



**Плющенко Анна Викторовна**

**Супрамолекулярные комплексы химотрипсина с наночастицами  
селена и серебра**

03.01.02 – Биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Санкт-Петербург

2021

Работа выполнена в научно-учебной лаборатории физико-химических методов исследования полимерных наносистем и биотехнологических продуктов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук».

**Научный руководитель:**

Гаркушина Ирина Сергеевна, кандидат технических наук

**Консультант:**

Писарев Олег Александрович, кандидат химических наук, доцент

**Официальные оппоненты:**

Касьяненко Нина Анатольевна, доктор физико-математических наук, профессор, профессор кафедры молекулярной биофизики и физики полимеров Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Рожков Сергей Павлович, доктор биологических наук, старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник Института биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук»

Черкасов Владимир Рюрикович, кандидат химических наук, заместитель заведующего лаборатории нанобиотехнологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»

Защита состоится «31» мая 2021 г. в 14:00 на заседании диссертационного совета У.03.01.02 федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» (195251, г. Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29) по адресу: г. Санкт-Петербург, ул. Хлопина 11, корп. 1, Высшая школа биомедицинских систем и технологий, ауд. 209.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте [https://www.spbstu.ru/science/the-department-of-doctoral-studies/defences-calendar/the-degree-of-candidate-of-sciences/plyushchenko\\_anna\\_viktorovna/](https://www.spbstu.ru/science/the-department-of-doctoral-studies/defences-calendar/the-degree-of-candidate-of-sciences/plyushchenko_anna_viktorovna/) ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого».

Автореферат разослан: « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат физико-математических наук

Забродская Яна Александровна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы диссертационного исследования.** За последние несколько десятилетий широкое распространение получили терапевтические и диагностические системы на основе наночастиц. При этом обнаружилось, что введение наночастиц в физиологическую систему приводит к адсорбции биомолекул (в основном белков) на поверхности наночастиц. Образование так называемой белковой «короны» не только приводит к снижению эффективности наносистем, но и оказывает значительное влияние на взаимодействие наночастиц с клетками [Chakraborty, Ethiraj, Mukherjee, 2020]. В связи с этим актуально исследование межмолекулярных взаимодействий наночастиц различной природы с белками, а также свойств образующихся супрамолекулярных комплексов.

Протеолитические ферменты являются модельными объектами для исследований физико-химических изменений, происходящих при взаимодействиях между наночастицами и белками. Наиболее часто используемым ферментом в такого рода исследованиях является  $\alpha$ -химотрипсин (ХТ), при этом его химическая структура и механизм действия хорошо изучены. Поэтому для исследования межмолекулярных взаимодействий наночастиц с белками в качестве модельного объекта был выбран ХТ.

Связывание ферментов с наночастицами осуществляют как ковалентно (напрямую – хемосорбция, или посредством связующего агента – спейсера), так и нековалентно (физическая адсорбция). При этом используют как немодифицированные наночастицы, так и наночастицы, модифицированные различными функциональными группами. Для исследования особенностей образования супрамолекулярных комплексов наночастиц с белками в биологических средах особенно актуальным представляется изучение межмолекулярных взаимодействий, возникающих при адсорбции ферментов непосредственно на поверхности наночастиц без использования дополнительных связующих агентов.

В литературе имеется большое число работ, посвященных исследованиям взаимодействий протеолитических ферментов, в частности ХТ, с магнитными наночастицами [Lee et al, 2011; Dyshlyuk, Novoselova, Rozalenok, 2013]. Однако слабо представлены исследования физико-химических взаимодействий протеолитических ферментов с наночастицами, обладающими собственной биологической активностью, такими как наночастицы диоксида титана, сульфида цинка, золота, серебра, селена. Особое внимание привлекают наночастицы серебра (НЧ-Ag), исследованиям антимикробных свойств, механизмов и спектра действия которых посвящено большое число научных работ [Yan et al, 2018; Salomoni et al, 2017; Mann, Fisher, 2018], а также наночастицы селена (НЧ-Se), проявляющие противоопухолевую и антимикробную активность в отношении бактерий и

грибов и способность разрушать биопленки [Tan et al, 2018; Hosnedlova et al, 2018]. В настоящий момент в мировой литературе практически отсутствуют исследования межмолекулярных взаимодействий, возникающих в результате непосредственной адсорбции протеолитического фермента ХТ на поверхности НЧ-Ag и НЧ-Se.

Вместе с тем, создание комплексов для использования в качестве модельных систем при исследовании межмолекулярных взаимодействий белков с наночастицами различной природы, возникающих в результате физической адсорбции в биологических системах, а также изучение физико-химических свойств супрамолекулярных комплексов, в которых каждая составляющая обеспечивает различную биологическую активность, являются актуальными задачами современной молекулярной биофизики. Исследование физико-химических взаимодействий протеолитических ферментов с наночастицами, обладающими антибактериальной активностью, позволит создать основы для разработки лекарственных препаратов, сочетающих протеолитические и антибактериальные свойства.

**Цель работы** состояла в разработке условий получения и определении физико-химических свойств супрамолекулярных комплексов ХТ с НЧ-Se и НЧ-Ag в качестве модельных систем для исследования межмолекулярных взаимодействий белков с наночастицами.

Для реализации данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработать условия получения супрамолекулярных комплексов ХТ с НЧ-Se и НЧ-Ag для использования в качестве модельных систем при исследовании межмолекулярных взаимодействий белков с наночастицами (гидрофобных, электростатических, гидрофобных в сочетании с электростатическими).
2. Показать формирование супрамолекулярных комплексов Se-ХТ и Ag-ХТ и определить их спектральные характеристики методом УФ- и видимой спектрофотометрии.
3. Определить методами просвечивающей электронной микроскопии и динамического рассеяния света размерные характеристики супрамолекулярных комплексов Se-ХТ и Ag-ХТ.
4. Определить влияние рН среды на седиментационную устойчивость супрамолекулярных комплексов Se-ХТ и Ag-ХТ.
5. Оценить протеолитические свойства супрамолекулярных комплексов Se-ХТ и Ag-ХТ.
6. Оценить антибактериальную активность супрамолекулярных комплексов Ag-ХТ.

**Объектами исследования** диссертационной работы являлись полученные автором диссертации супрамолекулярные комплексы Se-ХТ и Ag-ХТ.

**Предметом** исследования являлась природа межмолекулярных взаимодействий фермента ХТ с НЧ-Se и НЧ-Ag и физико-химические свойства модельных супрамолекулярных комплексов.

**Научная новизна** работы состоит в том, что в ней впервые разработаны условия получения супрамолекулярных комплексов протеолитического фермента ХТ с НЧ-Ag и НЧ-Se, обладающих полифункциональной биологической активностью, для использования в качестве модельных систем при исследовании межмолекулярных взаимодействий белков с наночастицами различной природы, возникающих в результате физической адсорбции. В работе впервые изучено влияние межмолекулярных взаимодействий протеолитического фермента ХТ с НЧ-Se и НЧ-Ag на характеристики супрамолекулярных комплексов Se-ХТ и Ag-ХТ методами УФ- и видимой спектрофотометрии, просвечивающей электронной микроскопии и динамического рассеяния света, определены условия седиментационной устойчивости супрамолекулярных комплексов Se-ХТ и Ag-ХТ. Впервые установлено повышение протеолитической активности ХТ в составе супрамолекулярных комплексов в сравнении с нативным ферментом при рН 11.0, а также установлена антибактериальная активность НЧ-Ag в составе комплексов Ag-ХТ.

**Теоретическая и практическая значимость.** Теоретическая значимость диссертационной работы заключается в том, что результаты проведенных исследований могут быть использованы для изучения межмолекулярных взаимодействий белков с наночастицами различной природы, возникающих в результате физической адсорбции в биологических системах. Полученные супрамолекулярные комплексы на основе ХТ и НЧ-Ag являются основой для создания раневого покрытия, обладающего как антибактериальной, так и протеолитической активностью, что обуславливает практическую значимость диссертационной работы.

**Методология и методы исследования.** Супрамолекулярные комплексы ХТ с НЧ-Se и НЧ-Ag были исследованы методами УФ- и видимой спектрофотометрии, динамического рассеяния света (ДРС), а также просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Обработку микрофотографий, полученных методом ПЭМ, осуществляли с помощью программы ImageJ 1.52n.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Супрамолекулярные комплексы Se-ХТ могут быть использованы в качестве модельной системы при исследовании гидрофобных межмолекулярных взаимодействий белков с наночастицами. Супрамолекулярные комплексы Ag-ХТ могут быть использованы в качестве модельной системы при исследовании как преимущественно электростатических взаимодействий белков с наночастицами, так и гидрофобных взаимодействий в сочетании с электростатическими.
2. Реализация гидрофобных взаимодействий между ХТ и НЧ-Se может приводить к изменению условий седиментации комплексов в сравнении с нативным ферментом,

зависящих от концентрации Se. Сочетание двух типов межмолекулярных взаимодействий (гидрофобных и электростатических) при формировании супрамолекулярных комплексов Ag-ХТ-I может предотвращать агрегацию НЧ-Ag, в результате чего комплексы Ag-ХТ-I сохраняют седиментационную устойчивость в диапазоне рН среды от 3.0 до 12.0.

3. Удельная протеолитическая активность ХТ в составе комплексов Se-ХТ в сравнении с нативным ферментом, а также протеолитическая активность комплексов Ag-ХТ-II/1 в сравнении с нативным ХТ и комплексами Ag-ХТ-I увеличиваются при рН 11.0. При этом увеличение концентрации Se в комплексе приводит к ускорению ферментативной реакции гидролиза и повышению протеолитической активности ХТ.
4. НЧ-Ag в составе супрамолекулярных комплексов с ХТ проявляют антибактериальную активность в отношении культур *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *E. coli*. Изменение концентрации ХТ не влияет на проявление антибактериальных свойств НЧ-Ag. Минимальная концентрация НЧ-Ag, подавляющая рост микроорганизмов, составляет 0.1 мг/мл вне зависимости от концентрации ХТ.

