупности данных, полученных с помощью сцинтиллирующей фазы и тензиометрии, рассчитаны параметры межмолекулярного взаимодействия между лизоцимом и неионогенными ПАВ, с помощью которых определён состав адсорбционного слоя лизоцим-НПАВ на границе с воздухом из данных тензиометрии.

IV. При помощи обработки атомарным трением адсорбционных слоёв лизоцим-неионогенное ПАВ с последующим анализом распределения трения была показана высокая проницаемость адсорбционных слоёв неионогенных ПАВ для атомарного трения. Вследствие того, что в результате взаимодействия лизоцима с плурониками меняется водное окружение молекулы белка, радиоактивность лизоцима в составе смешанного адсорбционного слоя была выше, чем в случае свободного белка. Показано, что в смешанном адсорбционном слое лизоцим ориентирован таким образом, что аминокислотные остатки пролина направлены в сторону межфазной границы, при этом для лизоцима без ПАВ лизоцим ориентирован противоположным образом.

V. Рассчитаны значения константы связывания лизоцима с плурониками F127, P123 и L121, которые составили $(6,7 \pm 3,4) \times 10^6$, $(6,7 \pm 3,4) \times 10^6$, $(1,1 \pm 0,9) \times 10^6$ л/моль,

соответственно. Свободная энергия Гиббса комплексообразования составляет -39, -33 и -34 кДж/моль для плуроников F127, P123 и L121, соответственно.

VI. На основании результатов измерения ферментативной активности лизоцима и молекулярного докинга можно предположить, что плуроники взаимодействуют преимущественно с полярными незаряженными остатками аминокислот, расположенными на поверхности белковой глобулы, за исключением плуроника L121, короткие цепи ПЭО которого вступают во взаимодействие с аминокислотными остатками, расположенными во внутренней полости фермента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Moghimi S.M., Hunter A.C., "Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering.. Trends Biotechnol., V. 18, P.412-420, 2000.
- [2] Kabanov A.V., Alakhov V.Y., "Pluronic block copolymers in drug delivery: from micellar nanocontainers to biological response modifiers. Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., V. 19, no. 1, P.1-73, 2002.
- [3] Kabanov A. V., Chekhonin V. P., Alakhov V. Y., Batrakova E. V., Lebedev A. S., Melik-Nubarov N. S., Kabanov V. A. , "The neuroleptic activity of haloperidol increases after its solubilization in surfactant micelles.. FEBS Letters., V. 258, no. 2, P.343-345, 1989.
- [4] Danson S., Ferry D., Alakhov V., Margison J., Kerr D., Jowle D., Brampton M., Halbert G., Ranson M., "Phase I dose escalation and pharmacokinetic study of pluronic polymer-bound doxorubicin (SP1049C) in patients with advanced cancer.. British Journal of Cancer, V. 90, P.2085-2091, 2004.
- [5] Alakhov V., Klinski E., Li S., Pietrzynski G., Venne A., Batrakova E. et al., "Block copolymer-based formulation of doxorubicin. From cell screen to clinical trials.. Colloids Surf B: Biointerfaces., V. 16, no. 1-4, P.113-134, 1999.
- [6] Zhao Y., Alakhova D. Y., Kabanov A. V. , "Can nanomedicines kill cancer stem cells?. Advanced Drug Delivery Reviews., V. 65, no. 13-14, P.1763-1783, 2013.
- [7] Batrakova E. V., Kabanov A. V. , "Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers.. Journal of Controlled Release., V. 130, no. 2, P.98-106, 2008.
- [8] Guan Y., Huang J., Zuo L., Xu J., Si L., Qiu J., Li G., "Effect of pluronic P123 and F127 block copolymer on P-glycoprotein transport and CYP3A metabolism.. Arch. Pharm. Res., V. 34, P.1719-1728, 2011.
- [9] Alakhova D. Y., Rapoport N. Y., Batrakova, E. V., Timoshin A. A., Li S., Nicholls D., Kabanov A. V. Differential metabolic responses to pluronic in MDR and non-MDR cells: A novel pathway for chemosensitization of drug resistant cancers.. Journal of Controlled Release., V. 142 , p. 89–100, 2010.

- [10] Alexandridis P., Alan Hatton T. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly (ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling.. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, V. 96, no. 1-2, P.1-46, 1995.
- [11] Reeve L. E.The poloxamers: their chemistry and medical applications.. in *Handbook of Biodegradable Polymers*. By ed. Abraham J. Domb, Joseph Kost, David Wiseman., 1998, P.231-237.
- [12] Wohlfarth C., *Handbook of thermodynamic data of copolymer solutions.*, New York: CRC, 2001, p. 520.
- [13] Griffin W. C.Calculation of HLB values of non-ionic surfactants. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, V. 5, P.249-256, 1954.
- [14] Mortensen K.Structural studies of aqueous solutions of PEO - PPO - PEO triblock copolymers. *J. Physics: Condensed Matter.*, V. 8, P.A103-A124, 1996.
- [15] Allen C., Maysinger D., Eisenberg A.Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery.. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.*, V. 16, P.3-27, 1999.
- [16] Nagarajan R.Solubilization of hydrocarbons and resulting aggregate shape transitions in aqueous solutions of pluronic (PEO – PPO – PEO) block copolymers. *Coll. Surf. B: Biointerf.*, V. 16, P.55-72, 1999.
- [17] Nakashima K., Bahadur P.Aggregation of water-soluble block copolymers in aqueous solutions: Recent trends. *Advances in Colloid and Interface Science.*, V. 123, P.75-96, 2006.
- [18] Oh K.T., Bronich T.K., Kabanov A.V. Micellar formulations for drug delivery based on mixtures of hydrophobic and hydrophilic Pluronic block copolymers. *J. Controlled Release*, V. 94, P.411-422, 2004.
- [19] Kabanov A., Nazarova I., Astafieva I., Batrakova E., Alakhov V., Yaroslavov A., Kabanov V. Micelle formation and solubilization of fluorescent probes in poly(oxyethylene-b-oxypropylene-b-oxyethylene) solutions. *Macromolecules*, V. 28, P.2303-2314, 1995.

- [20] Rapoport N. Stabilization and activation of Pluronic micelles for tumor-targeted drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.*, V. 16, P.93-111, 1999.
- [21] Liu Y., Chen S.-H., Huang J. S. Light-Scattering Studies of Concentrated Copolymer Micellar Solutions. *Macromolecules*, V. 31, no. 18, P.6226-6233, 1998.
- [22] Wu G., Chu B., Schneider D. K. SANS Study of the Micellar Structure of PEO/PPO/PEO Aqueous Solution.. *J. Phys. Chem.*, V. 99, no. 14, P.5094-5101, 1995.
- [23] Champion J.A., Mitragotri S. Role of target geometry in phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, V. 103, P.4930-4934, 2006.
- [24] Mitragotri S., Lahann J. Physical approaches to biomaterial design. *Nat. Mater.*, V. 8, P.15-23, 2009.
- [25] Schillen K., Bryskhe K., Mel'nikova Y. S. Vesicles formed from a poly(ethylene oxide)–poly(propylene oxide)–poly(ethylene oxide) triblock copolymer in dilute aqueous solution. *Macromolecules*, V. 32, P.6885-6888, 1999.
- [26] Bryskhe K., Jansson J., Topgaard D., Schillén K., Olsson U. Spontaneous Vesicle Formation in a Block Copolymer System. *J. Phys. Chem. B.*, V. 108 (28), P.9710-9719, 2004.
- [27] Chen S., Yang B., Guo C., Ma J.-H., Yang L.-R., Liang X. et al Spontaneous Vesicle Formation of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymer. *J. Phys. Chem. B*, V. 112, p. 15659–15665, 2008.
- [28] Kozlov M., Melik-Nubarov N., Batrakova E., Kabanov A. Relationship between pluronic block copolymer structure, critical micellization concentration and partitioning coefficients of low molecular mass solutes. *Macromolecules*, V. 33, P.3305-3313, 2000.
- [29] Nolan S.L., Philips R.J., Cotts P.M., Dungan S.R. Light Scattering Study on the Effect of Polymer Composition on the Structural Properties of PEO – PPO – PEO Micelles. *J. Colloid. Interface Sci.*, V. 191, P.291-302, 1997.
- [30] Wanka G., Hoffmann H., Ulbricht W. The aggregation behavior of poly-(oxyethylene)-poly-(oxypropylene)-poly-(oxyethylene)-block-copolymers in

- aqueous solution. *Colloid and Polymer Science* volume, V. 268 (2), P.101-107, 1990.
- [31] Jansson J., Schillen K., Olofsson G., Cardoso da Silva R., Loh W. The Interaction between PEO-PPO-PEO Triblock Copolymers and Ionic Surfactants in Aqueous Solution Studied Using Light Scattering and Calorimetry. *J. Phys. Chem. B*, V. 108, P.82-92, 2004.
 - [32] Nakashima K., Takeuchi K. Water content in micelles of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solutions as studied by fluorescence spectroscopy. *Appl. Spectrosc.*, V. 55, no. 9, P.1237-1244, 2001.
 - [33] Nivaggioli T., Tsao B., Alecandridis P., Hatton T. A. Microviscosity in Pluronic and Tetronic Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide) Block Copolymer Micelles. *Langmuir*, V. 11, no. 1, P.119 - 126, 1995.
 - [34] Nixon S.K., Hvidt S., Booth C. Micellization of block copolymer P94 in aqueous solution. *J. Colloid. Interface Sci.*, V. 208, P.219-223, 2004.
 - [35] Ganguly R., Aswal V.K., Hassan P.A., Gopalakrishnan I.K., Yakhmi J.V. Sodium chloride and ethanol induced sphere to rod transition of triblock copolymer micelles. *J. Phys. Chem. B*, V. 109, P.5653-5658, 2005.
 - [36] Wanka G., Hoffmann H., Ulbricht W., Phase diagrams and aggregation behavior of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene)-poly(oxyethylene) triblock copolymers in aqueous solutions, V. 27, *Macromolecules*, 1994, P.4145-4159.
 - [37] Alexandridis P., Athanassiou V., Fukuda S., Hatton T.A. Surface activity of poly(ethylene oxide)-block-poly(propylene oxide)-block-poly(ethylene oxide) copolymers. *Langmuir*, V. 10, P.2604-2612, 1994.
 - [38] Hurter P.N., Scheutjens J.M.H.M., Hatton T.A. Molecular modeling of micelle formation and solubilization in block copolymer micelles. 1. A self-consistent mean-field lattice theory. *Macromolecules*, V. 26, no. 21, P.5592-5601, 1993.
 - [39] Hurter P.N., Scheutjens J.M.H.M., Hatton T.A. Molecular modeling of micelle formation and solubilization in block copolymer micelles. 2. Lattice theory for

- monomers with internal degrees of freedom. *Macromolecules*, V. 26, no. 19, P.5030-5040, 1993.
- [40] Bahadur P. Block copolymers – Their microdomain formation (in solid state) and surfactant. *Current science*, V. 80, no. 8, P.1002-1007, 2001.
- [41] Alexandridis P., Holzwarth J. F., Hatton T. A. Micellization of poly(ethylene oxide)–poly(propylene oxide)–poly(ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solutions: thermodynamics of copolymer association. *Macromolecules*, V. 27, P.2414-2425, 1994.
- [42] Hecht E., Hoffmann H. Interaction of ABA Block Copolymers with Ionic Surfactants in Aqueous Solution. *Langmuir*, V. 10 (1), P.86-91, 1994.
- [43] Lee E. S., Oh Y. T., Youn Y. S., Nam M., Park B., Yun J., Oh K. T. et al Binary mixing of micelles using Pluronics for a nano-sized drug delivery system.. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.*, V. 82 (1), P.190-195, 2011.
- [44] Tanford C., *The Hydrophobic Effect and the Organization of Living Matter*, V. 200 (4345), *Science*, 1978, P.1012-1018.
- [45] Altinok H., Yu G.-E., Nixon S. K., Gorry P. A., Attwood D., Booth C. Effect of Block Architecture on the Self-Assembly of Copolymers of Ethylene Oxide and Propylene Oxide in Aqueous Solution. *Langmuir*, V. 13, no. 22, P.5837-5848, 1997.
- [46] Yang L., Bedells A. D., Attwood D., Booth C. Association and Surface Properties of Diblock and Triblock Copoly(oxyethylene/oxypropylene/oxyethylene)s. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, V. 88, no. 10, P.1447-1452, 1992.
- [47] Zhou Z, Chu B. Phase behavior and association properties of poly(oxypropylene)-poly(oxyethylene)-poly (oxypropylene) triblock copolymer in aqueous solution.. *Macromolecules.*, V. 27, P.2025-2033, 1994.
- [48] Alexandridis J.F., Holzwarth P. Differential Scanning Calorimetry Investigation of the effect of salts on aqueous solution properties of an amphiphilic block copolymer (Ploxamer). *Langmuir*, V. 13, P.6074-6082, 1997.
- [49] Aswal V.K., Goyal P.S., Kohlbrecher J., Bahadur P. SANS study of salt induced micellization in PEO±PPO±PEO block copolymers. *Chem. Phys. Lett.*, V. 349, P.458-462, 2001.