**Достоверность полученных результатов** обусловлена соответствием используемых методов поставленным задачам с учетом особенностей изучаемых объектов, воспроизводимостью результатов и согласованностью данных различных методов, принципиальным согласием с существующими в литературе представлениями о потенциальных возможностях подобных взаимодействий при комплексообразовании наночастиц с белками и применением методов статистического анализа данных.

**Личный вклад автора.** Лично автором были выполнены анализ и обобщение имеющихся в литературе данных по теме диссертационного исследования, поставлены цели и задачи работы, определены условия получения седиментационно устойчивых супрамолекулярных комплексов, исследованы их спектральные и размерные характеристики методами УФ- и видимой спектрофотометрии и динамического рассеяния света, исследована протеолитическая активность, обработаны и проанализированы экспериментальные данные.

**Апробация результатов исследования.** Основные результаты диссертационного исследования были представлены на следующих конференциях: международная научно-техническая конференция «Нанотехнологии функциональных материалов (НФМ'12)» (Санкт-Петербург, 2012); Вторая Всероссийская молодежная научно-техническая конференция с международным участием "Инновации в материаловедении" (Москва, 2015); VI и VIII Всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2016, 2018); VI Международная конференция с элементами научной школы для молодежи "Функциональные наноматериалы и высокочистые вещества" (Суздаль, 2016 (2 доклада)); XIV и XV Российская ежегодная

конференция молодых научных сотрудников и аспирантов «Физико-химия и технология неорганических материалов» (Москва, 2017, 2018); Всероссийский симпозиум с международным участием «Физико-химические проблемы адсорбции в нанопористых материалах» (Москва-Клязьма, 2018); Четвертый междисциплинарный научный форум с международным участием "Новые материалы и перспективные технологии" (Москва, 2018); XLIV, XLV, XLVI и XLVII конференции с международным участием «Неделя науки СПбПУ» (Санкт-Петербург, 2015 (2 доклада), 2016, 2017, 2018 (2 доклада)); Международная научно-техническая конференция молодых ученых «Инновационные материалы и технологии» (Минск, 2019).

**Публикации результатов исследования.** По результатам диссертационной работы опубликованы 24 научные работы, в том числе 6 статей в журналах, входящих в перечень ВАК, а также 1 статья и 17 материалов конференций в изданиях, не входящих в перечень ВАК.

**Структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, благодарностей, списка сокращений и списка литературы. Список литературы содержит 189 источников литературы на русском и английском языках. Работа изложена на 150 страницах и содержит 11 таблиц, 43 рисунка и 7 приложений. Диссертация соответствует общим требованиям к оформлению кандидатских и докторских диссертаций, утверждённым ГОСТ Р 7.0.11-2011.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **1 Супрамолекулярные комплексы ХТ с НЧ-Se и НЧ-Ag как модельные объекты для изучения межмолекулярных взаимодействий белков с наночастицами различной природы**

Поскольку молекула ХТ обладает как заряженными радикалами аминокислот, так и гидрофобными участками, то взаимодействие ХТ с наночастицами различной природы может осуществляться посредством как гидрофобных, так и электростатических взаимодействий. НЧ-Se и НЧ-Ag, образованные нуль-валентными атомами, являются гидрофобными. Однако благодаря формированию на поверхности НЧ-Ag так называемого поверхностного плазмонного резонанса (ППР) под действием электромагнитного поля [Mogensen, Kneipp, 2014; Mooges, Goettmann, 2006], НЧ-Ag также способны проявлять электростатические свойства.

#### **1.1 Получение супрамолекулярных комплексов Se-ХТ**

С целью изучения гидрофобных межмолекулярных взаимодействий белков на примере ХТ с наночастицами были получены супрамолекулярные комплексы протеолитического фермента ХТ с НЧ-Se. Формирование супрамолекулярных комплексов Se-ХТ возможно за счет взаимодействия гидрофобных НЧ-Se с гидрофобными доменами молекулы ХТ, суммарная

площадь которых составляет 3 нм<sup>2</sup> [Структура и стабильность биологических макромолекул, 1973]. Комплексы Se-ХТ получали путем физической адсорбции ХТ на НЧ-Se в процессе проведения реакции (1) образования нуль-валентного красного аморфного Se в присутствии ХТ при температуре 20 °С. Концентрации ХТ (C<sub>ХТ</sub>) и Se (C<sub>Se</sub>) варьировались ( $v = C_{Se}/C_{ХТ}$ ).



Было показано, что супрамолекулярные комплексы Se-ХТ способны формироваться только в кислой среде, когда ХТ имеет конформацию, при которой гидрофобные участки молекулы белка доступны для межмолекулярного взаимодействия с НЧ-Se.

## 1.2 Получение супрамолекулярных комплексов Ag-ХТ

Для моделирования электростатических межмолекулярных взаимодействий в сочетании с гидрофобными супрамолекулярными комплексами Ag-ХТ получали путем введения ХТ в реакцию (2) образования НЧ-Ag одновременно с другими реагентами (комплексы Ag-ХТ-I):



Поскольку при отсутствии дополнительного стабилизатора агрегативная устойчивость НЧ-Ag может быть обеспечена за счет присутствия избыточного количества боргидрид-анионов, осуществляющих электростатическую стабилизацию НЧ-Ag, для моделирования преимущественно электростатических межмолекулярных взаимодействий супрамолекулярные комплексы Ag-ХТ получали путем введения ХТ в реакцию (2) образования НЧ-Ag через заданные промежутки времени после начала реакции (комплексы Ag-ХТ-II). Концентрация Ag составляла 0.005 масс.%, а концентрация ХТ – 0.1 масс.%.

## 2 Спектральные характеристики супрамолекулярных комплексов Se-ХТ и Ag-ХТ

### 2.1 Спектральные характеристики супрамолекулярных комплексов Se-ХТ

Для изучения межмолекулярных взаимодействий ХТ с НЧ-Se использовали метод УФ-и видимой спектрофотометрии. Максимум оптической плотности комплексов ( $v=1$ ;  $C_{Se}=C_{ХТ}=0.01$  масс.%) соответствовал длине волны 270 нм в отличие от нативного ХТ, максимум оптической плотности которого соответствовал длине волны 280 нм (рисунок 1а). Известно, что положение максимума поглощения зависит от энергии электронных переходов в хромофорных группах молекулы белка [Браун, Флорид, Сейнзбери, 1992]. Можно полагать, что взаимодействие между молекулами ХТ и НЧ-Se способствовало изменению энергии электронных переходов в хромофорных группах молекул ХТ, которое приводило к гипсохромному сдвигу максимума поглощения ХТ. Также показано, что абсолютное значение оптической плотности дисперсной системы при длине волны максимума поглощения (270 нм) на 21-е сутки понизилось менее, чем на ~4% (рисунок 1б).



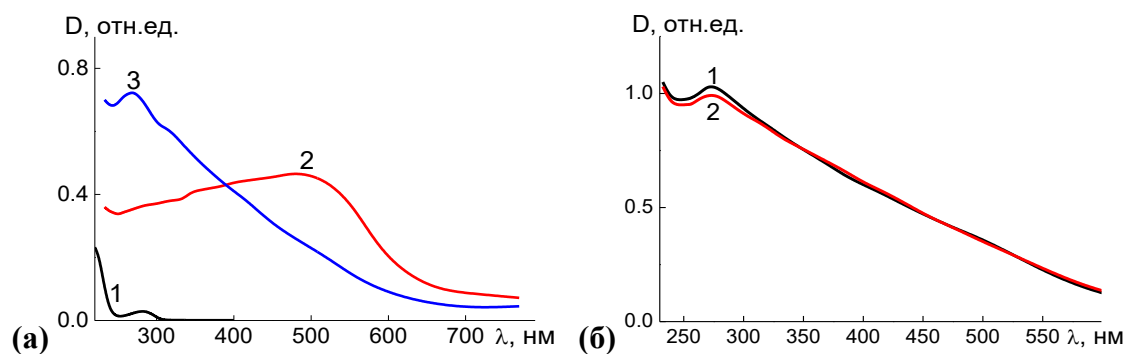


Рисунок 1 – (а) Спектры поглощения раствора ХТ (1), золя красного аморфного Se (2) и дисперсии комплексов Se-ХТ с  $\nu = 1$  (3). (б) Спектры поглощения дисперсии комплексов Se-ХТ с  $\nu = 1$  на 1-е (1) и 21-е (2) сутки после проведения реакции их образования ( $D$  – оптическая плотность;  $\lambda$  – длина волны)

Таким образом, методом УФ- и видимой спектрофотометрии показано образование комплексов ХТ с НЧ-Se. Спектральные характеристики полученных дисперсий супрамолекулярных комплексов Se-ХТ практически не изменялись с течением времени, что свидетельствовало о прочности межмолекулярных взаимодействий ХТ с НЧ-Se.

## 2.2 Спектральные характеристики супрамолекулярных комплексов Ag-ХТ-I и Ag-ХТ-II

Известно, что взаимодействие со стабилизатором оказывает значительное влияние на форму, положение и интенсивность полосы ППР НЧ-Ag [Mogensen, Kneipp, 2014; Moores, Goettmann, 2006]. Поэтому исследование спектральных характеристик комплексов Ag-ХТ в сравнении с НЧ-Ag позволит получить информацию о взаимодействии между НЧ-Ag и молекулами ХТ. Спектры поглощения дисперсии комплексов Ag-ХТ-I характеризовались двумя пиками поглощения: при 275 нм и при ~420 нм (рисунок 2а). Максимум поглощения раствора нативного ХТ находился при длине волны 280 нм, а пик ППР НЧ-Ag – в области 400 нм. Таким образом, при образовании комплексов Ag-ХТ-I наблюдался гипсохромный сдвиг пика поглощения ХТ на ~5 нм и батохромный сдвиг полосы ППР НЧ-Ag на ~15–20 нм. Можно полагать, что взаимодействие между молекулами ХТ и НЧ-Ag способствовало как изменению энергии электронных переходов в хромофорных группах молекул ХТ, так и изменению ППР НЧ-Ag. В случае дисперсий комплексов Ag-ХТ-II пик ППР НЧ-Ag находился при длине волны 405 нм, а пик поглощения ХТ – при длине волны 280 нм (рисунок 2б).

Таким образом, в случае комплексов Ag-ХТ-II ППР НЧ-Ag изменялся в меньшей степени, чем в случае комплексов Ag-ХТ-I, а пик поглощения ХТ приходился на длину волны, соответствующую пику поглощения нативного ХТ, в то время как в случае комплексов Ag-ХТ-I наблюдался гипсохромный сдвиг пика поглощения ХТ. Можно полагать, что наблюдаемые отличия спектральных характеристик комплексов обусловлены различиями во взаимодействиях молекул ХТ с НЧ-Ag в зависимости от способа получения комплексов.

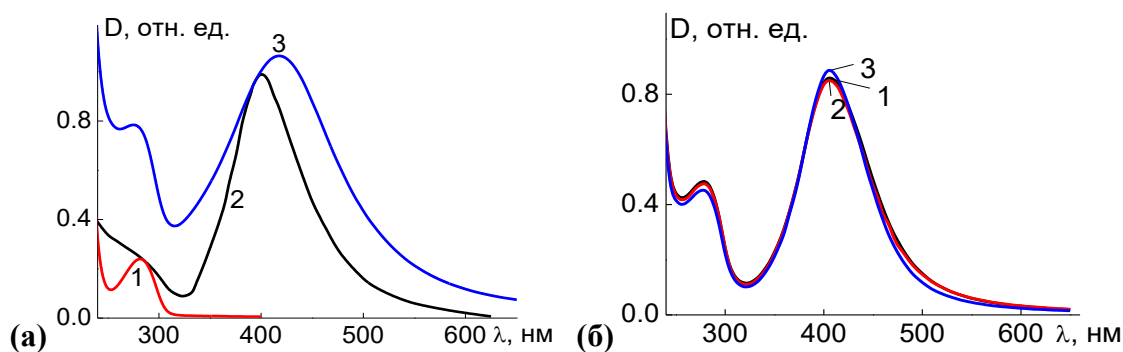


Рисунок 2 – **(а)** Спектры поглощения раствора нативного ХТ (1), дисперсии НЧ-Ag (2) и дисперсии комплексов Ag-ХТ-I (3). **(б)** Спектры поглощения дисперсий комплексов Ag-ХТ-II. ХТ был добавлен в реакцию смесь через 30 мин (1), 1 час (2) и 4 часа (3) после начала реакции образования НЧ-Ag ( $D$  – оптическая плотность;  $\lambda$  – длина волны)

Известно, что величина  $Q$ -фактора, определяемого как отношение интенсивности полосы поглощения к ее ширине на полувысоте, характеризует степень полидисперсности наночастиц [Mogensen, Kneipp, 2014; Демченко, 1981]. Поэтому, увеличение значения  $Q$ -фактора для комплексов Ag-ХТ-II (0.01 отн.ед./нм) в сравнении с комплексами Ag-ХТ-I (0.008 отн.ед./нм) может свидетельствовать об увеличении полидисперсности НЧ-Ag.

Также было исследовано изменение во времени спектральных характеристик дисперсий комплексов Ag-ХТ-I и Ag-ХТ-II, полученных путем добавления ХТ через 1 час после начала реакции образования НЧ-Ag (комплексы Ag-ХТ-II/1) (рисунки 3а и 3б). Независимо от метода получения комплексов на 21-е сутки наблюдалось снижение абсолютного значения оптической плотности в области ППР НЧ-Ag на ~37 % от исходного значения. При этом положение полосы ППР НЧ-Ag для комплексов Ag-ХТ-I и Ag-ХТ-II/1 сохранялось. Поскольку было показано, что увеличение размеров НЧ-Ag с течением времени за счет их агрегации отражалось на спектрах поглощения дисперсии НЧ-Ag сдвигом пика ППР в длинноволновую область, можно полагать, что взаимодействие ХТ с НЧ-Ag препятствовало их агрегации.

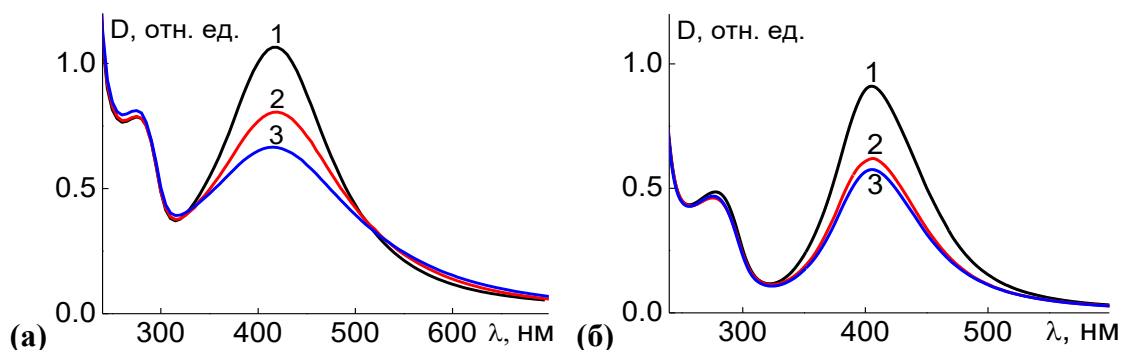


Рисунок 3 – **(а)** Спектры поглощения дисперсии комплексов Ag-ХТ-I на 2-е (1), 7-е (2) и 21-е сутки (3) после начала реакции образования НЧ-Ag. **(б)** Спектры поглощения дисперсии комплексов Ag-ХТ-II/1 на 2-е (1), 7-е (2), и 21-е сутки (3) после начала реакции образования НЧ-Ag ( $D$  – оптическая плотность;  $\lambda$  – длина волны)

Таким образом, методом УФ- и видимой спектрофотометрии показано образование комплексов ХТ с НЧ-Ag. Наблюдаемые отличия спектральных характеристик комплексов Ag-ХТ-I и Ag-ХТ-II, по-видимому, обусловлены различиями во взаимодействиях молекул ХТ с НЧ-Ag, реализуемых при их формировании. На основании сопоставления кинетики изменения спектральных характеристик комплексов Ag-ХТ и НЧ-Ag можно полагать, что взаимодействие ХТ с НЧ-Ag препятствовало их агрегации.

### 3 Исследование размерных характеристик НЧ-Se и НЧ-Ag в составе супрамолекулярных комплексов Se-ХТ и Ag-ХТ методом ПЭМ

#### 3.1 Размерные характеристики НЧ-Se в составе супрамолекулярных комплексов Se-ХТ

Методом ПЭМ показано, что НЧ-Se в составе комплексов представляли собой квазисферические частицы с диаметром от  $\sim 17$  до  $\sim 75$  нм, часть из которых образовывали скопления (рисунок 4а). В результате обработки ПЭМ-изображений в программе ImageJ 1.52n было получено 200 значений диаметров НЧ-Se в составе комплексов Se-ХТ (рисунок 4б).

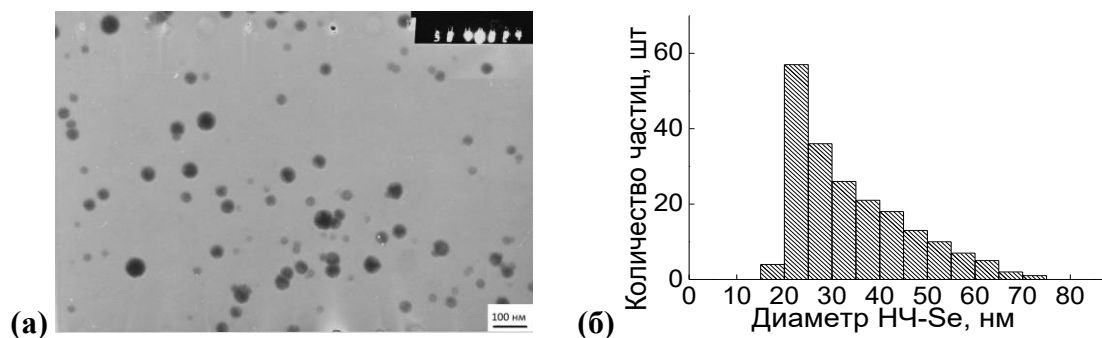


Рисунок 4 – (а) ПЭМ изображение НЧ-Se в составе комплексов Se-ХТ с  $\nu = 1$ . Длина масштабного отрезка составляет 100 нм. (б) Гистограмма распределения по размерам НЧ-Se в составе комплексов Se-ХТ с  $\nu = 1$ , полученная в результате обработки ПЭМ-изображений в программе ImageJ 1.52n

Таким образом, НЧ-Se в составе комплексов Se-ХТ представляли собой квазисферические частицы, диаметр которых изменялся в диапазоне от  $\sim 17$  до  $\sim 75$  нм.