- [50] Mata J. P., Majhi P. R., Guo C., Liu H. Z., Bahadur P., Concentration, temperature, and salt-induced micellization of a triblock copolymer Pluronic L64 in aqueous media, V. 292 (2), Journal of Colloid and Interface Science, 2005, P.548-556.
- [51] Kumar M. S., Dash S. Effect of salts on micellization and clouding behavior of Pluronic F108 in aqueous solution using Trypan blue dye. Surfaces and Interfaces., V. 12, P.1-7, 2018.
- [52] Guo C., Wang J., Liang X., Zheng L., Liu H. Effect of bovine serum albumin on the micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymers in aqueous solutions by fluorescence spectroscopy.. Sci. China Ser. B Chem., V. 49, P.541-549, 2006.
- [53] Lopes J. R., Loh W. Investigation of Self-Assembly and Micelle Polarity for a Wide Range of Ethylene Oxide-Propylene Oxide-Ethylene Oxide Block Copolymers in Water. Langmuir, V. 14, P.750-756, 1998.
- [54] Linse P., Malmsten M. , Temperature-Dependent Micellization in Aqueous Block Copolymer Solutions, V. 25 (20), Macromolecules, 1992, P.5434-5439.
- [55] Yang T.-F., Chen C.-N., Chen M.-C., Lai C.-H., Liang H.-F., Sung H.-W. Shell-crosslinked Pluronic L121 micelles as a drug delivery vehicle. Biomaterials, V. 28, P.725-734, 2007.
- [56] Lopes J. R., Loh W. Investigation of Self-Assembly and Micelle Polarity for a Wide Range of Ethylene Oxide-Propylene Oxide-Ethylene Oxide Block Copolymers in Water. Langmuir, V. 14, no. 4, P.750-756, 1998.
- [57] Holland R. J., Parker E. J., Guiney K, Zeld F. R. Fluorescence Probe Studies of Ethylene Oxide/Propylene Oxide Block Copolymers in Aqueous Solution. J. Phys. Chem., V. 99, no. 31, P.11981-11988, 1995.
- [58] Kostarelos K., Tadros T. F., Luckham P. F. Physical Conjugation of (Tri-) Block Copolymers to Liposomes toward the Construction of Sterically Stabilized Vesicle Systems.. Langmuir. , V. 15(2), P.369-376, 1999.
- [59] Szleifer I. Statistical thermodynamics of polymers near surfaces.. Current Opinion in Colloid & Interface Science, V. 1, no. 3, P.416-423, 1996.

- [60] Szleifer I., Carignano M. A. Tethered polymer layers: phase transitions and reduction of protein adsorption.. *Macromol. Rapid Commun.* , V. 21, P.423-448, 2000.
- [61] Noskov B. A., Lin S.-Y., Loglio G., Rubio R. G., Miller R. Dilational viscoelasticity of PEO-PPO-PEO triblock copolymer films at the air-water interface in the range of high surface pressures.. *Langmuir.*, V. 22, no. 6, P.2647-2652, 2006.
- [62] Gong H., Xu G., Liu T., Xu L., Zhai X., Zhang J., Lv X. Aggregation behaviors of PEO-PPO-ph-PPO-PEO and PPOPEO- ph-PEO-PPO at an air-water interface: experimental study and molecular dynamics simulation.. *Langmuir*, V. 28, no. 38, P.13590-13600, 2012.
- [63] Higuchi A., Sugiyama K., Yoon B.O., Sakurai M., Hara M., Sumita M., Sugawara S., Shirai T. Serum protein adsorption and platelet adhesion on pluronic-adsorbed polysulfone membranes.. *Biomaterials.*, V. 24, P.3235-3245, 2003.
- [64] Amiji M., Park K. Prevention of protein adsorption and platelet adhesion on surfaces by PEO/PPO/PEO triblock copolymers. *Biomaterials*, V. 13, no. 10, P.682-692, 1992.
- [65] Li J.-T., Caldwell K. D. Plasma protein interactions with Pluronic TM-treated colloids.. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, V. 7, P.9-22, 1996.
- [66] Bohner M., Ring T. A., Rapoport N., Caldwell K. D. Fibrinogen adsorption by PS latex particles coated with various amounts of a PEO/PPO/PEO triblock copolymer. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, V. 13, no. 6, P.732-745, 2002.
- [67] Nonckreman C. J., Fleith S., Rouxhet P. G., Dupont-Gillain C. C. Competitive adsorption of fibrinogen and albumin and blood platelet adhesion on surfaces modified with nanoparticles and/or PEO. *Biointerfaces*, V. 77, no. 2, P.139-149, 2010.
- [68] Kidane A., McPherson T., Shim H. S., Park K. Surface modification of polyethylene terephthalate using PEO-polybutadiene-PEO triblock copolymers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.*, V. 18, P.347-353, 2000.

- [69] Freij-Larsson C., Nylander T., Jannasch P., Wesslén B. Adsorption behaviour of amphiphilic polymers at hydrophobic surfaces: effects on protein adsorption.. *Biomaterials*, V. 17, no. 22, P.2199-2207, 1996.
- [70] Freij-Larsson C., Jannasch P., Wesslen B. Polyurethane surfaces modified by amphiphilic polymers: effects on protein adsorption.. *Biomaterials.*, V. 21, no. 3, P.307-315, 2000.
- [71] Tan J., Brash J.L. Nonfouling biomaterials based on polyethylene oxide-containing amphiphilic triblock copolymers as surface modifying additives: Adsorption of proteins from human plasma to copolymer/polyurethane blends. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, V. 90, no. 1, P.196-204, 2009.
- [72] Alaerts J.A., De Cupere V.M., Moser S., Van den Bosh de Aguilar P., Rouxhet P.G. Surface characterization of poly(methyl methacrylate) microgrooved for contact guidance of mammalian cells.. *Biomaterials.*, V. 22 (12), P.1635-1642, 2001.
- [73] McPherson T., Kidane A., Szleifer I., Park K. Prevention of Protein Adsorption by Tethered Poly(ethylene oxide) Layers: Experiments and Single-Chain Mean-Field Analysis.. *Langmuir*, V. 14, no. 1, P.176-186, 1998.
- [74] Fernandes R. M. F., Buzaglo M., Regev O., Marques E. F., Furó I. , Surface Coverage and Competitive Adsorption on Carbon Nanotubes, V. 119 (38), *J. Phys. Chem. C*, 2015, P.22190-22197.
- [75] Dutta D., Sundaram S.K., Teeguarden J.G., Riley B.J., Fifield L.S., Jacobs J.M., Addleman S.R., Kaysen G.A., Moudgil B.M., Weber T.J. Adsorbed proteins influence the biological activity and molecular targeting of nanomaterials.. *Toxicol. Sci.* , V. 100, P.303-15, 2007.
- [76] Hoffman T.L., Canziani G., Jia L., Rucker J., Doms R.W. A biosensor assay for studying ligand-membrane receptor interactions: Binding of antibodies and HIV-1 Env to chemokine receptors.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, V. 97, P.11215-11220, 2000.
- [77] Jeon S., Lee J., Andrade, J., de Gennes P. Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide. I. Simplified Theory.. *Journal of Colloid and Interface Science.*, V. 142(1), P.149-158, 1991.

- [78] Jeon S., Andrade J. Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide. II. Effect of protein size.. *Journal of Colloid and Interface Science.*, V. 142(1), P.159-166, 1991.
- [79] Kim H. L., Mcauley A., Mcguire J. Protein effects on surfactant adsorption suggest the dominant mode of surfactant-mediated stabilization of protein.. *Journal of Pharmaceutical Sciences.*, V. 103, no. 5, P.1337-1345, 2014.
- [80] Lee R. C., Despa F., Guo L., Betala P., Kuo A., Thiyagarajan P. Surfactant copolymers prevent aggregation of heat denatured lysozyme.. *Ann. Biomed. Eng.*, V. 34, no. 7, P.1190-1200, 2006.
- [81] Almeida N.L., Oliveira C.L., Torriani I.L., Loh W. Calorimetric and structural investigation of the interaction of lysozyme and bovine serum albumin with poly(ethylene oxide) and its copolymers. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, V. 38, P.67-76, 2004.
- [82] Green R. J., Davies M. C., Roberts C. J., Tendler S. J. B. A surface plasmon resonance study of albumin adsorption to PEO-PPO-PEO triblock copolymers.. *J. Biomed. Mater. Res.*, V. 42, P.165-171, 1998.
- [83] Otzen D. Protein-surfactant interactions: A tale of many states.. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics.*, V. 1814, P.562-591, 201.
- [84] Wahlgren M., Kedström J., Arnebrant T. The interactions in solution between nonionic surfactants and globular proteins: effects on cloud point.. *Journal of Dispersion Science and Technology.*, V. 18, no. 4, P.449-458, 1997.
- [85] Pradines V., Fainerman V.B., Aksenenko E.V., Kragel J., Wustneck W., Miller R. Adsorption of protein-surfactant complexes at the water/oil interface.. *Langmuir*, V. 27, no. 3, P.965-971, 2011.
- [86] Kotsmar Cs., Pradines V., Alahverdijeva V.S., Aksenenko E. V., Fainerman V. B., Kovalchuk V.I., Kragel J., Leser M., Noskov B.A., Miller R. Thermodynamics, adsorption kinetics and rheology of mixed protein-surfactant interfacial layers.. *Advances in Colloid and Interface Science.*, V. 150, no. 1, P.41-54, 2009.

- [87] Stenstam A., Topgaard D., Wennerstrom H. Aggregation in a protein-surfactant system. The interplay between hydrophobic and electrostatic interactions.. J. Phys. Chem. B. , V. 107, no. 32, P.7987-7992, 2003.
- [88] Sahu K., Mondal S.K., Roy D., Karmakar R., Bhattacharyya K. Study of interaction of a cationic protein with a cationic surfactant using salvation dynamics: lysozyme:CTAB.. Chem. Phys. Lett., V. 413, no. 4-6, P.484 - 489, 2005.
- [89] Behbehani G.R., Saboury A.A., Taleshi E. Determination of partial unfolding enthalpy for lysozyme upon interaction with dodecyltrimethylammonium bromide using extended salvation model.. J. Molecular Recognition., V. 21, no. 1, P.132-135, 2008.
- [90] Lu R-C., Xiao J-X., Lai L-H., Zhu B-Y., Zhao G-X. Surfactant-induced refolding of lysozyme.. Biochimica et Biophysica Acta G., V. 1722, no. 3, P.271-281, 2005.
- [91] Otzen D.E., Sehgal P., Westh P. α -Lactalbumin is unfolded by all classes of surfactants but by different mechanisms.. Journal of Colloid and Interface Science., V. 329, no. 2, P.273-283, 2009.
- [92] Szymański J., Poboży E., Trojanowicz M., Wilk A., Garstecki P., Hołyst R. Net Charge and Electrophoretic Mobility of Lysozyme Charge Ladders in Solutions of Nonionic Surfactant.. The Journal of Physical Chemistry B., V. 111, no. 19, P.5503-5510, 2007.
- [93] Dixit N., Zeng D. L., Kalonia D. S. Application of maximum bubble pressure surface tensiometer to study protein-surfactant interactions.. International Journal of Pharmaceutics., V. 439, no. 1-2, P.317-323, 2012.
- [94] Dixit N., Maloney K. M., Kalonia D. S. Protein-Silicone Oil Interactions: Comparative Effect of Nonionic Surfactants on the Interfacial Behavior of a Fusion Protein.. Pharmaceutical Research., V. 30, no. 7, P.1848-1859, 2013.
- [95] Neacsu M.V., Matei I., Micutz M., Staicu T., Precupas A., Popa V.T., Salifoglou A., Ionita G. Interaction between Albumin and Pluronic F127 Block Copolymer Revealed by Global and Local Physicochemical Profiling.. J. Phys. Chem. B., V. 120, P.4258-4267, 2016.