#### 3.2 Размерные характеристики НЧ-Ag в составе супрамолекулярных комплексов Ag-ХТ-I и Ag-ХТ-II

Методом ПЭМ показано, что НЧ-Ag в составе комплексов Ag-ХТ-I и Ag-ХТ-II/1 представляли собой квазисферические частицы (рисунок 5а,б). Диаметр НЧ-Ag в составе комплексов Ag-ХТ-I в основном составлял 3–4 нм, количество более крупных агрегатов НЧ-Ag было незначительно. В результате обработки ПЭМ-изображений в программе ImageJ 1.52n было получено 420 значений диаметров НЧ-Ag в составе комплексов Ag-ХТ-II/1 в диапазоне от  $\sim 4$  до  $\sim 15$  нм (рисунок 6). Следовательно, повышение значения Q-фактора дисперсий

комплексов Ag-ХТ-II/1 в сравнении с комплексами Ag-ХТ-I, показанное в пункте 2.2, обусловлено увеличением полидисперсности НЧ-Ag.

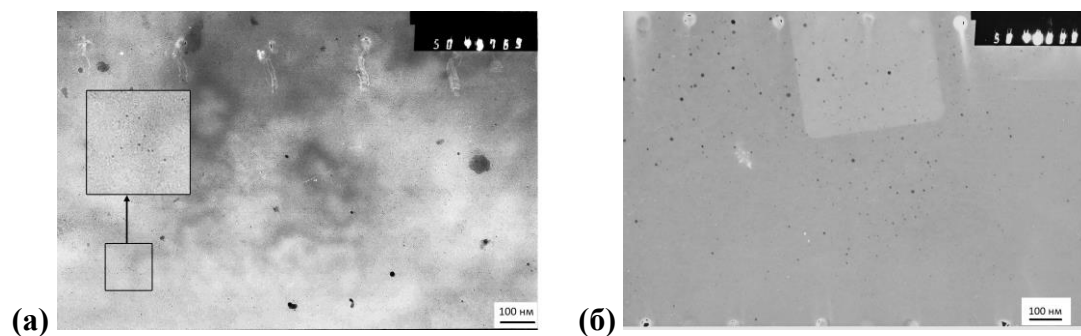


Рисунок 5 – ПЭМ-изображения НЧ-Ag в составе комплексов Ag-ХТ-I (а) и Ag-ХТ-II/1 (б). Длина масштабного отрезка составляет 100 нм

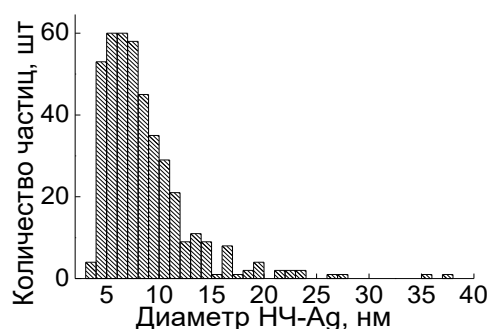


Рисунок 6 – Гистограмма распределения по размерам НЧ-Ag в составе комплексов Ag-ХТ-II/1, полученная в результате обработки ПЭМ-изображений в программе ImageJ 1.52n

Таким образом, в сравнении с комплексами Ag-ХТ-I в случае комплексов Ag-ХТ-II/1 наблюдалось увеличение полидисперсности НЧ-Ag, что также отражалось на спектрах поглощения этих дисперсных систем повышением значения Q-фактора.

#### 4 Механизм роста НЧ-Ag

Известны два механизма формирования металлических наночастиц: последовательный и параллельный [Granqvist, Buhrman, 1976; Оленин, 2012]. Продукт, образующийся в процессе последовательного роста, подчиняется нормальному (Гауссову) распределению. Продукт, образующийся в процессе параллельного роста, подчиняется логарифмически нормальному распределению. Для определения механизма формирования получаемых НЧ-Ag были использованы данные о размерах НЧ-Ag в составе комплексов Ag-ХТ-II/1 (рисунок 6).

Проверку гипотез о принадлежности экспериментальных данных нормальному или логарифмически нормальному распределению проводили с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. На рисунке 7 представлены графики экспериментальной функции распределения и теоретических функций распределения диаметров НЧ-Ag, параметры которых получены по

экспериментальным данным методом максимального правдоподобия (таблица 1). В таблице 2 представлены полученные значения статистики критерия Колмогорова-Смирнова.

Таблица 1 – Параметры теоретических распределений, полученные по экспериментальным данным методом максимального правдоподобия

Тип распределения	Параметры распределения	
	Оценка среднего	Оценка дисперсии
Логарифмически нормальное распределение	7.77	0.165
Нормальное распределение	8.52	0.173

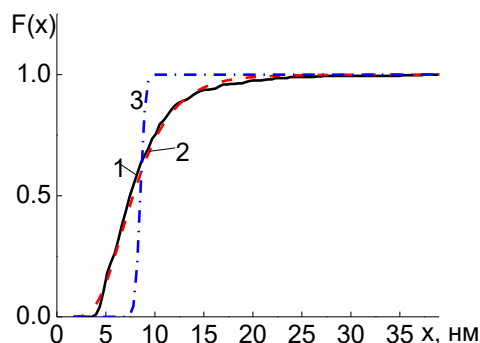


Рисунок 7 – Эмпирическая функция распределения (1) и функции логарифмически нормального (2) и нормального (3) распределений, полученных по экспериментальным данным о диаметрах НЧ-Ag в составе комплексов Ag-XT-II/1 ( $x$  – диаметр наночастиц;  $F(x)$  – значение функции распределения)

Таблица 2 – Значения статистики критерия Колмогорова-Смирнова, полученные в результате обработки данных о диаметрах НЧ-Ag в составе комплексов Ag-XT-II/1 ( $N = 420$ ; уровень значимости  $\alpha = 0.05$ )

Проверяемое распределение	Статистика Колмогорова-Смирнова	
	Экспериментальное значение $D_N$	Критическое значение $D_{0.05} = 1.36/\sqrt{N}$
Логарифмически нормальное распределение	0.049	0.066
Нормальное распределение	0.496	

Значение статистики критерия Колмогорова-Смирнова для нормального распределения значительно превышало, а для логарифмически нормального распределения – не превышало критическое значение, поэтому на уровне значимости 0.05 принимается гипотеза о распределении диаметров НЧ-Ag по логарифмически нормальному закону. Следовательно, при используемом способе получения НЧ-Ag преимущественно реализовывался параллельный механизм роста наночастиц.

## 5 Исследование размерных характеристик супрамолекулярных комплексов Se-XT и Ag-XT методом ДРС

### 5.1 Размерные и спектральные характеристики супрамолекулярных комплексов Se-XT в зависимости от температуры проведения реакции и концентрации Se

Известно, что значительное влияние на размер и форму НЧ-Se оказывают условия их получения, такие как температура, атмосферное давление, pH среды и т. д. [Chhabria, Desai,

2016]. Поэтому было исследовано влияние температуры проведения реакции на размерные и спектральные характеристики комплексов Se-ХТ в зависимости от концентрации Se ( $C_{ХТ} = 0.01$  масс.%) [Боровикова и др., 2015]. Показано, что изменение температуры проведения реакции (4 °С, 20 °С и 37 °С) не оказывало значительного влияния на гидродинамические радиусы комплексов Se-ХТ (таблица 3).

Таблица 3 – Влияние температуры проведения реакции и концентрации Se на гидродинамические радиусы ( $R_h$ ) комплексов Se-ХТ

v	Температура проведения реакции, °С					
	4		20		37	
	$R_h$ , нм ±2	pH	$R_h$ , нм ±2	pH	$R_h$ , нм ±2	pH
0.5	44	3.8	45	3.4	44	3.2
1	28	3.4	33	3.2	38	3.0
1.5	45	3.2	38	3.0	39	2.9

Однако, наблюдался сдвиг максимума поглощения комплексов в длинноволновую область с увеличением температуры. Максимумы поглощения наблюдались при одинаковых длинах волн для всех значений v и составляли 256, 270 и 285 нм при температуре проведения реакции 4, 20 и 37 °С, соответственно (рисунок 8а). Поскольку спектры поглощения дисперсий нестабилизированного красного аморфного Se различались в зависимости от температуры их получения (рисунок 8б), можно полагать, что сдвиг максимума поглощения дисперсий комплексов в длинноволновую область с увеличением температуры проведения реакции связан с различиями во взаимодействиях между ХТ и НЧ-Se, обусловленными изменениями в структурной организации НЧ-Se в зависимости от температуры.

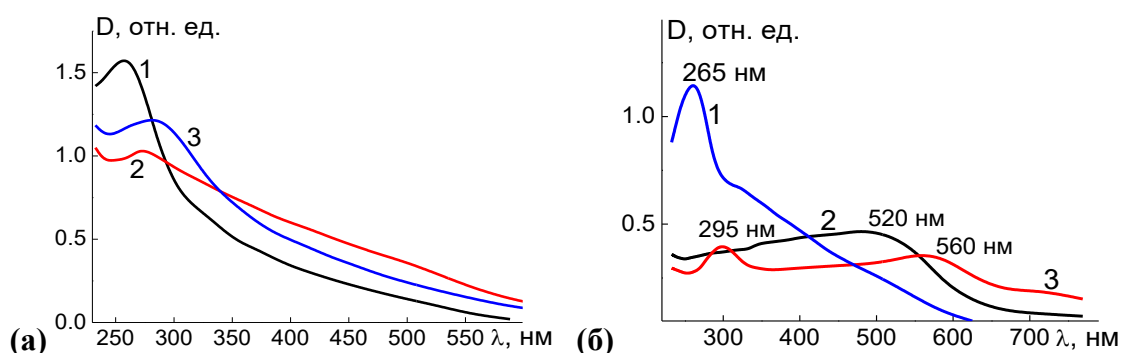


Рисунок 8 – (а) Спектры поглощения дисперсий комплексов Se-ХТ с  $v = 1$ . Температура проведения реакции: 1 – 4 °С; 2 – 20 °С; 3 – 37 °С. (б) Спектры поглощения дисперсий красного аморфного Se, полученных при 4 °С (1), 20 °С (2) и 37 °С (3) (D – оптическая плотность;  $\lambda$  – длина волны)

Таким образом, изменение температуры проведения реакции не оказывало значительного влияния на размерные характеристики комплексов Se-ХТ. Сдвиг максимума поглощения комплексов в длинноволновую область с увеличением температуры проведения реакции свидетельствовал об изменении во взаимодействиях между ХТ и НЧ-Se.

## 5.2 Размерные характеристики супрамолекулярных комплексов Ag-ХТ-I и Ag-ХТ-II

Поскольку реакция образования НЧ-Ag протекает в течение некоторого времени, можно полагать, что введение ХТ в реакционную смесь на различных этапах формирования НЧ-Ag приведет к увеличению диаметра наночастиц и позволит регулировать размер образующихся супрамолекулярных комплексов. Гидродинамический радиус комплексов Ag-ХТ-I составил  $21 \pm 1$  нм. Увеличение продолжительности реакции образования НЧ-Ag в отсутствие ХТ приводило к постепенному росту размеров комплексов Ag-ХТ-II (таблица 4).

Таблица 4 – Зависимость гидродинамического радиуса ( $R_h$ ) комплексов Ag-ХТ от времени введения ХТ в реакционную смесь после начала реакции образования НЧ-Ag

	Время введения ХТ в реакционную смесь после начала реакции образования НЧ-Ag								
	0 мин	30 мин	1 час	2 часа	3 часа	4 часа	5 часов	6 часов	24 часа
$R_h$ , нм $\pm 1$	21	23	25	26	27	31	35	32	41

Размеры полученных комплексов Ag-ХТ-II/1 сохранялись в течение по меньшей мере 20-ти суток (рисунок 9). Следовательно, ХТ стабилизировал НЧ-Ag, препятствуя их агрегации.

Таким образом, введение ХТ в реакционную смесь одновременно с другими компонентами приводило к образованию супрамолекулярных комплексов Ag-ХТ-I с гидродинамическим радиусом  $\sim 21$  нм. Увеличение продолжительности реакции образования НЧ-Ag в отсутствие ХТ приводило к росту гидродинамического радиуса комплексов Ag-ХТ-II.

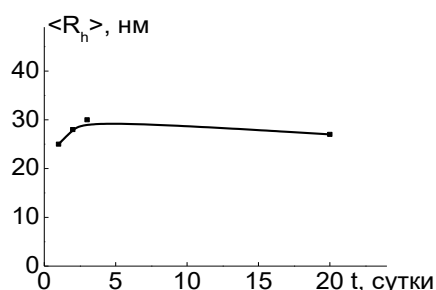


Рисунок 9 – Кинетика изменения гидродинамического радиуса ( $R_h$ ) комплексов Ag-ХТ-II/1 ( $t$  – время)

## 6 Седиментационная устойчивость супрамолекулярных комплексов Se-ХТ и Ag-ХТ

Агрегативная и седиментационная устойчивость белков в водной среде обеспечивается благодаря гидратным оболочкам, образуемым дипольными молекулами воды вокруг каждой белковой молекулы. В условиях рН, при которых суммарный заряд молекулы равен нулю, белки наименее устойчивы в растворе и легко выпадают в осадок [Северин, 2008; Березов, Коровкин, 1998]. Известно, что нативный ХТ наименее устойчив в растворе и склонен к выпадению в осадок вблизи значения рН, соответствующего изоэлектрической точке ( $pI \sim 8.6$ ). Можно полагать, что межмолекулярные взаимодействия ХТ с НЧ-Se и с НЧ-Ag будут оказывать влияние на седиментационную устойчивость супрамолекулярных комплексов.

### **6.1 Седиментационная устойчивость и спектральные характеристики супрамолекулярных комплексов Se-ХТ в зависимости от рН среды и концентрации Se**

Исследование седиментационной устойчивости комплексов Se-ХТ в зависимости от концентрации Se проводили на основе визуальной оценки состояния дисперсных систем (наличие осадка, появление мутности) [Боровикова и др., 2013]. Значение рН дисперсных систем варьировалось в диапазоне от 3.0 до 12.0 путем добавления различного количества 1 н NaOH в исходные дисперсные системы, в которых значение рН находилось в диапазоне от 2.8 до 3.4 ( $C_{ХТ} = 0.01$  масс.%;  $v = 0.5, 1.0, 1.5, 2.0$ ). На 2-е сутки после добавления NaOH седиментация комплексов Se-ХТ с  $v = 0.5$  наблюдалась в образцах, значения рН которых на 2-е сутки находились в диапазоне от 4.6 до 6.8, с  $v = 1.0$  – в диапазоне от 3.8 до 7.0, с  $v = 1.5$  – в диапазоне от 3.5 до 4.3, с  $v = 2.0$  – в диапазоне от 3.3 до 6.0. При других значениях рН комплексы сохраняли седиментационную устойчивость. Таким образом, увеличение концентрации Se приводило к изменению диапазона рН, в котором комплексы Se-ХТ претерпевали седиментацию.

Методом УФ- и видимой спектрофотометрии показано, что в щелочной среде абсолютная величина оптической плотности нативного ХТ возрастала. По-видимому, это связано с изменением конформации белка и увеличением на его поверхности количества функциональных групп, поглощающих при 280 нм. Для всех устойчивых дисперсий Se-ХТ вне зависимости от значений рН среды спектры поглощения имели максимум при  $\sim 265$  нм, либо плато в области от  $\sim 240$  до  $\sim 270$  нм, при этом соответствующая абсолютная величина оптической плотности дисперсий изменялась в меньшей степени, чем в случае нативного ХТ. Следовательно, для седиментационно устойчивых комплексов Se-ХТ не наблюдалось значительного влияния рН на их спектральные характеристики.

Таким образом, показано, что реализация гидрофобных взаимодействий между ХТ и НЧ-Se приводила к изменению условий седиментации комплексов в сравнении с нативным ферментом, которые зависели от концентрации Se. При этом, спектральные характеристики седиментационно устойчивых комплексов практически не изменялись.

### **6.2 Седиментационная устойчивость супрамолекулярных комплексов Ag-ХТ-I и их спектральные и размерные характеристики в зависимости от рН среды**

Для исследования влияния рН среды на седиментационную устойчивость НЧ-Ag и комплексов Ag-ХТ-I 1 мл полученных образцов смешивали с 5 мл универсального буфера со значениями рН от 3.0 до 12.0. Осаждение НЧ-Ag наблюдалось на 4-е сутки после помещения их в буферные растворы. Комплексы Ag-ХТ-I в диапазоне значений рН среды от 3.0 до 12.0 сохраняли седиментационную устойчивость по меньшей мере в течение одного месяца. Для оценки влияния рН среды на взаимодействия между НЧ-Ag и молекулами ХТ были изучены



спектральные характеристики всех исследованных дисперсий НЧ-Ag и комплексов Ag-ХТ-I [Плющенко и др., 2018]. В сравнении со спектром поглощения дисперсии НЧ-Ag (рисунок 2а) на спектрах поглощения НЧ-Ag, помещенных в буферные растворы наряду с полосой ППР в области 400 нм также появлялась широкая полоса поглощения в видимой области спектров (рисунок 10а). В отличие от НЧ-Ag в случае комплексов Ag-ХТ-I форма спектров поглощения и положение пика ППР НЧ-Ag сохранялись (рисунок 10б). Можно полагать, что появление вторых пиков на спектрах поглощения дисперсий НЧ-Ag может быть связано с геометрической анизотропией наночастиц, а также с образованием агрегатов [Novotny, Hesch, 2012]. В случае комплексов Ag-ХТ-I ХТ, образуя комплексы с НЧ-Ag, препятствовал их агрегации.

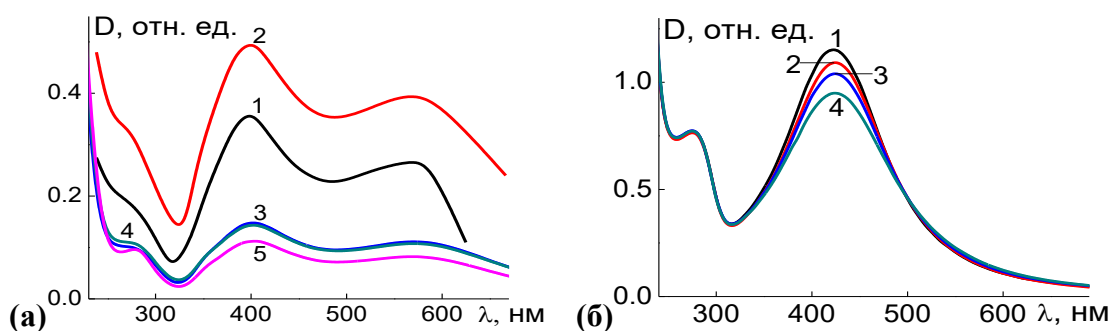


Рисунок 10 – (а) Спектры поглощения дисперсий НЧ-Ag, снятые на 1-е сутки (1), 4-е сутки (2), 12-е сутки (3), 15-е сутки (4) и 22-е сутки (5) после помещения их в буферный раствор с рН 8.0. (б) Спектры поглощения дисперсий комплексов Ag-ХТ-I, снятые на 1-е сутки (1), 3-и сутки (2), 6-е сутки (3) и 26-е сутки (4) после помещения их в буферный раствор с рН 8.0 ( $D$  – оптическая плотность;  $\lambda$  – длина волны)

Выдвинутое предположение подтверждается данными, полученными методом ПЭМ. После помещения НЧ-Ag в буферный раствор с рН 8.0 НЧ-Ag образовывали агрегаты с диаметром от 12 до 70 нм (рисунок 11а). Таким образом, появление дополнительного пика на спектрах поглощения дисперсий НЧ-Ag в буферных растворах, по-видимому, обусловлено ППР агрегатов НЧ-Ag. После помещения дисперсий комплексов Ag-ХТ-I в буферный раствор с рН 8.0 диаметр НЧ-Ag в составе комплексов в основном не превышал 4 нм (рисунок 11б). Поскольку форма спектров поглощения комплексов Ag-ХТ-I сохранялась вне зависимости от рН среды, можно полагать, что при других значениях рН размеры НЧ-Ag также не изменялись.