- [96] Nandy A., Chakraborty S., Nandi S., Bhattacharyya K., Mukherjee S. Structure, Activity, and Dynamics of Human Serum Albumin in a Crowded Pluronic F127 Hydrogel.. *J. Phys. Chem. B.*, V. 3408, no. 123, p. 3397, 2019.
- [97] Mondal R., Ghosh N., Paul B.K., Mukherjee S. Triblock-Copolymer-Assisted Mixed-Micelle Formation Results in the Refolding of Unfolded Protein.. *Langmuir*, V. 34, P.896-903, 2018.
- [98] Vasilescu M., Angelescu D., Almgren M., Valstar A. Interactions of globular proteins with surfactants studied with fluorescence probe methods.. *Langmuir*, V. 15, no. 8, P.2635-2643, 1999.
- [99] Miller R., Fainerman V. B., Leser M. E., Michel M. Surface tension of mixed non-ionic surfactant/protein solutions: comparison of a simple theoretical model with experiments. *Colloids and Surfaces. A. Physicochem. Eng. Aspects.*, V. 233, P.39-42, 2004.
- [100] Alahverdijeva V.S., Grigoriev D.O., Ferri J.K., Fainerman V.B., Aksenenko E.V., Leser M.E., Michel M., Miller R. Adsorption behavior of hen egg-white lysozyme at air/water interface. *Colloids and Surfaces A*, V. 323, no. 1-2, P.67-174, 2008.
- [101] Haynes C. A., Norde W. Globular proteins at solid/liquid interfaces.. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.*, V. 2, no. 6, P.517-566, 1994.
- [102] Sundaram S., Ferri J.K., Vollhardt D., Stebe K.J. Surface phase behavior and surface tension evolution for lysozyme adsorption onto clean interfaces and into DPPC monolayers: theory and experiment. *Langmuir*, V. 14, no. 5, P.1208-1218, 1998.
- [103] Lu R.J., Su T.J., Thomas R.K., Penfold J., Webster J. Structural conformation of lysozyme layers at the air/water interface studied by neutron reflection.. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, V. 94, no. 21, P.3279-3287, 1998.
- [104] MacRitchie F., Alexander A. Kinetics of adsorption of proteins at interfaces. Part II. The role of pressure barriers in adsorption.. *Journal of Colloid Science.*, V. 18, no. 5, P.458-463, 1963.
- [105] Randolph T. W., Jones L. S. Surfactant-Protein Interactions.. in *Rational Design of Stable Protein Formulations*. By ed. John F. Carpenter, Mark C. Manning, 2002, P.159-175.

- [106] Задымова Н.М., Ямпольская Г.П., Филатова Л.Ю. Взаимодействие бычьего сы-вороточного альбумина с неионогенным ПАВ Твин-80 в водных растворах: комплексообразование и ассоциация.. Коллоидн. журн. , V. 68, no. 2, P.187-197, 2006.
- [107] Makievski A. V., Fainerman V. B., Bree M., Wustneck R., Kragel J., Miller R. Adsorption of proteins at the liquid/air interface.. J. Phys. Chem. B. , V. 102, no. 2, P.417-425, 1998.
- [108] Fainerman V.B., Lucassen-Reynders E.H., Miller R. Description of the adsorption behavior of proteins at water/fluid interfaces in the framework of a two-dimensional solution model.. Advances in Colloid and Interface Science, V. 106, no. 1-3, P.237-259, 2003.
- [109] Stubenrauch C., Fainerman V. B., Aksenenko E. V., Miller R. Adsorption behavior and dilational rheology of the cationic alkyl trimethylammonium bromides at the wa-ter/air interface.. J. Phys. Chem. B., V. 109, no. 4, P.1505-1509, 2005.
- [110] Alahverdjieva V. S., Grigoriev D. O., Fainerman V. B., Aksenenko E. V., Miller R., Möhwald H. Competitive adsorption from mixed hen egg-white lysozyme/surfactant solutions at the air-water interface studied by tensiometry, ellipsometry, and surface dilational rheology.. J. Phys. Chem. B, V. 112, no. 7, P.2136-2143, 2008.
- [111] Miller R., Fainerman V.B., Makievski A.V., Kragel J., Wustneck R. Adsorption characteristics of mixed monolayers of a globular protein and non-ionic surfactant.. Colloids Surf. A., V. 161, no. 1, P.151-157, 2000.
- [112] Fainerman V.B., Lucassen-Reynders E.N., Miller R. Adsorption of surfactant and proteins at fluid interfaces.. Colloids and Surfaces A., V. 143, no. 2-3, P.141-165, 1998.
- [113] Horne D. S., Atkinson P. J., Dickinson E., Pinfield V. J., Richardson R. M. Neutron reflectivity study of competitive adsorption of β - lactoglobulin and nonionic surfactant at the air-water interface.. Int. Dairy J., V. 8, no. 2, P.73-77, 1998.
- [114] Dickinson E. Adsorbed protein layers at fluid interfaces: interactions, structure and surface rheology.. Colloids Surf B Biointerfaces., V. 15, no. 2, P.161-176, 1999.

- [115] Horne D. S., Atkinson P. J., Dickinson E., Pinfield V. J., Richardson R. M. Neutron reflectivity study of competitive adsorption of β -lactoglobulin and nonionic surfactant at the air-water interface.. *Int. Dairy J.*, V. 8, no. 2, P.73-77, 1998.
- [116] Kotsmar Cs., Grigoriev D.O., Xu F., Aksenenko E. V., Fainerman V. B., Leser M. E., Miller R. Equilibrium of adsorption of mixed milk protein/surfactant solutions at the water/air interface.. *Langmuir*, V. 24, no. 24, P.13977-13984, 2008.
- [117] Caserman S., Kusterle M., Kunstelj M., Milunović T., Schiefermeier M., Jevšvar S., Gaberc Porekar V. Correlations between in vitro potency of polyethylene glycol–protein conjugates and their chromatographic behavior. *Analytical Biochemistry*, V. 389, no. 1, P.27-31, 2009.
- [118] Verma P.K., Rakshit S., Mitra R.K., Pal S.K. Role of hydration on the functionality of a proteolytic enzyme A-chymotrypsin under crowded environment.. *Biochimie.*, V. 93, no. 9, P.1424-1433, 2011.
- [119] Samanta N., Das Mahanta Animesh D., Rajib P., Mitra K. Soft interaction and excluded volume effect compete as polyethylene glycols modulate enzyme activity.. *International Journal of Biological Macromolecules*, V. 118 (A), P.209-215, 2018.
- [120] Samanta N., Luong T.Q., Mahanta D.D., Mitra R.K., Havenith M. Effect of short chain polyethyleneglycols on the hydration structure and dynamics around human serum albumin.. *Langmuir*, V. 32, no. 3, P.831-837, 2016.
- [121] Malzert A., Boury F., Renard D., Robert P., Lavenant L., Benoit J., Spectroscopic studies on poly (ethylene glycol)–lysozyme interactions,, V. 260 (2), *J. Proust. Int. J. Pharm.*, 2003, P.175-186.
- [122] Pancera S.M., da Silva L.H., Loh W., Itri R., Pessoa A., Petri D.F. The effect of poly (ethylene glycol) on the activity and structure of glucose-6-phosphate dehydrogenase in solution.. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, V. 26, no. 4, P.291-300, 2002.
- [123] Furness E.L., Ross A., Davis T. P., King G. C. A hydrophobic interaction site for lysozyme binding to polyethylene glycol and model contact lens polymers.. *Biomaterials*, V. 19, no. 15, P.1361-1369, 1998.

- [124] Tzeng S.-R., Kalodimos C.G. Protein activity regulation by conformational entropy.. *Nature*, V. 488, p. 236–240, 2012.
- [125] Kang F., Jiang G., Hinderliter A., De Luca P.P., Singh J., Lysozyme stability in primary emulsion for PLGA microsphere preparation: effect of recovery methods and stabilizing excipients., V. 19, *Pharm. Res.*, 2002, p. 629–633.
- [126] Grimonprez B, Johansson G. Liquid-liquid partitioning of some enzymes, especially phosphofructokinase, from *Saccharomyces cerevisiae* at subzero temperature.. *J. of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.*, Vols. 680 (1-2), P.55-63, 1997.
- [127] Pancera S., Petri D., Itri R. The effect of poly (ethylene glycol) on the activity, structural conformation and stability of yeast hexokinase.. *Progress in Colloid and Polymer Science*, Springer, Berlin, Heidelberg, V. 128, P.178-183, 2004.
- [128] Yoon S. H., Robyt J. F. Activation and stabilization of 10 starch-degrading enzymes by Triton X-100, polyethylene glycols, and polyvinyl alcohols.. *Enzyme and Microbial Technology*, V. 37, no. 5, P.556-562, 2005.
- [129] Wang F., Shao L., Zhang X. Comparison study on the interaction mechanisms of *B. amyloliquefaciens* amylase with PEG-400 and TEPA and the properties of enzyme.. *J. Mol. Struct.*, V. 1081, P.457-465, 2015.
- [130] Li C., Li W., Holler T.P., Gu Z., Li Z. Polyethylene glycols enhance the thermostability of β -cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans*.. *Food chemistry*, V. 164, P.17-22, 2014.
- [131] Zimmerman S. B., Pfeiffer B. H. Macromolecular crowding allows blunt-end ligation by DNA ligases from rat liver or *Escherichia coli*.. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, V. 80, p. 5852–5856, 1983.
- [132] Harrison B., Zimmerman S.B. Polymer-stimulated ligation: Enhanced ligation of oligo- and polynucleotides by t4 rna ligase in polymer solutions. *Nucleic Acids Res.*, V. 12, p. 8235–8251, 1984.
- [133] Jiang M.; Guo Z. Effects of macromolecular crowding on the intrinsic catalytic efficiency and structure of enterobactin-specific isochorismate synthase. *J. Am. Chem. Soc.*, V. 129, P.730-731, 2007.

- [134] Harrison B.; Zimmerman S.B. Stabilization of T4 polynucleotide kinase by macromolecular crowding. *Nucleic Acids Res.*, V. 14, P.1863-1870, 1986.
- [135] Harrison B.; Zimmerman S.B. T4 polynucleotide kinase: Macromolecular crowding increases the efficiency of reaction at DNA termini. *Anal. Biochem.*, V. 158, p. 307–315, 1986.
- [136] Moran-Zorzano M. T.; Viale A. M.; Munoz F. J.; Alonso-Casajus N.; Eydallin G. G.; Zugasti B.; Baroja-Fernandez E.; Pozueta-Romero J. *Escherichia coli* aspp activity is enhanced by macromolecular crowding and by both glucose-1,6-bisphosphate and nucleotide-sugars.. *FEBS Lett*, V. 581, P.1035-1040, 2007.
- [137] Rohwer J.M., Postma P.W., Kholodenko B.N., Westerhoff H.V. Implications of macromolecular crowding for signal transduction and metabolite channeling.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vols. 10547-10552, p. 95, 1998.
- [138] Okamoto D.N.; Oliveira L. C.; Kondo M. Y.; Cezari M. H.; Szeltner Z.; Juhasz T.; Juliano M. A.; Polgar, L.; Juliano, L.; Gouvea, I.E. Increase of SARS-CoV 3Cl peptidase activity due to macromolecular crowding effects in the milieu composition.. *Biol. Chem.*, V. 391, P.1461-1468, 2010.
- [139] Hongming L., Meijun Z., Qiaoyan H., Cheng C., Xuliang L., Xueqing Q., Dongji, Y., Yuxia P. Nonionic surfactants enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose by reducing cellulase deactivation caused by shear force and air-liquid interface.. *Bioresource Technology.*, V. 249, P.1-8, 2018.
- [140] Guncheva M., Zhiryakova D., Radchenkova N., Kambourova M. Effect of nonionic detergents on the activity of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* MC7.. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, V. 49, P.88-91, 2007.
- [141] Otero C., Fernández-Pérez M., Hermoso J. A., Ripoll M. M. Activation in the Family of *Candida Rugosa* Isolipases by Polyethylene Glycol.. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, V. 32, P.225-229, 2005.
- [142] Verma P.K., Rakshit S., Mitra R.K., Pal S.K. Role of hydration on the functionality of a proteolytic enzyme A-chymotrypsin under crowded environment.. *Biochimie.*, V. 93, no. 9, P.1424-1433, 2011.

- [143] Suthar M.K., Doharey P.K., Verma A., Saxena J.K. Behavior of plasmodium falciparum purine nucleoside phosphorylase in macromolecular crowded environment.. *Int. J. Biol. Macromol.*, V. 62, P.657-662, 2013.
- [144] Guo Z. F., Jiang M., Zheng S., Guo Z. Suppression of linear side products by macromolecular crowding in nonribosomal enterobactin biosynthesis.. *Organic letters*, ACS Publications., V. 10, no. 4, P.649-652, 2008.
- [145] Derham B.K., Harding J.J. The effect of the presence of globular proteins and elongated polymers on enzyme activity.. *Biochim. Biophys. Acta*, V. 1764, P.1000-1006, 2006.
- [146] Mesa M., Pereañez J. A., Preciado L. M., Bernal C. How the Triton X-100 modulates the activity/stability of the *Thermomyces lanuginose* lipase: Insights from experimental and molecular docking approaches.. *International Journal of Biological Macromolecules*, V. 120, no. B, P.2410-2417, 2018.
- [147] Soto D., Escobar S., Guzmán F., Cárdenas C., Bernal C., Mesa M. Structure-activity relationships on the study of β -galactosidase folding/unfolding due to interactions with immobilization additives: Triton X-100 and ethanol. *Int. J. Biol. Macromol.*, V. 96, P.87-92, 2017.
- [148] Fernandez-Lorente G., Palomo J M., Cabrera Z., Fernandez-Lafuente R., Guisán J. M. Improved catalytic properties of immobilized lipases by the presence of very low concentrations of detergents in the reaction medium.. *Biotechnology and Bioengineering*, V. 97, no. 2, P.242-250, 2007.
- [149] Neumann B., Chang C. C. Y., Chang T.-Y. Triton X-100 or octyl glucoside inactivates acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 1 by dissociating it from a two-fold dimer to a two-fold monomer. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, V. 671, P.103-110, 2019.
- [150] Trinh T. H. T., Kim J., Lee C.-H., Ryou C. Non-ionic detergents Nonidet P-40 and Triton X-100 increase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, V. 512, P.314-318, 2019.
- [151] Zhang Y., Zeng, Z., Zeng G., Liu X., Liu Z., Chen M., Lifeng L., Jianbing L., Xie G. Effect of Triton X-100 on the removal of aqueous phenol by laccase analyzed

with a combined approach of experiments and molecular docking. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, V. 97, P.7-12, 2012.

- [152] Gao W., Starkov V. G., HeZ., Wang Q., Tsetlin V. I., Utkin Y. N., Lin J., Bi R. Functions, structures and Triton X-100 effect for the catalytic subunits of heterodimeric phospholipases A2 from *Vipera nikolskii* venom. *Toxicon*, V. 54, P.709-716, 2009.
- [153] Calvo M. V., Plou F. J., Ballesteros A. Effect of Surfactants on Activity and Stability of Native and Chemically Modified Lipases A and B from *Candida Rugosa*. *Biocatal. Biotransform.*, V. 13, P.271-285, 1996.
- [154] Клячко Н.Л., Легоцкий С.А., Левашов П.А., Попова В.М., Белогурова Н.Г., Ти-машева А.В., Дятлов И.А., Левашов А.В. Эндолизин бактериофага SPZ7: влияние эффекторов на каталитическую активность фермента в лизисе грамотрицательных микроорганизмов.. *Вестник Моск. ун-та. Серия 2. Химия.*, V. 51, no. 3, P.222-226, 2010.
- [155] William M. Aumiller Jr.; Davis B.W.; Hatzakis E.; Keating C.D. Interactions of macromolecular crowding agents and cosolutes with small-molecule substrates: Effect on horseradish peroxidase activity with two different substrates.. *J. Phys. Chem. B.*, V. 118, no. 36, P.10624-10632., 2014.
- [156] Samanta N., Das Mahanta D., Hazra S., Kumar G. S., Mitra R.K. Short chain polyethylene glycols unusually assist thermal unfolding of human serum albumin.. *Biochimie*, V. 104, P.81-89, 2014.
- [157] Minton A.P., Wilf J. Effect of macromolecular crowding upon the structure and function of an enzyme: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.. *Biochemist*, V. 20, no. 17, P.4821-4826., 1981.
- [158] Minton A. P. The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media.. *J. Biol. Chem.*, V. 276, no. 14, P.10577-10580, 2001.
- [159] Oldfield C. J., Cheng Y., Cortese M. S., Brown C. J., Uversky V. N., Dunker A. K. Comparing and combining predictors of mostly disordered proteins.. *Biochem.*, V. 44, p. 1989—2000., 2005.

- [160] Ellis R.J. Macromolecular crowding: obvious but underappreciated.. Trends Biochem. Sci. , V. 26, p. 597–604., 2001.
- [161] Norris M.G.; Malys N. What is the true enzyme kinetics in the biological system? An investigation of macromolecular crowding effect upon enzyme kinetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase.. Biochem. Biophys. Res. Commun. , V. 405, p. 388–392, 2011.
- [162] Akabayov S.R.; Akabayov B.; Richardson C.C.; Wagner G. Molecular crowding enhanced atpase activity of the rna helicase eif4a correlates with compaction of its quaternary structure and association with eif4g.. J. Am. Chem. Soc., V. 135, p. 10040–10047, 2013.
- [163] Munishkina L.A., Ahmad A., Fink A. L., Uversky V. N.Guiding protein aggregation 665 with macromolecular crowding. Biochemistry, V. 47, p. 8993–9006, 2008.
- [164] Munishkina L.A., Cooper E.M., Uversky V.N., Fink A.L. The effect of macromolecular crowding on protein aggregation and amyloid fibril formation. J. Mol. Recognit, V. 17, P.456-464, 2004.
- [165] Ma Q., J.B. Fan, Z. Zhou, B.R. Zhou, S.R. Meng, J.Y. Hu, J. Chen, Y. Liang. The contrasting 673 effect of macromolecular crowding on amyloid fibril formation. PLoS ONE, V. 7, no. 4, 2012.
- [166] Simon L., Kotorman M., Garab G., Laczko I.Effects of polyhydroxy compounds on the structure and activity of α -chymotrypsin.. Biochemical and Biophysical Research Communications., V. 293, no. 1, P.416-420, 2002.
- [167] Guo W., Mabrouk P. A. Raman evidence that lyoprotectant poly(ethylene glycol) does not restore nativity to the heme active site of horseradish peroxidase suspended in organic solvents.. Biomacromolecules., V. 3, P.846-849, 2002.
- [168] Lotwin J., De Bernardez C. E.Oxidative renaturation of hen egg-white lysozyme in polyethylene glycol-salt aqueous two-phase systems.. Biotechnol. Bioeng., V. 65, P.437-446, 1999.
- [169] Nerli B.B., Espariz M., Pico G.A.Thermodynamic study of forces involved in bovine serum albumin and ovalbumin partitioning in aqueous two-phase systems.. Biotechnol. Bioeng., V. 72, P.46-474, 2001.

- [170] Kokufuta E., Nishimura H. Complexation of pepsin poly(ethylene glycol).. Polymer Bulletin , V. 26, P.277-282, 1991.
- [171] Azegami S., Tsuboi A., Izumi T., Hirata M., Dubin P. L., Wang B., Kokufuta E. Formation of an Intrapolymer Complex from Human Serum Albumin and Poly(ethylene glycol). Langmuir, V. 15, P.940-947, 1999.
- [172] Bekale L., Agudelo D., Tajmir-Riahi H. A. The role of polymer size and hydrophobic end-group in PEG–protein interaction. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, V. 130, no. 1, P.141-148, 2015.
- [173] Lushchak V. I. Influence of polyethylene glycol on lactate dehydrogenase. IUBMB Life, V. 44, no. 2, P.425-431, 2008.
- [174] Forcittini D., Hall C. K., Kula M. R. Protein Partitioning at the Isoelectric Point: Influence of Polymer Molecular Weight and Concentration and Protein Size.. Biotechnol. Bioeng., V. 38, no. 9, P.986-994, 1991.
- [175] Lee J. C., Lee L. L. Y. Thermal stability of proteins in the presence of poly(ethylene glycols).. J. Biol. Chem., V. 26 (24), P.625-631, 1981.
- [176] Топчиева И. Н., Ефремова Н. В., Снитко Я. Э., Хворов Н. В. Термоиндуцированное комплексообразование между α -химотрипсином и амфифильным блок-сополимером. ДАН СССР, V. 339 (4), P.498-502, 1994.
- [177] Топчиева И.Н., Сорокина Е.И., Курганов Б.И., Жулин В.М. Комплексообразование между α -химотрипсином и блок-сополимерами на основе окиси этилена и окиси пропилена, индуцируемое действием высоких давлений.. Биохимия., V. 61, P.1041-1045, 1996.
- [178] Осипова С.В. Ассоциативные свойства блок-сополимеров окиси этилена и окиси пропилена в водных растворах. Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук, М.: МГУ, 1990.
- [179] Gospodarczyk W., Kozak M. Interaction of two imidazolium gemini surfactants with two model proteins BSA and HEWL.. Colloid Polym. Sci., V. 293, P.2855-2866, 2015.
- [180] Бухарин О. В., Васильев Н. В. Лизоцим и его роль в биологии и медицине., Томск: Изд-во Том. ун-та, 1974.

- [181] Вайнштейн Б.К. Рентгеноструктурный анализ глобулярных белков.. Успехи Физ. Наук., V. 88, no. 3, P.527-565, 1966.
- [182] Полторак О.М., Чухрай Е.С. Физико-химические основы ферментативного катализа., М.: Высшая школа., 1971.
- [183] Sophianopoulos A.J., Van Holde K.E. Physical Studies of Muramidase (Lysozyme): II. pH-dependent dimerization.. J. Biol. Chem., 239 (1964), p. 2516, V. 239, P.2516-2524, 1964.
- [184] Imoto T., Doi Y., Hayashi K., Funatsu M. Charakterization of Enzyme-substrate Complex of Lysozyme.. J.Biochem., V. 65, no. 5, P.667-671, 1969.
- [185] Варфоломеев С. Д. Химическая энзимология, М.: Академия, 2005.
- [186] Otaki N., Kimura N. Studies on lysozymes. VI. Application of a new colorimetric assay on lysozymes. Ind. Health., V. 13, no. 1, P.23-29, 1975.
- [187] Blake C., Koenig D., Mair G., North A., Phillips D., Sarma V. Structure of Hen Egg-White Lysozyme: A Three-Dimensional Fourier Synthesis at 2 Å Resolution. Nature, V. 206 (4986), P.757-761, 1965.
- [188] 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., V. 21, no. 2, P.97-111, 1985.
- [189] Neville W. M., Eyring H. Hydrostatic Pressure and Ionic Strength Effects on the Kinetics of Lysozyme.. Proceedings of the National Academy of Sciences., V. 69, no. 9, P.2417-2419, 1972.
- [190] Gölander C.-G., Hlady V., Caldwell K., Andrade J. D. Absorption of human lysozyme and adsorbate enzyme activity as quantified by means of total internal reflection fluorescence, 125I labelling and ESCA.. Colloids and Surfaces., V. 50, P.113-130, 1990.
- [191] Wagner M.S., Horbett T.A., Castner D.G. Characterization of the structure of binary and ternary adsorbed protein films using Electron Spectroscopy for Chemical

Analysis, Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry, and Radiolabeling..
Langmuir., V. 19, no. 5, P.1708-1715, 2003.

- [192] Wagner M. S., Shen M., Horbett T. A., Castner D. G. Quantitative analysis of binary adsorbed protein films by time of flight secondary ion mass spectrometry. Journal of Biomedical Materials Research., V. 64A, no. 1, p. 1–11, 2002.
- [193] Sousa S.R., Moradas-Ferreira P., Saramago B., Melo L.V., Barbosa M.A. Human serum albumin adsorption on TiO₂ from single protein solutions and from plasma. Langmuir, V. 20, no. 22, P.9745-9754, 2004.
- [194] Bentaleb A., Abele A., Haikel Y., Schaaf P., Voegel J.C. FTIR-ATR and radio-labeling study of structural modifications during protein adsorption on hydrophilic surfaces. 2. The case of Apo- α -lactalbumine.. Langmuir, V. 15, no. 14, P.4930-4933, 1999.
- [195] Bentaleb A., Abele A., Haikel Y., Schaaf P., Voegel J.C. FTIR-ATR and radio-labeling study the adsorption of Ribonuclease A onto hydrophilic surfaces: Correlation between the exchange rate and the interfacial denaturation.. Langmuir., V. 14, no. 22, P.6493-6500, 1998.
- [196] Clark W. A., Izotova L., Philipova D., Wu W., Lin L., Pestka S. Site-Specific ³²P-Labeling of Cytokines, Monoclonal Antibodies, and Other Protein Substrates for Quantitative Assays and Therapeutic Application.. BioTechniques., V. 33, no. 4S, p. S76–S8, 2002.
- [197] Wang P., Izotova L., Mariano T. M., Donnelly R. J., Pestka S. Construction and Activity of Phosphorylatable Human Interferon- α B2 and Interferon- α A/D.. Journal of Interferon Research., V. 14, no. 1, P.41-46, 1994.
- [198] Lin L., Gillies S.D., Schlom J., Pestka S. Construction of phosphorylatable monoclonal antibody CC49 with a casein kinase II recognition site.. Anticancer Res., V. 18, P.3971-3978, 1998.
- [199] Lin L., Gillies S.D., Schlom J., Pestka S. Construction of phosphorylatable chimeric monoclonal antibody CC49 with a casein kinase I recognition site.. Protein Expr. Purif., V. 15, P.83-91, 1999.