Таким образом, установлено, что НЧ-Ag, полученные в отсутствие ХТ, претерпевали агрегацию при изменении рН среды, что проявлялось в появлении на спектрах поглощения дисперсий НЧ-Ag дополнительной широкой полосы поглощения в области от 500 до 600 нм. Показано, что при изменении рН среды спектральные характеристики комплексов Ag-ХТ-I и размеры НЧ-Ag в составе этих комплексов сохранялись. Можно полагать, что сочетание двух типов межмолекулярных взаимодействий (гидрофобных и электростатических) при формировании супрамолекулярных комплексов Ag-ХТ-I предотвращало агрегацию НЧ-Ag, в

результате чего комплексы Ag-ХТ-I сохраняли седиментационную устойчивость в диапазоне рН среды от 3.0 до 12.0 в течение по меньшей мере одного месяца.

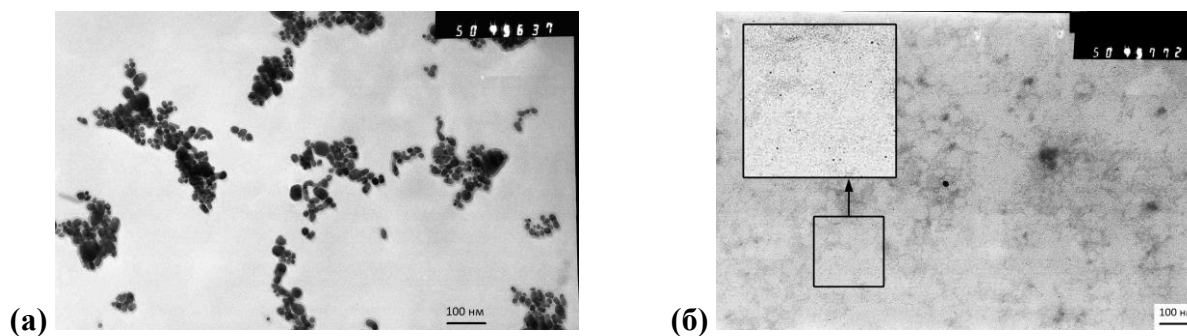


Рисунок 11 – (а) ПЭМ-изображение НЧ-Ag, помещенных в буферный раствор с рН 8.0. (б) ПЭМ-изображение НЧ-Ag в составе супрамолекулярных комплексов Ag-ХТ-I, помещенных в буферный раствор с рН 8.0. Длина масштабного отрезка составляет 100 нм

## 7 Модели взаимодействия ХТ с НЧ-Se и НЧ-Ag

### 7.1 Модель взаимодействия ХТ с НЧ-Se

Формирование супрамолекулярных комплексов Se-ХТ осуществлялось за счет взаимодействия гидрофобных НЧ-Se с гидрофобными доменами молекул ХТ. Устойчивость комплексов в водной среде обеспечивалась за счет формирования гидратных оболочек вокруг молекул ХТ, имеющих заряженные радикалы аминокислот. При этом формирование комплексов Se-ХТ осуществлялось только в кислой среде. По-видимому, именно в этих условиях ХТ имеет конформацию, при которой гидрофобные участки молекулы белка доступны для межмолекулярного взаимодействия с НЧ-Se. Таким образом, полученные супрамолекулярные комплексы Se-ХТ являются модельными объектами для изучения гидрофобных межмолекулярных взаимодействий белков с наночастицами. Согласно данным, полученным методом ПЭМ, наиболее часто встречающееся значение диаметра НЧ-Se в составе комплексов Se-ХТ ( $v=1$ ,  $T=20$  °C) составляло  $\sim 25$  нм, а среднее значение диаметра этих комплексов, согласно данным ДРС, составляло  $\sim 66$  нм. Если предположить, что супрамолекулярный комплекс представляет собой моноядерную структуру, в которой «ядро» образовано одной НЧ-Se, то в соответствии с полученными данными и размерами молекулы ХТ ( $5.5 \times 3.5 \times 3.8$  нм), вокруг НЧ-Se формировалась многослойная оболочка из молекул ХТ, толщина которой в среднем составляла  $\sim 21$  нм.

### 7.2 Модель взаимодействия ХТ с НЧ-Ag

Благодаря свойствам НЧ-Ag, формирование супрамолекулярных комплексов Ag-ХТ возможно за счет гидрофобных и электростатических межмолекулярных взаимодействий. Супрамолекулярные комплексы Ag-ХТ-I, полученные путем введения ХТ в реакционную смесь одновременно с другими реагентами, являются модельными объектами для изучения

межмолекулярных взаимодействий ХТ с НЧ-Ag, сочетающих электростатические и гидрофобные взаимодействия. В случае комплексов Ag-ХТ-II стабилизация НЧ-Ag до добавления в реакционную смесь ХТ обеспечивалась ионной оболочкой, образованной боргидрид-анионами и другими ионами, присутствующими в дисперсной системе. Таким образом, супрамолекулярные комплексы Ag-ХТ-II являются модельными объектами для изучения преимущественно электростатических межмолекулярных взаимодействий ХТ с НЧ-Ag. Согласно данным, полученным методом ПЭМ, наиболее часто встречающееся значение диаметра НЧ-Ag в составе комплексов Ag-ХТ-I и Ag-ХТ-II/1 составляло  $\sim 4$  и  $\sim 8$  нм, соответственно, а среднее значение диаметра комплексов Ag-ХТ-I и Ag-ХТ-II/1, согласно данным ДРС, составляло  $\sim 42$  и  $\sim 50$  нм, соответственно. Если предположить, что супрамолекулярные комплексы представляют собой моноядерные структуры, в которых «ядро» образовано одной НЧ-Ag, то в соответствии с полученными данными и размерами молекулы ХТ ( $5.5 \times 3.5 \times 3.8$  нм), вокруг НЧ-Ag формировалась многослойная оболочка из молекул ХТ, толщина которой в среднем составляла  $\sim 19$ – $21$  нм.

## 8 Протеолитическая активность ХТ в составе супрамолекулярных комплексов Se-ХТ и Ag-ХТ

Известно, что нативный ХТ, оптимальными условиями функционирования которого является среда с рН  $\sim 8.0$ , быстро теряет свою активность при рН ниже 7.0 и выше 9.0. Можно полагать, что межмолекулярные взаимодействия, реализуемые при формировании комплексов ХТ с НЧ-Se и с НЧ-Ag, будут оказывать влияние на протеолитическую активность фермента в составе супрамолекулярных комплексов. В связи с этим была исследована протеолитическая активность комплексов Se-ХТ и Ag-ХТ при рН 6.0, 8.0 и 11.0, в сравнении с нативным ХТ.

### 8.1 Протеолитическая активность ХТ в составе супрамолекулярных комплексов Se-ХТ

Была исследована протеолитическая активность комплексов Se-ХТ с  $v=0.1$  и  $v=1$  в сравнении с нативным ХТ (таблица 5) [Плющенко, Боровикова, Писарев, 2018]. Также была изучена кинетика накопления продукта ферментативной реакции для нативного ХТ и ХТ в составе супрамолекулярных комплексов (рисунки 12а, б, в).

Таблица 5 – Влияние рН на удельную протеолитическую активность ( $A_{удел.}$ ) нативного ХТ и комплексов Se-ХТ

Образец	$A_{удел.}$ , Ед./мг		
	рН 6.0	рН 8.0	рН 11.0
ХТ	$0.9 \pm 0.1$	$3.2 \pm 0.3$	$1.8 \pm 0.2$
Se-ХТ ( $v = 0.1$ )	$0.8 \pm 0.1$	$2.6 \pm 0.3$	$2.7 \pm 0.3$
Se-ХТ ( $v = 1$ )	$0.6 \pm 0.1$	$2.3 \pm 0.2$	$4.1 \pm 0.4$

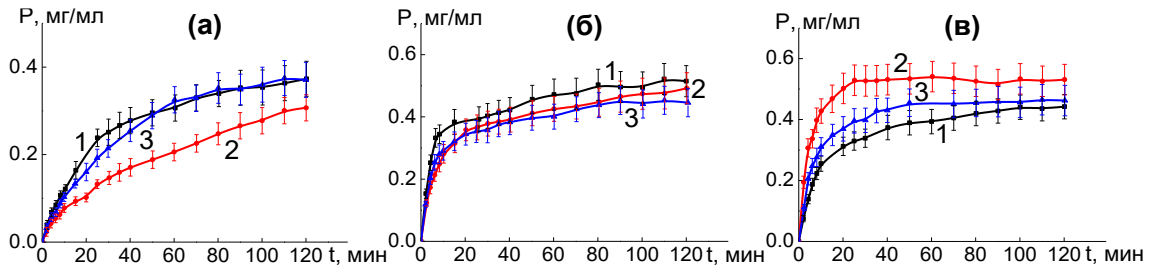


Рисунок 12 – Кинетика накопления продукта реакции гидролиза казеината натрия для комплексов Se-ХТ в сравнении с нативным ХТ при рН 6.0 (а), рН 8.0 (б) и рН 11.0 (в) (P – концентрация продукта реакции гидролиза; t – время реакции): 1 – ХТ; 2 – Se-ХТ ( $v = 1$ ); 3 – Se-ХТ ( $v = 0.1$ )

Исходя из полученных результатов, образование комплексов ХТ с НЧ-Se не приводило к значительному снижению его протеолитической активности при рН 6.0 и 8.0, а при рН 11.0 наблюдалось повышение активности ХТ в составе супрамолекулярных комплексов в сравнении с нативным ферментом. Кроме того, при рН 11.0 ферментативная реакция гидролиза белкового субстрата в присутствии комплексов Se-ХТ осуществлялась быстрее, чем в присутствии нативного ХТ. Увеличение концентрации Se в комплексе приводило к ускорению ферментативной реакции гидролиза и повышению протеолитической активности фермента.