- [200] Lin L., Gillies S.D., Schlom J., Pestka S. Construction of phosphorylatable chimeric monoclonal antibody CC49 with a tyrosine Src kinase recognition site.. *Int. J. Oncol.* V. 13, P.725-732, 1998.
- [201] Fischer R., Wei Y., Berchtold M. Detection of Calmodulin-Binding Proteins Using a ³²P-Labeled GST-Calmodulin Fusion Protein and a Novel Renaturation Protocol. *BioTechniques.*, V. 21, no. 2, P.292-296, 1996.
- [202] Lin L., Gillies S.D., Lan Y., Izotova L., Wu W., Schlom J., Pestka S. Construction of phosphorylatable chimeric monoclonal antibody CC49.. *Int. J. Oncol.*, V. 13, P.115-120, 1998.
- [203] Chen L.-C., Casadevall A. Labeling of Proteins with [³⁵S]Methionine and/or [³⁵S]Cysteine in the Absence of Cells.. *Analytical Biochemistry.*, V. 269, no. 1, P.179-188, 1999.
- [204] Wang R., Schlenoff J. B. Adsorption of a Radiolabeled Random Hydrophilic/Hydrophobic Copolymer at the Liquid/Liquid Interface: Kinetics, Isotherms, and Self-Exchange.. *Macromolecules*, V. 31, no. 2, P.494-500, 1998..
- [205] Ji R., Kappler A., Brune A. Transformation and mineralization of synthetic ¹⁴C-labeled humic model compounds by soil-feeding termites.. *Soil Biol. Biochem.* , V. 32, no. 8-9, P.1281-1291, 2000.
- [206] Kappler A., Ji R., Brune A. Synthesis and characterization of specifically ¹⁴C-labeled humic model compounds for feeding trials with soil-feeding termites. *Soil Biol. Biochem.* , V. 32, no. 8-9, P.1271-1280, 2000.
- [207] Graham D.E., Chattergoon L., Phillips M.C. A technique for measuring interfacial concentrations of surfactants at the oil-water interface.. *J. Phys. E: Instrum.*, V. 8, no. 8, P.696-699, 1975.
- [208] Graham D.E., Phillips M.C. Protein at liquid interface. I. Kinetics of adsorption and surface denaturation.. *J. Colloid and Interface Sci.*, V. 70, no. 3, P.403-414, 1979.
- [209] Graham D.E., Phillips M.C. Protein at liquid interface. II. Adsorption isotherms. *J. Colloid and Interface Sci.*, V. 70, no. 3, P.414-426, 1979.

- [210] Graham D.E., Philips M.C. Proteins at liquid interfaces. III. Molecular Structures of Adsorbed Films.. Journal of Colloid and Interface Science., V. 70, no. 3, P.427-429, 1979.
- [211] Graham D.E., Philips M.C. Proteins at liquid interfaces. IV. Dilatational properties.. Journal of Colloid and Interface Science., V. 76, no. 1, P.227-239, 1980.
- [212] Graham D.E., Philips M.C. Proteins at liquid interfaces. V. Shear properties.. Journal of Colloid and Interface Science., V. 76, no. 1, P.240-250, 1980.
- [213] Anand K., Damodaran S. Dynamics of exchange between α S1-casein and β -casein during adsorption at air-water interface.. J. Agric. Food Chem., V. 44, no. 4, P.1022-1028, 1996.
- [214] Damodaran S., Sengupta T. Dynamics of competitive adsorption of β -casein and α -casein at planar triolein-water interface: evidence for incompatibility of mixing in the interfacial film.. J. Agric. Food Chem., V. 51, no. 6, P.1658-1665, 2003.
- [215] Sengupta T., Razumovsky L., Damodaran S. .Energetics of protein-interface interactions and its effect on protein adsorption. Langmuir, V. 15, no. 20, P.6991-7001, 1999.
- [216] Sengupta T., Damodaran S. Role of dispersion interactions in the adsorption of proteins at oil-water and air-water interfaces. Langmuir, V. 14, P.6457-6469., 1998.
- [217] Podhipleux N., Damodaran S., McGuire J., Bothwell M. K. (1999). Structural stability effects on T4 lysozyme adsorption at the air–water interface. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, V. 13, no. 4, P.167-177, 1999.
- [218] Беловодский Л.Ф., Гаевой В.К., Гришмановский В.И., Тритий, М., 1985, р. 248 с.. 1975.
- [219] Feinendegen L.E., Tritium-labeled molecules in biology and medicine. London: Acad. press. NY, 1967, p. 429.
- [220] Нейман Л.А., Смоляков В.С., Шишков А.В. Радиоизотопные методы в физико-химической биологии. Использование реакций атомарного трития. Итоги науки и техники. Серия: общие проблемы физико-химической биологии. V. 2, р. 208, 1985.

- [221] Shaffer C. L., Gunduz M., Thornburgh B. A. , Fate G. D. Using a Tritiated Compound to Elucidate Its Preclinical Metabolic and Excretory Pathways in Vivo: Exploring Tritium Exchange Risk. *Drug Metabolism and Disposition*, V. 34, no. 9, P.1615-1623, 2006.
- [222] Эванс Э., Тритий и его соединения, М.: Атомиздат, 1970.
- [223] Шевченко В. П., Нагаев И. Ю., Мясоедов Н.Ф.; Отв.ред.: Мясоедов В.В., Меченые тритием липофильные соединения, Москва: Наука, 2003, p. 246.
- [224] Voges R., Heys J. R., Moenius T., Preparation of Compounds Labeled with Tritium and Carbon-14., New York: John Wiley & Sons, 2009.
- [225] Dorokhova E.M., Zolotarev Yu.A., Kozik V.S., Penkina V.I., Myasoedov N.F. Preparation of tritium-labelled L-[4,5-³H]lysine, L-[4,5-³H]leucine, L-[4,5-³H]isoleucine, L-[3,4-³H]valine and L-[2,3,4,5-³H]proline.. *Radioisotopy*., V. 31, no. 1, P.40-47, 1990.
- [226] Pająk M., Pałka K., Winnicka E., Kańska M. The chemo-enzymatic synthesis of labeled l-aminoacids and some of their derivatives.. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*., V. 317, no. 2, P.643-666, 2018.
- [227] Peng C. T., Hua R. L. Tritium Labeling of Peptides and Proteins. A Review.. *Fusion Technology*, V. 8, no. 2P2, p. 2265–2272, 1985.
- [228] Tack B. F., Wilder R. L. Tritiation of proteins to high specific activity: Application to radioimmunoassay.. *Methods in Enzymology*, V. 73, P.138-147, 1981.
- [229] Tack B. F., Dean J., Eilat D., Lorenz P. E., Schechter A. N. Tritium labeling of proteins to high specific radioactivity by reduction methylation.. *The journal of biological chemistry*, V. 255, no. 18, P.8842-8847, 1980.
- [230] Ascoli M., Puett D. Tritium labeling of luteinizing hormone by reductive methylation.. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, V. 371, no. 1, P.203-210, 1974.
- [231] Van Der Wel H., Wiersma A., Brouwer J. N. Tritium labelling of Thaumatin I, a sweet-tasting protein from *Thaumatococcus daniellii* benth, by reductive methylation. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, V. 14, no. 5, P.735-740, 1978.

- [232] Wilder R. L., Yuen C. C., Subbarao B., Woods V. L., Alexander C. B., Mage R. G. Tritium (^3H) radiolabeling of protein A and antibody to high specific activity: Application to cell surface antigen radioimmunoassays.. *Journal of Immunological Methods*, V. 28, no. 3-4, P.255-266, 1979.
- [233] Marsh J. W., Nahum A., Steiner D. F. Reductive methylation of insulin: Production of a biologically active tritiated insulin.. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 22(1), 39–49, V. 22, no. 1, P.39-49, 1982.
- [234] Uschkoreit J., Bradenburg D., Friesen H.J. Radioactive Labeling (^{14}C , ^3H) of Insulin and Insulin Derivatives by Reductive Methylation; Isolation of Homogeneous N,N-Dimethylated Derivatives. in *Insulin, Chemistry, Structure and Function of Insulin and Related Hormones*, Berlin, 1980, P.191-199.
- [235] Koch G.K., Heertje I., Van stijn F . A Comparative Study on the Radioactive Labeling of Proteins. *Radiochim. Acta*, V. 24, P.215-219, 1977.
- [236] Jones S. W., Vidaver G. A. Labeling of pigeon erythrocyte membrane proteins by low-level reductive methylation. *Analytical Biochemistry*, 117(2), 459–465.. *Analytical Biochemistry*, V. 117, no. 2, P.459-465, 1981.
- [237] Heller M., Loomes K.M., Cooper G.J.S. Synthesis of Biologically Active Tritiated Amylin and Salmon Calcitonin Analogues.. *Analytical Biochemistry*, V. 285, no. 1, P.100-104, 2000.
- [238] Prasad A. V. K., Ju J.-M., Plantner J. J., Kean E. L. Reductively methylated, tritiated rhodopsin of high specific activity; a convenient sensitive tracer for use in the radioimmunoassay of rhodopsin.. *Current Eye Research*, V. 11, no. 3, P.267-273, 1992.
- [239] Sagan S., Karoyan P., Lequin O., Chassaing G., Lavielle S. N- and C α -Methylation in Biologically Active Peptides: Synthesis, Structural and Functional Aspects.. *Current Medicinal Chemistry*., V. 11, no. 21, P.2799-2822, 2004.
- [240] Agishi Y., Dingman J. F. Specific tritiation of oxytocin by catalytic deiodination.. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, V. 18, no. 1, P.92-97, 1965.

- [241] Morgat J.L., Hung L.T., Cardinaud R., Fromageot P., Bockaert J., Imbert M. and Morel F. Peptidic hormone interactions at the molecular level-preparation of highly labelled 3H oxytocin. *J. Labelled Compounds*, V. 276, no. 6, 1970.
- [242] Ramachandran J., Behrens C. Preparation and characterization of specifically tritiated adrenocorticotropin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, V. 496, no. 2, P.321-328, 1977.
- [243] Buckley D.I., Ramachandran J. Preparation of tritiated α -melanotropin with high specific radioactivity. *International Journal of Peptide and Protein Research*, V. 17, no. 4, P.514-518, 1981.
- [244] Caro L. G., Palade G. E. Protein synthesis, storage, and discharge in the pancreatic exocrine cell: an autoradiographic study.. *The Journal of Cell Biology*, 20(3), 473–495, V. 20, no. 3, P.473-495, 1964.
- [245] Karlsson J.-O., Sjöstrand J. Transport of labelled proteins in the optic nerve and tract of the rabbit.. *Brain Research*, V. 11, no. 2, P.431-439, 1968.
- [246] Banker G., Cotman C.W. Characteristics of different amino acids as protein precursors in mouse brain: Advantages of certain carboxyl-labeled amino acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, V. 142, no. 2, P.565-573, 1971.
- [247] Canfield R. E., Anfinsen C. B. Nonuniform Labeling of Egg White Lysozyme. *Biochemistry*, V. 2, no. 5, P.1073-1078, 1963.
- [248] Nunez J., Mauchamp J., Roche J. Biosynthèse in vitro d'hormones marquées par 3H et 125I dans des coupes de corps thyroïde: I. Propriétés des coupes en survie. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, V. 86, no. 2, P.361-371, 1964.
- [249] Mallory A., Smith G.H., Taylor K. W. The incorporation of tritium-labelled amino acids into insulins in rat pancreas in vitro.. *Biochem J.*, V. 91, no. 3, P.484-491, 1964.
- [250] Keller M., Pop N., Hutzler C., Beck-Sickinger A. G., Bernhardt G., Buschauer A. Guanidine–Acylguanidine Bioisosteric Approach in the Design of Radioligands: Synthesis of a Tritium-Labeled NG-Propionylargininamide ([³H]-UR-MK114) as a

- Highly Potent and Selective Neuropeptide Y Y1 Receptor Antagonist.. *Journal of Medicinal Chemistry*, V. 51, no. 24, p. 8168–8172, 2008.
- [251] Ichinose K., Leeper F.J., Battersby A.R. Preparation of [4R3H] NADH, [4R3H] NADPH and the corresponding 4S-isomers all with substantial specific activities. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, V. 1, P.1213-1216, 1993.
- [252] Agrawal N., Kohen A. Microscale synthesis of 2-tritiated isopropanol and 4R-tritiated reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.. *Analytical Biochemistry*, V. 322, no. 2, P.179-184, 2003.
- [253] Vicente C.P., He L., Pavão M.S.G., Tollefsen D.M. Antithrombotic activity of dermatan sulfate in heparin cofactor II-deficient mice. *Blood*. V. 104, no. 13, P.3965-3970, 2004.
- [254] Agrawal N., Mihai C., Kohen A. Microscale synthesis of isotopically labeled R-[6-xH]N5,N10-methylene-5,6,7,8-tetrahydrofolate as a cofactor for thymidylate synthase.. *Analytical Biochemistry*, V. 328, no. 1, P.44-50, 2004.
- [255] Shevchenko V. P., Nagaev I. Y., Myasoedov N. F., Andres H., Moenius T., Susan A. Synthesis of tritiated Cyclosporin A and FK-506 by metal-catalyzed hydrogen isotope exchange.. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals.*, V. 47, no. 4, P.407-414, 2004.
- [256] Shevchenko V. P., Nagaev I. Y., Shevchenko K. V., Myasoedov N. F. Influence of the Catalyst and Support on the Efficiency of Solid-Phase Isotope Exchange between Gaseous Tritium and Phenylalanine.. *Radiochemistry.*, V. 44, no. 6, P.593-597, 2002.
- [257] Shevchenko V.P., Nagaev I.Yu., Myasoedov N.F. Solid-phase method for tritium labelling of biologically active compounds. *Russ. Chem. Rev.*, V. 72, P.423-446, 2003.
- [258] Shevchenko V.P., Nagaev I.Yu., Myasoedov N.F. Effect of various additives on the yield and molar radioactivity of labeled products in solid-phase isotope exchange.. *Radiochemistry.*, V. 45, no. 1, P.81-86, 2003.

- [259] Shevchenko V. P., Nagaev I. Y., Myasoedov N. F., Popova N. N., Pirogova G. N. Effect of Technetium on the Efficiency of Solid-Phase Isotope Exchange. *Radiochemistry*, V. 44, no. 6, P.588-592, 2002.
- [260] Conner W.C., Falconer J.L. Spillover in heterogeneous catalysis.. *Chem. Rev.*, V. 95, no. 3, P.759-788, 1995.
- [261] Zolotarev Y. A., Dadayan A. K., Borisov Y. A., Kozik V. S. Solid State Isotope Exchange with Spillover Hydrogen in Organic Compounds. *Chemical Reviews*., V. 110, no. 9, P.5425-5446, 2010.
- [262] Myasoedov N. F. Solid-phase reactions as approach to the synthesis of organic compounds labelled with tritium.. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*., V. 50, no. 9-10, P.831-847, 2007.
- [263] Shevchenko V. P., Nagaev I. Y., Myasoedov N. F., Guy A., Durand T., Vidal A., Bezuglov V. V. Synthesis of labelled oxylipins: leukotriene A₄ and 8-epi-prostaglandin F_{2α}.. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*., V. 42, no. 7, P.663-672, 1999.
- [264] Akulov G.P., Kaminskii Tu.L., Korsakova N.A., Kudelin B.K. Preparation of tritium-labelled dextran and inulin.. *J. Label. Compd. Radiopharm.*, V. 31, no. 3, P.227-230, 1992.
- [265] Baitov A. A., Sidorov G. V., Myasoedov N. F. Solid-Phase Catalytic Reactions of Tritium with Carbohydrates: 1. Influence of Temperature, Catalysts, and Solid Phase Composition on Solid-Phase Catalytic Hydrogenation of D-Ribose with Tritium.. *Radiochemistry*, V. 47, no. 2, P.201-203, 2005..
- [266] Baitov A. A., Sidorov G. V., Myasoedov N. F. Solid-phase catalytic reactions of tritium with carbohydrates. 2. Influence of the support surface area on the solid-phase catalytic hydrogenation of biologically active compounds with tritium.. *Radiokhimiya*., V. 49, no. 1, P.89-90, 2007.
- [267] Baitov A. A., Sidorov G. V., Myasoedov N. F. Solid-phase catalytic reactions of tritium with carbohydrates: 3. Mechanism of isomerization of epimeric pentoses in the course of solid-phase catalytic hydrogenation with tritium.. *Radiochemistry*., V. 49, no. 1, P.100-101, 2007..

- [268] Baitov A. A., Sidorov G. V., Myasoedov N. F. Solid-phase catalytic reactions of tritium with carbohydrates: 4. Mechanism of isomerization of D-glucose in the course of solid-phase catalytic hydrogenation with tritium.. Radiochemistry. , V. 52, no. 5, P.556-560, 2010.
- [269] Baitov A. A., Sidorov G. V., Myasoedov N. F. Solid-phase catalytic reactions of tritium with carbohydrates: 5. Mechanism of isomerization of epimeric disaccharides in the course of solid-phase catalytic hydrogenation with tritium.. Radiochemistry. , V. 53, no. 3, P.332-335, 2011.
- [270] Sidorov G.V., Myasoedov N.F. The synthesis of some tritium-labelled terminators of DNA synthesis. J. Label. Compd. Radiopharm., V. 34, P.353-358, 1994.
- [271] Shevchenko V.P., Nagaev I.Yu., Myasoedov N.F. Isotope exchange between gaseous tritium and lipid-like compounds applied to metallic catalysts.. Radiochemistry., V. 40, P.84-88, 1998.
- [272] Shevchenko V.P., Nagaev I.Yu., Myasoedov N.F. Tritium labeling of biologically active compounds containing aromatic and heterocyclic fragments.. Radiochemistry., V. 44, P.75-80, 2002.
- [273] Sidorov G. V., Myasoedov N. F. Synthesis of tritium-labeled Ganciclovir.. Radiochemistry., V. 53, no. 6, P.646-647, 2011.
- [274] Zolotarev Y. A., Dadayan A. K., Ziganshin R. K., Borisov Y. A., Kozik V. S., Dorokhova E. M., Vaskovsky B. V., Myasoedov N. F. Solid phase reaction of hemoglobin with spillover hydrogen.. Russian Journal of Bioorganic Chemistry., V. 35, no. 1, P.24-32, 2009.
- [275] Zolotarev Y. A., Borisov Y. A., Myasoedov N. F. Experimental and ab initio studies on solid-state hydrogen isotope exchange with spillover tritium.. The Journal of Physical Chemistry A., V. 103, no. 25, P.4861-4864, 1999.
- [276] Zolotarev Yu.A., Dadayan A.K., Borisov Yu.A., Myasoedov N.F. Isotopic effect of electron excitation in L-[³H]tryptophan.. J. Molecular Structure (Theochem)., V. 724, no. 1, P.53-59, 2005.
- [277] Zolotarev Yu.A., Dadayan A.K., Bocharov E.V., Borisov Yu.A., Vaskovsky B.V., Dorokhova E.M, Myasoedov N.F. New development in the tritium labelling of

- peptides and proteins using solid-state catalytic isotopic exchange with spillover-tritium.. *Amino Acids.*, V. 24, no. 4, P.325-333, 2003.
- [278] Zolotarev Y. A., Dadayan A. K., Borisov Y. A., Dorokhova E. M., Kozik V. S., Vtyurin N. N., Bocharov E.V., Ziganshin R.N., Lunina N.A., Kostrov S.V., Ovchinnikova T.V., Myasoedov N. F. The effect of three-dimensional structure on the solid state isotope exchange of hydrogen in polypeptides with spillover hydrogen.. *Bioorganic Chemistry*, V. 31, no. 6, P.453-463, 2003.
- [279] Zolotarev Y. A., Badmaeva K. E., Bakaeva Z. V., Samonina G. E., Kopylova G. N., Dadayan A. K., Zverkova Yu. B., Garaninc S. K., Myasoedov N. F. Short peptide fragments with antiulcer activity from a collagen hydrolysate.. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.*, V. 32, no. 2, P.174-178, 2006.
- [280] Sidorov G.V., Myasoedov N.F. Synthesis of plant hormones labelled by tritium.. *Radiochemistry*, V. 41, no. 6, P.533-536, 1999.
- [281] Sidorov G.V., Myasoedov N.F., Lomin S.N., Romanov G.A. Synthesis of tritium- and deuterium-labeled isopentenyladenine.. *Radiochemistry.*, V. 57, no. 1, P.108-110, 2014.
- [282] Shevchenko V. P., Nagaev I. Y., Shevchenko K. V., Chernysheva M. G., Badun G. A., Fedoseev V. M., Myasoedov N. F. Solid-phase synthesis of deuterium- and tritium-labeled dopamine using carbon nanomaterials.. *Radiochemistry.*, V. 53, no. 3, P.336-340, 2011.
- [283] Shevchenko V. P., Nagaev I. Y., Potapova A. V., Myasoedov N. F. Synthesis of labile nitrogen-containing organic compounds labelled with tritium.. *Radiokhimiya*, V. 27, P.265-269, 1995.
- [284] Klimova O. A., Zolotarev Y. A., Chebotarev V. Y. The preparation of soft-tritium-labeled proteins and their application for the collagenolytic activity investigations.. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, V. 195, no. 2, P.758-761, 1993.
- [285] Zolotarev Y. A., Dorokhova E. M., Nezavibatko V. N., Borisov Y. A., Rosenberg S. G., Velikodvorskaia G. A., Neumivakin L. V., Zveriov V. V., Myasoedov, N. F. The solid-state catalytic synthesis of tritium labeled amino acids, peptides and proteins.. *Amino Acids.*, V. 8, no. 4, P.353-365, 1995.

- [286] Zolotarev Y. A., Bocharov E. V., Dadayan A. K., Kasheverov I. E., Zhmak M. N., Maslennikov I. V., Borisov Yu.A., Arseniev A.S., Muasoedov N.F, Tsetlin V. I. The solid-state catalytic isotope exchange of hydrogen in α -conotoxin G1 by the tritium spillover.. *Bioorg. Khim.*, V. 26, no. 8, P.587-592, 2000.
- [287] Золотарев Ю.А., Дадаян А.К., Козик В.С., Гасанов Е.В., Назимов И.В., Зиганшин Р.Х., Васьковский Б.В., Мурашов А. Н., Ксенофонтов А.Л., Харыбин О.Н., Николаев Е.Н., Мясоедов Н.Ф.Твердофазный изотопный обмен водорода на дейтерий и тритий в генно-инженерном инсулине человека.. *Биоорг. химия.*, V. 40, no. 1, P.25-35, 2014.
- [288] Vog, Preparation of Compounds Labeled with Tritium and Carbon-14., Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2009.
- [289] Wilzbach K.E.Tritium-labeling by exposure of organic compounds to tritium gas. *J. Am. Chem. Soc.*, V. 79, no. 4, p. 1013, 1957.
- [290] Steinberg D., Vaughan M., Anfinsen C. B., Gorry J. Preparation of Tritiated Proteins by the Wilzbach Method.. *Science*, V. 126, no. 3271, P.447-448, 1957.
- [291] Lively M.O., Bush G.A., Mathur B.P., Moran T.F., Powers J.C. Tritium labeling of thermolysin, elastase, and ribonuclease by exposure to tritium gas at low pressure.. *Archives of Biochemistry and Biophysics.*, V. 204, no. 2, p. 589–599, 1980.
- [292] Pany J.A simple apparatus for the tritium-labeling of biological substances at normal temperatures and under reduced pressure is described.. *Naturwissenschaften* , V. 46, p. 515, 1959.
- [293] Rajam P.C., Jackson A.L.In vitro labelling of antibody globulin by tritium exchange.. *Nature*, V. 184, p. 375, 1959.
- [294] Moser H.C., Nordin P., Senne J.K. Labeling carbohydrates by exposure to energetic tritium atoms. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes*, V. 15, no. 9, P.557-559, 1964.
- [295] Дзинтиев Б.Г., Шимчук О.С., Шишков А.В.Исследование замещения водорода под действием ускоренных атомов трития. *Хим. выс. энергий.*, V. 5, P.450-453, 1971.

- [296] Несмеянов А.Н., Дзантиев Б.Г., Филатов Э.С., Шишков А.В. Реакции горячих атомов водорода (трития). Радиохимия, V. 18, P.676-681, 1976.
- [297] Баратова Л.А., Румянцев Ю.М., Симонов Е.Ф., Унукович М.С., Циряпкин В.А., Шишков А.В. Реакции атомарного трития с аминокислотами. Рацемизация L-аланина.. Хим. выс. энергий., V. 15, P.370-373, 1991.
- [298] Yusupov M.M., Spirin A.S. Hot Tritium Bombardment Technique for Ribosome Surface Topography.. Methods Enzymol., V. 164, P.426-439, 1988.
- [299] Badun G.A., Chernysheva M.G., Tyasto Z.A., Kulikova N.A., Kudryavtsev A.V., Perminova I.V. A new technique for tritium labeling of humic substances.. Radiochim. Acta., V. 98, P.161-166, 2010.
- [300] Badun G.A., Chernysheva M.G., Ksenofontov A.L. Increase in the specific radioactivity of tritium-labeled compounds obtained by tritium thermal activation method. Radiochim. Acta., V. 100, no. 6, P.401-408, 2012.
- [301] Langmuir I., Mackey G.M.J. The dissociation of hydrogen into atoms. Part I. Experimental.. J. Am. Chem. Soc., V. 36, P.1708-1722, 1914.
- [302] Langmuir I. The dissociation of hydrogen into atoms. Part II. Calculation of the degree of dissociation and the heat of formation.. J. Am. Chem. Soc., V. 37, P.417-458, 1915.
- [303] Butler D.A., Hayden B.E., Jones J.D. Precursor dynamics in dissociative hydrogen adsorption on W(100).. Chem. Phys. Lett. , V. 217, P.423-429, 1994.
- [304] Смоляков В. С., Циренина М. Л., Ушаков А. Н., Нейман Л. А. Использование метода термической активации трития для введения радиоактивной метки в фосфолипиды. Биоорг. химия, V. 7, no. 2, P.284-288, 1981.
- [305] Shchepina N.E., Avrorin V.V., Badun G.A., Fedoseev V.M., Lewis S.B. New method for the synthesis of difficultly available sterically hindered tritium-labeled pyridinium derivatives. Chemistry of Heterocyclic Compounds , V. 46, no. 5, P.547-552, 2010.
- [306] Шишков А. В., Филатов Э. С., Симонов Е. Ф., Унукович М. С., Гольданский В. И., Несмеянов А. Н. Получение меченных тритием биологически активных соединений.. Докл. АН СССР, V. 228, P.1237-1239, 1976.