## 8.2 Протеолитическая активность ХТ в составе супрамолекулярных комплексов Ag-ХТ

Была исследована протеолитическая активность комплексов Ag-ХТ-I и Ag-ХТ-II/1 в сравнении с нативным ХТ ( $C_{Ag}/C_{ХТ} = 0.05$ ) (таблица 6) [Плющенко, Боровикова, Писарев, 2019]. Также была изучена кинетика накопления продукта ферментативной реакции для нативного ХТ и ХТ в составе супрамолекулярных комплексов (рисунок 13а, б, в).

Таблица 6 – Влияние рН на удельную протеолитическую активность ( $A_{удел.}$ ) нативного ХТ и комплексов Ag-ХТ

Образец	$A_{удел.}$ , Ед./мг		
	рН 6.0	рН 8.0	рН 11.0
ХТ	$2.4 \pm 0.2$	$3.5 \pm 0.3$	$1.6 \pm 0.2$
Ag-ХТ-I	$2.2 \pm 0.2$	$2.9 \pm 0.3$	$1.4 \pm 0.1$
Ag-ХТ-II/1	$2.9 \pm 0.3$	$2.7 \pm 0.3$	$2.4 \pm 0.2$

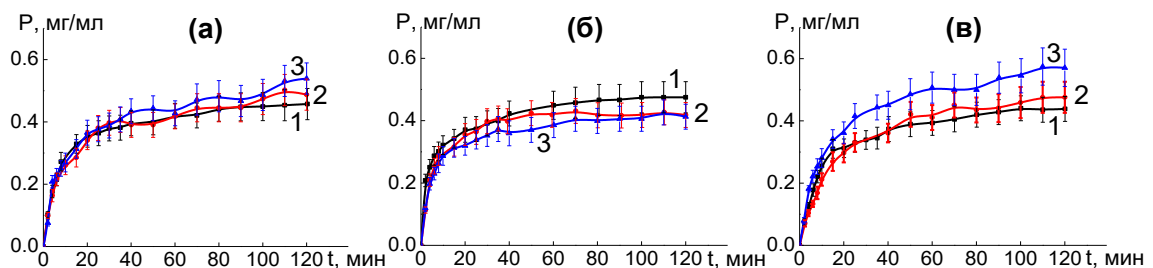


Рисунок 13 – Кинетика накопления продукта реакции гидролиза казеината натрия для комплексов Ag-ХТ-I и Ag-ХТ-II/1 в сравнении с нативным ХТ при рН 6.0 (а), рН 8.0 (б) и рН 11.0 (в) (P – концентрация продукта реакции гидролиза; t – время реакции): 1 – ХТ; 2 – Ag-ХТ-I; 3 – Ag-ХТ-II/1

Исходя из полученных результатов, образование супрамолекулярных комплексов ХТ с НЧ-Ag не приводило к значительному снижению его протеолитической активности при pH 6.0 и 8.0 в сравнении с нативным ферментом вне зависимости от способа получения комплексов. При этом наблюдалось повышение протеолитической активности комплексов Ag-ХТ-II/1 в сравнении с комплексами Ag-ХТ-I, что может быть связано с различиями в межмолекулярных взаимодействиях ХТ с НЧ-Ag, реализующихся при образовании этих комплексов.

### 9 Антибактериальная активность НЧ-Ag в составе супрамолекулярных комплексов Ag-ХТ-I

Исследования показали, что биологическая активность НЧ-Ag зависит от типа их покрытия [Powers et al, 2011]. В связи с этим была исследована антибактериальная активность НЧ-Ag в составе комплексов Ag-ХТ-I в отношении различных микроорганизмов (таблица 7). Понижение концентрации Ag приводило к уменьшению антибактериальных свойств комплексов по отношению к исследованным штаммам бактерий, в то время как изменение концентрации ХТ не влияло на проявление антибактериальных свойств НЧ-Ag. Минимальная концентрация НЧ-Ag, подавляющая рост микроорганизмов, составляла 0.1 мг/мл вне зависимости от концентрации ХТ [Писарев и др., 2016].

Таблица 7 – Влияние концентрации Ag и ХТ на подавление роста микроорганизмов

C <sub>ХТ</sub> , мг/мл	C <sub>Ag</sub> , мг/мл	Бактериальный штамм				
		<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>
1.0	1.0	+	+	+	+	+
	0.1	+	+	+	-	+
	0.01	-**	-	-	-	-
10.0	1.0	+	+	+	+	+
	0.1	+	+	+	+	+
	0.01	-	-	-	-	-

\* «+» – подавление роста микроорганизмов

\*\* «-» – отсутствие подавления роста микроорганизмов

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработаны условия получения комплексов ХТ с НЧ-Se и НЧ-Ag для использования в качестве модельных систем при исследовании межмолекулярных взаимодействий белков с наночастицами различной природы.

Установлено, что супрамолекулярные комплексы Se-ХТ образуются посредством гидрофобных взаимодействий ХТ с НЧ-Se только в кислой среде, поскольку в этих условиях ХТ имеет конформацию, при которой гидрофобные участки молекулы белка доступны для межмолекулярного взаимодействия с НЧ-Se.

Показано, что введение ХТ в реакцию смесь одновременно с другими компонентами приводит к совместной реализации гидрофобных и электростатических взаимодействий ХТ с НЧ-Ag. Добавление ХТ в реакцию смесь через различные промежутки времени после начала образования НЧ-Ag приводит к реализации преимущественно электростатических взаимодействий.

2. Методом УФ- и видимой спектрофотометрии показано, что формирование комплексов Se-ХТ приводит к гипсохромному сдвигу максимума поглощения ХТ. Установлено, что спектральные характеристики дисперсий комплексов Se-ХТ практически не изменяются в течение 21-х суток. Сдвиг максимума поглощения комплексов в длинноволновую область с увеличением температуры проведения реакции свидетельствует об изменении во взаимодействиях между ХТ и НЧ-Se. Различия во взаимодействиях молекул ХТ с НЧ-Ag, реализуемых при формировании комплексов Ag-ХТ-I и Ag-ХТ-II, подтверждаются методом УФ-и видимой спектрофотометрии. Наблюдается снижение интенсивности полосы ППР НЧ-Ag в составе комплексов Ag-ХТ-I и Ag-ХТ-II/1, которое на 21-е сутки составило ~37%.
3. Методами динамического рассеяния света и просвечивающей электронной микроскопии показано, что размерные характеристики комплексов Se-ХТ практически не зависят от температуры их получения и в среднем составляют ~39 нм, при этом диаметр НЧ-Se изменяется в диапазоне от ~17 до ~75 нм. Гидродинамический радиус комплексов Ag-ХТ-I составляет ~21 нм. Увеличение продолжительности реакции образования НЧ-Ag до добавления ХТ в реакцию смесь с 30 минут до 24 часов приводит к росту гидродинамического радиуса комплексов Ag-ХТ-II с ~23 до ~41 нм. Диаметр НЧ-Ag в составе комплексов Ag-ХТ-I составляет ~4 нм, а в составе комплексов Ag-ХТ-II/1 – изменяется от ~4 до ~15 нм.
4. Условия седиментации комплексов Se-ХТ изменяются в сравнении с нативным ферментом, определены интервалы рН в зависимости от концентрации Se, при которых комплексы Se-ХТ седиментационно устойчивы. Седиментационная устойчивость комплексов Ag-ХТ-I сохраняется в диапазоне рН среды от 3.0 до 12.0.
5. Установлено, что образование комплексов ХТ с НЧ-Se и с НЧ-Ag не приводит к значительному снижению его протеолитической активности при рН 6.0 и 8.0 в сравнении с нативным ферментом. При рН 11.0 наблюдается повышение удельной протеолитической активности ХТ в составе комплексов Se-ХТ в сравнении с нативным ферментом. При этом увеличение концентрации Se в комплексе приводит к ускорению ферментативной реакции гидролиза и повышению протеолитической активности ХТ. Также при рН 11.0 наблюдается повышение протеолитической активности комплексов Ag-ХТ-II/1 в сравнении с нативным ХТ и комплексами Ag-ХТ-I.

6. Показано, что НЧ-Ag в составе супрамолекулярных комплексов с ХТ проявляют антибактериальную активность в отношении культур *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *E. coli*. Установлено, что изменение концентрации ХТ не влияет на проявление антибактериальных свойств НЧ-Ag. Минимальная концентрация НЧ-Ag, подавляющая рост микроорганизмов, составляет 0.1 мг/мл вне зависимости от концентрации ХТ.