- [307] Yusupov M.M., Spirin A.S. Are there proteins between the ribosomal subunits?. FEBS Lett, V. 197, no. 1-2, P.229-233, 1986.
- [308] Goldanskii V. I., Kashirin I. A., Shishkov A. V., Baratova L. A., Grebenshchikov N. I. The use of thermally activated tritium atoms for structural-biological investigations: the topography of the TMV protein-accessible surface of the virus.. J. Mol. Biol., V. 201, P.567-574, 1988.
- [309] Shishkov A. V., Goldanskii V. I., Baratova L. A., Fedorova N. V., Ksenofontov A. L., Zhirnov O. P., Galkin A. V. The in situ spatial arrangement of the influenza A virus matrix protein M1 assessed by tritium bombardment.. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, V. 96, P.7827-7830, 1999.
- [310] Badun G.A., Chemysheva M.G., Tyasto Z.A., Kulikova N.A., Kudryavtsev A.V., Perminova I.V. A new technique for tritium labeling of humic substances.. Radiochimica Acta, V. 98, no. 3, P.161-166, 2010.
- [311] Badun G.A., Pozdnyakova V.Yu, Kudryavtsev A.V., Perminova I.V. Preparation of tritium-labeled humic substances using thermal activation method. Bulgarian J. of Ecological Science, V. 2, no. 3-4, P.26-27, 2003.
- [312] Дубинская А. М. Взаимодействие атомов водорода с твёрдыми органическими веществами. Успехи химии, V. 47, no. 7, P.1169-1199, 1978.
- [313] Филатов Э. С., Симонов Е. Ф., Орлова М. А. Реакционная способность атомов водорода. Успехи химии, V. 50, no. 12, P.2167-2197, 1981.
- [314] Шишков А. В., Нейман Л. А., Смоляков В. С. Получение меченых органических соединений действием атомарного трития.. Успехи химии, V. 53, no. 7, P.1125-1151, 1984.
- [315] Нейман Л. А. Введение трития в биологически активные соединения с помощью обменных методов. Успехи химии, V. 50, no. 2, P.196-224, 1981.
- [316] Филатов Э. С., Симонов Е. Ф., Шишков А. В., Могильников В. П. Получение а-аланина-3Н воздействием атомарного трития, нагретого до 2000 К, на твердую мишень аланина при 77 К.. Радиохимия, V. 21, no. 6, P.909-913, 1979.

- [317] Бадун Г.А., Ксенофонтов А.Л., Лукашина Е.В., Позднякова В.Ю., Федосеев В.М. Сравнительное исследование взаимодействия атомарного трития с глюкозамином и аминокислотами. Радиохимия, V. 47, no. 3, P.281-283, 2005.
- [318] Сидоров Г.В., Бадун Г.А., Баитова Е.А., Баитов А.А., Платошина А.М., Мясоедов Н.Ф., Федосеев В.М. Сравнительное изучение реакций термически активированного трития и твердофазной каталитической гидрогенизации тритием с сахарами и диазинами. Радиохимия, V. 47, no. 3, P.284-288, 2005.
- [319] Гольдманский В. И., Румянцев Ю. М., Шишков А. В., Баратова Л. А., Белянова Л. П. Исследование пространственной структуры белков при помощи тритиевой метки. I. Свободные аминокислоты как модель остатков в развернутой полипептидной цепи.. Молекулярн. биология., V. 16, P.117-122, 1982.
- [320] Гольдманский В.И., Румянцев Ю.М., Шишков А.В., Баратова Л.А., Белянова Л.П. Исследование пространственной структуры белков при помощи тритиевой метки. II. Внутримолекулярное распределение трития в N-концевой части миоглобина и третичная структура белка.. Молекулярн. биология., V. 16, P.528-534, 1982.
- [321] Богачева Е.Н., Шишков А.А., Шишков А.В., Баратова Л.А. Понятие "доступная поверхность" белка в рамках метода тритиевой планиграфии. Эксперимент и расчет.. Молекуляр. биол. , V. 28, no. 5, P.1035-1043, 1994.
- [322] Гедрович А.В., Баратова Л.А., Богачева Е.Н., Медведкин В.Н., Шишков А.В. Количественное определение доступной поверхности глобулярных белков методом тритиевой планиграфии.. Молекуляр. биол., V. 27, no. 2, P.309-315, 1993.
- [323] Бадун Г.А., Михалина Е.В., Тясто З.А. Определение вероятности реакции атомов трития с полиэтиленом при первом соударении в условиях метода термической активации.. Радиохимия, V. 48, no. 5, P.468-469, 2006.
- [324] Бадун Г.А., Костин А.И., Филатов Э.С. Реакции атомов трития с полиэтиленом в интервале температур 290 — 55 К. Радиохимия, V. 2, P.222 - 227, 1985.

- [325] Филатов Э.С., Орлова М.А., Симонов Е.Ф. Реакции атомов трития с фенилаланином и тирозином в интервале температур 77—400 К. Вестник Московского университета. Серия 2: Химия., V. 21, no. 1, P.49-52, 1980.
- [326] Шишкова А. В., Нейман Л. А., Смоляков В. С. Получение меченых органических соединений действием атомарного трития. Успехи химии, V. 53, no. 7, P.1125-1151, 1984.
- [327] Гольданский В.И., Шишков А.В., Богачева Е.Н., Баратова Л.А., Спирин А.С., Колб В.А., Тритиевая планиграфия биологических макромолекул., Москва: Наука, 1999, p. 175.
- [328] Бадун Г.А., Федосеев В.М. Проницаемость липидных мембран для атомарного трития или эффект «соскальзывания» атомов и его роль в методе тритиевой планиграфии.. Радиохимия, V. 43, no. 3, P.267-271, 2001.
- [329] Badun G. A., Fedoseev V. M. Permeability of lipid membranes for atomic tritium or atom “slipping” effect and its role in tritium planigraphy.. Radiochemistry., V. 43, no. 3, P.301-305, 2001.
- [330] Нейман Л. А., Антропова Л. П., Залеская М. А., Будовский Э. И. Введение тритиевой метки в РНК и белок бактериофага MS2.. Биоорг. химия, V. 12, no. 8, P.1070-1072, 1986.
- [331] Баратова Л. А., Богачева Е. Н., Гольданский В. И., Колб В. А., Спирин А. С., Шишков А. В., Тритиевая планиграфия биологических макромолекул., V. 63, М.: Наука, 1999.
- [332] Shishkov A. V., Baratova L. A. Tritium planigraphy of biological systems.. Russian Chemical Reviews., V. 63, no. 9, P.781-796, 1994.
- [333] Volynskaya A.V., Kasumiv E.A., Bogacheva E.N., Shishkov A.V., Goldanskii V.I. Determination of the accessible surface of globular proteins by means of tritium planigraphy.. Eur. Biophys. J., V. 23, P.139-143, 1994.
- [334] Bobkova E. V., Gedrovitch A. V., Ankilova V. N., Lavrik O. I., Baratova L. A., Shishkov A. V. Comparative study of the phenylalanyl-tRNA synthetases from Escherichia coli and Thermus thermophilus by the tritium topography method.. Biochemistry International., V. 20, no. 5, P.1001-1009, 1990.

- [335] Gedrovich A.V., Badun G.A. Studying a spatial structure of globular proteins using method of tritium planigraphy. Short peptides as a model of completely unfolded polypeptide chain.. *Mol.Biol.*, V. 26, P.558-563, 1992.
- [336] Baratova L.A., Bogacheva E.N., Gol'danskii V.I., Kolb V.A., Spirin F.S., Shishkov A.V., Tritium planigraphy of biological macromolecules., Moscow: Nauka, 1999, p. 174.
- [337] Agafonov D. E., Kolb V. A., Spirin A. S. Proteins on ribosome surface: Measurements of protein exposure by hot tritium bombardment technique.. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, V. 94, no. 24, P.12892-12897, 1997.
- [338] Goldanskii V. I., Kashirin I. A., Shishkov A. V., Baratova L. A., Grebenshchikov N. I. The use of thermally activated tritium atoms for structural-biological investigations: The topography of the TMV protein-accessible surface of the virus.. *J. Mol. Biol.* , V. 201, no. 3, P.567-574, 1988.
- [339] Dobrov E. N., Badun G. A., Lukashina E. V., Fedorova N. V., Ksenofontov A. L., Fedoseev V. M., Baratova L. A. Tritium planigraphy comparative structural study of tobacco mosaic virus and its mutant with altered host specificity.. *Eur. J. Biochem.*, V. 270, P.3300-3308, 2003.
- [340] Baratova L.A., Grebenshchikov N.I., Dobrov E.N., Gedrovich A.V., Kashirin I.A., Shishkov A.V., Efimov A.V., Jarvekulg L., Radavsky Yu.L., Saarma M. The organization of potato virus X coat proteins in virus particles studied by tritium planigraphy and model building. , 188(1), 175–180.. *Virology.*, V. 188, no. 1, P.175-180, 1992.
- [341] Baratova L.A., Efimov A.V., Dobrov E.N., Fedorova N.V., Hunt R., Badun G.A., Ksenofontov A.L., Torrance L., Jarvekulg L. In situ spatial organization of potato virus A coat protein subunits as assessed by tritium bombardment.. *J. Virol.* , V. 75, P.9696-9702, 2001.
- [342] Shishkov A. V., Goldanskii V. I., Baratova L. A., Fedorova N. V., Ksenofontov A. L., Zhirnov O. P., Galkin A. V. The in situ spatial arrangement of the influenza A virus matrix protein M1 assessed by tritium bombardment.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, V. 96, no. 14, P.7827-7830, 1999.

- [343] Bogacheva E. N., Dolgov A. A., Chulichkov A. L., Shishkov A. V., Ksenofontov A. L., Fedorova N. V., Baratova L. A. Tritium planigraphy: Differences in the spatial structures of the influenza virus M1 protein in crystal, solution, and virion.. Russian Journal of Bioorganic Chemistry., V. 38, no. 1, P.56-63, 2012.
- [344] Lukashina E. V., Badun G. A., Chulichkov A. L. Atomic tritium as an instrument for study of protein behavior at the air–water interface.. Biomolecular Engineering, V. 24, no. 1, P.125-129, 2007.
- [345] Chernysheva M.G., Badun G.A., Razzhivina I.A., Ksenofontov A.L. Self-organization of lysozyme—Ionic surfactant complexes at the aqueous-air interface as studied by tritium bombardment.. Colloids Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects, V. 520, P.1-8, 2017.
- [346] Chauhan S., Chauhan M. S., Sharma P., Rana D. S. Thermodynamics and micellization of cetyltrimethyl ammonium bromide in the presence of lysozyme.. Journal of Molecular Liquids., V. 187, P.1-6, 2013.
- [347] Niese S. The discovery of organic solid and liquid scintillators by H. Kallmann and L. Herforth 50 years ago. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, V. 241, no. 3, P.499-501, 1999.
- [348] L. M. F., Handbook of Radioactivity Analysis., Elsevier, 2003.
- [349] Chernysheva M.G., Badun G.A. Liquid scintillation spectrometry of tritium in studying lysozyme behavior in aqueous/organic liquid systems. The influence of the organic phase.. Langmuir, V. 27, no. 6, P.2188-2194, 2011.
- [350] Chernysheva M.G., Tyasto T.A., Badun G.A. Scintillation phase method: A new approach for studying surfactant behavior at liquid/liquid interface.. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, V. 280, no. 2, P.303-306, 2009.
- [351] Badun G. A., Chernysheva M. G., Pozdnyakova V. Y., Fedoseev V. M. A new version of the scintillation phase procedure.. Radiochemistry, V. 47, no. 6, P.584-588, 2005.
- [352] Алентьев А.Ю., Филатов Э.С. Радиометрический метод исследования межфазных границ двух несмешивающихся жидкостей.. Радиохимия, V. 54, no. 6, P.80-87, 1991.

- [353] Chernysheva M. G., Badun G. A. Ionic surfactant adsorption at aqueous/organics interfaces determined by a scintillation phase method.. *Mendelev Communications.*, V. 21, no. 2, P.99-100, 2011.
- [354] Badun G.A., Soboleva O.A., Chernysheva M.G. Surfactant adsorption at the water–p-xylene interface as studied by the scintillation phase method.. *Mendelev Communications*, V. 17, no. 6, P.357-358, 2007.
- [355] Pelekh V.V., Alent'ev A.Yu, Yampol'skaya G.P., Izmailova V.N.Effect of alkali metal chlorides on the distribution of serum albumin in the water - interfacial adsorption layer - toluene system. 1. Accumulation of protein at the interface and its concentration in the hydrocarbon phase.. *Коллоидн. журн*, V. 60, no. 2, P.235-238, 1998.
- [356] Pelekh V.V., Alent'ev A.Yu, Yampol'skaya G.P., Izmailova V.N.Effect of alkali metal chlorides on the distribution of serum albumin in the water - interfacial adsorption layer - toluene system. 2. Effect of salts on the equilibrium distribution of protein in the system.. *Коллоидный журнал*, V. 60, no. 2, P.239-244, 1998.
- [357] Izmailova V. N., Pelekh V. V., Yampol'skaya G. P.Structurization and Rheological Properties of Interfacial Adsorption Layers of Bovine Serum Albumin at the Aqueous Solutionframe0Toluene Interface in the Presence of Alkali Metal Chlorides.. *Коллоидный журнал*, V. 60, no. 3, p. 319, 1996.
- [358] Chernysheva M.G., Soboleva O.A., Badun G.A. Competitive adsorption and interactions between lysozyme and ionic surfactants in an aqueous/organic liquid system.. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.*, V. 409, P.130-137, 2012.
- [359] Чернышева М.Г., Разживина И.А., Соболева О.А., Бадун Г.А.Радиохимический подход в исследовании конкурентной адсорбции сывороточного альбумина человека и ионогенных поверхностно-активных веществ на границе раздела вода/п-ксилол.. *Радиохимия*, V. 55, no. 2, P.180-185, 2013.
- [360] Chernysheva M.G., Ivanov R.A., Soboleva O.A., Badun G.A.Do low surfactants concentrations change lysozyme colloid properties?. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, V. 436, P.1121-1129, 2013.

- [361] Ivanov R.A., Soboleva O.A., Chernysheva M. G., Badun G.A. Adsorption and distribution of components of cocoamidopropyl betaine-lysozyme mixtures in water/octane system.. Colloid Journal., V. 76, no. 3, P.319-326, 2014.
- [362] Demina T., Grozdova I., Krylova O., Zhirnov A., Istratov V., Frey H., Kautz H., Melik-Nubarov N. Relationship between the structure of amphiphilic copolymers and their ability to disturb lipid bilayers.. Biochemistry., V. 44, no. 10, P.4042-4054, 2005.
- [363] Patist A., Bhagwat S. S., Penfield K. W., Aikens P., Shah D. O. On the measurement of critical micelle concentrations of pure and technical-grade nonionic surfactants.. J. Surfactant Deterg., V. 3, no. 1, P.53-58, 2000.
- [364] Будкина О.А. Структурно-функциональные закономерности воздействия амфифильных блок-сополимеров на раковые клетки: автореферат диссертации на соискание степени кандидата химических наук. 2015.
- [365] Hait S. K., Moulik S. P. Determination of critical micelle concentration (CMC) of nonionic surfactants by donor-acceptor interaction with iodine and correlation of CMC with hydrophile-lipophile balance and other parameters of the surfactants.. Journal of Surfactants and Detergents., V. 4 (3), P.303-309, 2001.
- [366] Pisev I. V., Soboleva O. A., Ivanova N. I. Adsorption of Brij 35- dodecylpyridinium bromide mixtures at air-aqueous solution and Teflon-aqueous solution interfaces.. Colloid J., V. 71, no. 2, P.246-251, 2009.
- [367] Wanka G., Hoffmann H., Ulbricht W. The aggregation behavior of poly-(oxyethylene)-poly-(oxypropylene)-poly-(oxyethylene)-block-copolymers in aqueous solution. Colloid Polym. Sci., V. 268, no. 2, P.101-117, 1990.
- [368] Ghosh S., Kuchlyan J., Banik D., Kundu N., Roy A., Banerjee C. Organic additive, 5-methyl salicylic acid, induces spontaneous structural transformation of aqueous pluronic triblock copolymer solution: a spectroscopic investigation of interaction of curcumin with pluronic micellar and vesicular aggregates.. J. Phys. Chem. B, V. 118, no. 39, p. 11437–11448, 2004.
- [369] Lakowicz J.R. , Principles of fluorescence spectroscopy., Springer., 2006.

- [370] Moore S., Spackman D.H., Stein W. H. Chromatography of amino acids on polystyrene resins. An improved system.. *Anal. Chem.*, V. 30, P.1185-1190, 1958.
- [371] Wang J., Yang X., Wang J., Xu C., Zhang W., Liu R., Zong W. Probing the binding interaction between cadmium(II) chloride and lysozyme.. *New J. Chem.*, V. 40, p. 3738–3746, 2016.
- [372] Blanchet C.E., Spilotros A., Schwemmer F., Graewert M.A., Kikhney A., Jeffries C.M., Franke D., Mark D., Zengerle R., Cipriani F., Fiedler S., Roessle M., Svergun D.I. Versatile sample environments and automation for biological solution X-ray scattering experiments at the P12 beamline (PETRA III, DESY).. *J. Appl. Crystallogr.*, V. 48, P.431-443, 2015.
- [373] Feigin L.A., Svergun D.I. , *Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering.*, Boston: Springer US., 1987.
- [374] Franke D., Petoukhov M. V., Konarev P. V., Panjkovich A., Tuukkanen A., Mertens H.D.T., Kikhney A.G., Hajizadeh N.R., Franklin J.M., Jeffries C.M., Svergun D.I. ATSAS 2.8: A comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions.. *J. Appl. Crystallogr.*, V. 50, P.1212-1225, 2017.
- [375] Konarev P. V., Volkov V. V., Sokolova A. V., Koch M.H.J., Svergun D.I. PRIMUS: A Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis.. *J. Appl. Crystallogr.*, V. 36, P.1277-1282, 2003.
- [376] Guinier A., Fournet G. , *Small Angle Scattering of X-Rays.*, New York: Wiley, 1955.
- [377] Svergun D., Barberato C., Koch M.H. CRY SOL - A program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J. Appl. Crystallogr.*, V. 28, P.768-773, 1995.
- [378] Porod G. General theory.. in *Small-Angle X-Ray Scatt.*, London, Academic P, 1982, P.17-51.
- [379] Svergun D.I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria.. *J. Appl. Crystallogr.* , V. 25, P.495-503, 1992.

- [380] Levashov P.A., Sedov S.A., Shipovskov S., Belogurova N.G., Levashov A.V. Quantitative turbidimetric assay of enzymatic gram-negative bacteria lysis.. *Anal. Chem.*, V. 82, no. 5, P.2161-2163, 2010.
- [381] 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 Surface. B.*, V. 88, no. 1, P.131-133, 2011.
- [382] Yano Y. F., Kobayashi Y., Ina T., Nitta K., Uruga T. Hofmeister anion effects on protein adsorption at an air–water interface.. *Langmuir*, V. 32, no. 38, P.9892-9898, 2016.
- [383] Boström M., Parsons D. F., Salis A., Ninham B. W., Monduzzi M. Possible origin of the inverse and direct hofmeister series for lysozyme at low and high salt concentrations.. *Langmuir*, V. 27, no. 15, p. 9504– 9511, 2011.
- [384] Jia Y., Liu X. Y. From surface self-assembly to crystallization: prediction of protein crystallization conditions.. *J. Phys. Chem. B*, V. 110, no. 13, P.6949-6955, 2006.
- [385] Su Y., Wei X., Liu H. Effect of sodium chloride on association behavior of poly (ethylene oxide)–poly (propylene oxide)–poly (ethylene oxide) block copolymer in aqueous solutions.. *Journal of Colloid and Interface Science.*, V. 264, no. 2003, P.526-531, 2003.
- [386] Day J.P.R., Pudney P.D.A., Bain C.D. Ellipsometric study of the displacement of milk proteins from the oil–water interface by the non-ionic surfactant C10E8.. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, V. 12, P.4590-4599, 2010.
- [387] Daley K.R., Kubarych K.J. An “iceberg” coating preserves bulk hydration dynamics in aqueous PEG solutions.. *J. Phys. Chem. B.*, V. 121, P.10574-10582, 2017.
- [388] Duman O., Tunç S., Kancı Bozoğlan B. Characterization of the Binding of Metoprolol Tartrate and Guaifenesin Drugs to Human Serum Albumin and Human Hemoglobin Proteins by Fluorescence and Circular Dichroism Spectroscopy.. *J. Fluoresc.*, V. 23, P.659-669, 2013.
- [389] Pirzadeh P., Moosavi-Movahedi A. A., Hemmateenejad B., Ahmad F., Shamsipur M., Saboury A. A. Chemometric studies of lysozyme upon interaction with sodium

- dodecyl sulfate and β -cyclodextrin.. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces/, V. 52, no. 1, P.31 - 38, 2006.
- [390] Glazer A.N., Smith E.L.Studies on the ultraviolet difference spectra of proteins and polypeptides.. J. Biol. Chem., V. 236 , p. 2942–2947, 1961.
- [391] Kuznetsova I.M., Biktashev A.G., Lubov M., Bushmarina N.A.Understanding the contribution of individual tryptophan residues to intrinsic lysozyme.. Protein Pept. Lett., V. 7, no. 6, P.411-420, 2000.
- [392] Albani J. R. New insights in the interpretation of tryptophan fluorescence: Origin of the fluorescence and characterization of a new fluorescence parameter in proteins: The emission to excitation ratio.. Journal of Fluorescence., V. 17, no. 4, P.406-417, 2007.
- [393] Fan Y.Q., Liu H.J., Li C.; Luan Y.S.; Yang J.M.; Wang Y.L.Inactivation of recombinant human brain-type creatine kinase during denaturation by guanidine hydrochloride in a macromolecular crowding system.. Appl. Biochem. Biotechnol., V. 169, P.268-280, 2013.
- [394] Naseem F., Khan R. H. Effect of Ethylene Glycol and Polyethylene Glycol on the Acid-Unfolded State of Trypsinogen.. Journal of Protein Chemistry., V. 22(7/8), P.677-682, 2003.
- [395] Zunszain P. A., Ghuman J., Komatsu T., Tsuchid, E., Curry, S.Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid.. BMC structural biology, V. 3, no. 1, 2003.
- [396] Nigam S., Durocher G.Spectral and photophysical studies of inclusion complexes of some neutral 3H-indoles and their cations and anions with β -cyclodextrin.. The Journal of Physical Chemistry., V. 100, no. 17, P.7135-7142, 1996.
- [397] Muszanska A. K., Busscher H. J., Herrmann A., van der Mei H. C., Norde W.Pluronic-lysozyme conjugates as anti-adhesive and antibacterial bifunctional polymers for surface coating.. Biomaterials., V. 32, P.6333-6341, 2011.
- [398] Aumiller W.M., Davis B.W., Hatzakis E., Keating C.D. Interactions of macromolecular crowding agents and cosolutes with small-molecule substrates:

- Effect on horseradish peroxidase activity with two different substrates.. J. Phys. Chem. B, V. 118, P.10624-10632, 2014.
- [399] Schleifer K. H., Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications.. Bacteriol. Rev. , V. 36, no. 4, P.407-477, 1972.
- [400] Sasahara K. Colloid & Polymer Science.. Temperature dependence of volume changes on glycine-PEG and L-alanine-PEG in aqueous solution. , V. 273, no. 8, P.782-786, 1995.
- [401] Shahid S., Ahmad F., Hassan M.I., Islam A. Relationship between protein stability and functional activity in the presence of macromolecular crowding agents alone and in mixture: an insight into stability-activity trade-off.. Arch. Biochem. Biophys., V. 584, P.42-50, 2015.
- [402] Chukhray E. S., Veselova M. N., Poltorac O. M., Voznessenskaya V. V., Zinkevich E. P., Wysocki C. J. Phosphatase Activity of Rat Olfactory and Vomeronasal Epithelial Tissue.. Chemical Signals in Vertebrates., V. 6, P.43-47, 1992.
- [403] Полторак О.М., Левашов П. А., Чухрай Е.С.Обобщенное уравнение Хилла и кинетика реакций, осуществляемых белковыми комплексами.. Журн. физ. химии., V. 69, no. 3, P.511-514, 1995.
- [404] Hill A. V. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves.. J. Physiol., V. 40, no. VI—VII, 1910.
- [405] Гудков Д.А., Вотчицева Ю.А., Ефременко Е.Н. Гидролиз параоксона, катализируемый органофосфатгидролазой, содержащей полигистидиновую последовательность на С-конце молекулы белка. Вестн. Мос. Ун-та. Серия 2. Химия., V. 47, no. 1, P.15-19, 2006.
- [406] Ritchie D. W., Kemp G. J. L. Protein docking using spherical polar Fourier correlations.. Proteins: Structure, Function, and Genetics., V. 39, no. 2, P.178-194, 2000.
- [407] Blake C. C. F., Mair G. A., North A. C. T., Phillips D. C., Sarma V. R. On the Conformation of the Hen Egg-White Lysozyme Molecule.. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. , V. 167(1009), P.365-377, 1967.

- [408] Bhat I.A., Bhat W.F., Akram M., Kabir-ud-Din. Interaction of a novel twin-tailed oxy-diester functionalized surfactant with lysozyme: Spectroscopic and computational perspective.. *Int. J. Biol. Macromol.* , V. 109, P.1006-1011, 2018.
- [409] Wang Y., Jiang X., Zhou L., Yang L., Xia G., Chen Z., Duan M. Synthesis and binding with BSA of a new gemini surfactant.. *Physicochem. Eng. Asp.* , V. 436, P.1159-1169, 2013.