#### **ОСНОВНЫЕ НАУЧНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ**

1. Боровикова Л.Н. Стабилизация наночастиц селена химотрипсином: влияние рН и концентрационного соотношения наночастица–фермент на стабильность наноконплексов / Л.Н. Боровикова, А.В. Титова (Плющенко), Н.А. Матвеева, О.А. Писарев // Журн.Физ. Химии. – 2013. – Т.87. – №6. – С.1008-1011. – 0.5 п.л.
2. Боровикова Л.Н. Влияние температуры синтеза на спектральные и размерные характеристики наноконплексов селен-химотрипсин / Л.Н. Боровикова, А.В. Титова (Плющенко), А.И. Киппер, О.А. Писарев // Журн.Физ.Химии. – 2015. – Т.89. – №.3. – С.467-469. – 0.37 п.л.
3. Писарев О.А. Имобилизация химотрипсина на наночастицах серебра / О.А. Писарев, А.В. Титова (Плющенко), Л.Н. Боровикова, А.И. Киппер, Т.М. Ворошилова, Е.Ф. Панарин // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2016. – № 3. – С. 790-793. – 0.5 п.л.
4. Плющенко А.В. Протеолитическая активность химотрипсина, иммобилизованного на наночастицах селена / А.В. Плющенко, Л.Н. Боровикова, О.А. Писарев // Прикладная биохимия и микробиология. – 2018. – Т. 54. – №4. – С. 362-365. – 0.5 п.л.
5. Плющенко А.В. Поверхностный плазмонный резонанс и агрегативная стабильность комплексов наночастиц серебра с химотрипсином / А.В. Плющенко, К.А. Митусова, Л.Н. Боровикова, А.И. Киппер, О.А. Писарев // Оптика и спектроскопия. – 2018. – Т. 125. – №2. – С. 234-239. – 0.75 п.л.
6. Плющенко А.В. Влияние способа синтеза наноконплексов на протеолитическую активность химотрипсина, иммобилизованного на наночастицах серебра / А.В. Плющенко, Л.Н. Боровикова, О.А. Писарев // Прикладная биохимия и микробиология. – 2019. – Т. 55. – №5. – С. 460-464. – 0.62 п.л.
7. Titova (Плющенко) А. Immobilization of chymotrypsin on selenium nanoparticles / А. Titova (Plyushchenko), L. Borovikova, А. Kipper, О. Pisarev // Chemistry Research Journal. – 2017. – V.2. – №5. – P. 204-214. – 1.09 п.л.

8. Титова (Плющенко) А.В. Наноструктурирование ферментов биогенными элементами. Агрегативная стабильность наноструктурных комплексов селена с химотрипсином / А.В. Титова (Плющенко), Л.Н. Боровикова, Н.А. Матвеева, О.А. Писарев // Нанотехнологии функциональных материалов (НФМ'12): Труды международной научно-технической конференции. – СПб. : Изд-во Политехн. ун-та, 2012. – С.130-134. – 0.35 п.л.
9. Титова (Плющенко) А.В. Ферментативная кинетика нанокомпозитов селена с химотрипсином / А.В. Титова (Плющенко), Л.Н. Боровикова, О.А. Писарев // Вторая Всероссийская молодежная научно-техническая конференция с международным участием "Инновации в материаловедении": сб. материалов / Ин-т металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН. – М. : ООО "Ваш полиграфический партнер", 2015. – С.136-137. – 0.12 п.л.
10. Титова (Плющенко) А.В. Ферментативная кинетика химотрипсина, иммобилизованного на наночастицах селена / А.В. Титова (Плющенко), Л.Н. Боровикова, О.А. Писарев // Неделя науки СПбПУ: материалы научного форума с международным участием. Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций. – СПб. : Изд-во Политехн. ун-та, 2015. – С.478-480. – 0.12 п.л.
11. Кученкова Л.Д. Иммобилизация химотрипсина на наночастицах серебра: влияние рН на стабильность нанокомпозитов / Л.Д. Кученкова, Л.Н. Боровикова, А.В. Титова (Плющенко), О.А. Писарев // Неделя науки СПбПУ: материалы научного форума с международным участием. Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций. – СПб. : Изд-во Политехн. ун-та, 2015. – С. 452-454. – 0.12 п.л.
12. Титова (Плющенко) А.В. Синтез нанокомпозитов на основе химотрипсина и наночастиц серебра и их стабильность в широком диапазоне рН / А.В. Титова (Плющенко) // Сборник материалов VI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 25-26 апреля 2016 г. – СПб. : Изд-во СПХФА, 2016. – С. 314-316. – 0.31 п.л.
13. Титова (Плющенко) А.В. Влияние рН и концентрации селена на ферментативную кинетику нанокомпозитов химотрипсина с наночастицами селена / А.В. Титова (Плющенко), К.А. Митусова, Л.Н. Боровикова, О.А. Писарев // VI Международная конференция с элементами научной школы для молодежи "Функциональные наноматериалы и высокочистые вещества". Суздаль, 3-7 октября 2016 г. / Сборник материалов. – М. : ИМЕТ РАН. – С. 189-190. – 0.13 п.л.
14. Митусова К.А. Агрегативная стабильность нанокомпозитов химотрипсина с наночастицами серебра / К.А. Митусова, А.В. Титова (Плющенко), Л.Н. Боровикова, О.А. Писарев // VI Международная конференция с элементами научной школы для молодежи



- "Функциональные наноматериалы и высокочистые вещества". Суздаль, 3-7 октября 2016 г. / Сборник материалов. – М. : ИМЕТ РАН. – С. 138-139. – 0.16 п.л.
15. Титова (Плющенко) А.В. Стабилизация наночастиц селена биологически активными синтетическими и природными полимерами / А.В. Титова (Плющенко), Л.Н. Боровикова, А.И. Киппер, О.А. Писарев // Неделя науки СПбПУ: материалы научной конференции с международным участием. Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций. – СПб. : Изд-во Политехн. ун-та, 2016. – С. 510-512. – 0.17 п.л.
  16. Титова (Плющенко) А.В. Влияние pH среды на спектральные и размерные характеристики наноконплексов серебра с химотрипсином / А.В. Титова (Плющенко) // XIV Российская ежегодная конференция молодых научных сотрудников и аспирантов «Физико-химия и технология неорганических материалов». Москва. 17-20 октября 2017 г. / Сборник трудов. – М. : ИМЕТ РАН, 2017. – С. 257-258. – 0.19 п.л.
  17. Плющенко А.В. Стабилизация наночастиц селена и серебра протеолитическим ферментом химотрипсином / А.В. Плющенко, К.А. Митусова, Л.Н. Боровикова, А.И. Киппер, О.А. Писарев // Неделя науки СПбПУ: материалы научной конференции с международным участием. Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций. – СПб. : Изд-во Политехн. ун-та, 2017. – С. 495-498. – 0.17 п.л.
  18. Плющенко А.В. Протеолитическая активность наноконплексов на основе химотрипсина и наночастиц серебра / А.В. Плющенко, К.А. Митусова // Сборник материалов VIII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 23-24 апреля 2018 г. – СПб. : Изд-во СПХФУ, 2018. – С. 284-286. – 0.2 п.л.
  19. Плющенко А.В. Влияние типа стабилизации на размерные характеристики наночастиц серебра / А.В. Плющенко, К.А. Митусова, Л.Н. Боровикова, О.А. Писарев // Физико-химические проблемы адсорбции в нанопористых материалах: Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием, 21-25 мая 2018 года, Москва-Клязьма, Россия. – М. : ИФХЭ РАН, 2018. – С. 214-216. – 0.14 п.л.
  20. Плющенко А.В. Влияние способа синтеза на размерные характеристики наноконпозитов на основе химотрипсина и наночастиц серебра / А.В. Плющенко // XV Российская ежегодная конференция молодых научных сотрудников и аспирантов «Физико-химия и технология неорганических материалов». Москва. 16-19 октября 2018 г. / Сборник трудов. – М. : ИМЕТ РАН, 2018. – С. 288-290. – 0.16 п.л.
  21. Плющенко А.В. Синтез наноконпозитов на основе химотрипсина и наночастиц серебра / А.В. Плющенко, К.А. Митусова, Л.Н. Боровикова, О.А. Писарев // Четвертый междисциплинарный научный форум с международным участием "Новые материалы и

- перспективные технологии". Москва. 27-30 ноября 2018 г. / Сборник материалов. Том I. – М. : ООО «Буки Веди», 2018. – С. 425-428. – 0.22 п.л.
22. Плющенко А.В. Размерные характеристики и механизм формирования наночастиц серебра, стабилизированных химотрипсином / А.В. Плющенко, К.А. Митусова, Л.Н. Боровикова, О.А. Писарев // Неделя науки СПбПУ: материалы научной конференции с международным участием, 19-24 ноября 2018 г. Институт биомедицинских систем и технологий. – СПб. : ПОЛИТЕХ-ПРЕСС, 2018. – С. 170-173. – 0.17 п.л.
23. Митусова К.А. Оптимизация условий синтеза нанокompозитов серебра с химотрипсином / К.А. Митусова, А.В. Плющенко, Л.Н. Боровикова, А.И. Киппер, О.А. Писарев // Неделя науки СПбПУ: материалы научной конференции с международным участием, 19-24 ноября 2018 г. Институт биомедицинских систем и технологий. – СПб. : ПОЛИТЕХ-ПРЕСС, 2018. – С. 144-147. – 0.17 п.л.
24. Плющенко А.В. Синтез и размерные характеристики наночастиц селена, стабилизированных химотрипсином / А.В. Плющенко, Л.Н. Боровикова, О.А. Писарев // Инновационные материалы и технологии: материалы докладов Международной научно-технической конференции молодых ученых – Минск : БГТУ, 2019. – С. 386-388. – 0.19 п.л.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор искренне благодарит своего научного руководителя, идейного вдохновителя работы, к.х.н., доц. Олега Александровича Писарева, за активную помощь и поддержку на всех этапах выполнения данного исследования. Особую благодарность автор выражает Людмиле Николаевне Боровиковой (сотруднику Института высокомолекулярных соединений РАН) за помощь в проведении экспериментов и обработке данных, а также за обсуждение и критику всех проводимых экспериментов. Автор благодарит Татьяну Михайловну Ворошилову (сотрудника Всероссийского центра экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова) за проведение экспериментов по исследованию антибактериальной активности, а также Игоря Леонидовича Потокينا (сотрудника НИИ Особо Чистых Биопрепаратов) за получение изображений методом просвечивающей электронной микроскопии.