

3. Flory P.J. Prediction of thermodynamic properties of polymer solutions. *J. of Chemical Physics*, 1941, vol. 9, pp. 660-667.
4. Hugelin Ch., Dondos A. *Macromol. Chem.*, 1989, vol. 126, pp. 206-216.
5. Нестеров А.Е., Липатов Ю.С. Термодинамика растворов и смесей полимеров. *Киев, Наукова Думка*, 1984, 300 с. [Nesterov A.E., Lipatov Yu.S. Thermodynamics of solutions and mixtures of polymers. *Kiev, Naukova Dumka*, 1984, pp. 300. (In Russ.)]
6. Scott R. Prediction of thermodynamic properties of polymer solutions. *J. of Chemical Physics*, 1949, vol. 17, pp. 279-285.
7. *Полимерные смеси*, под редакцией Д. Пола и С. Ньютен. М.: Мир, 1981, т. 1, 549 с. [*The Polymeric mixtures*, ed. D. Pola and S. Nyuten. М.: Mir, 1981, vol. 1, 549 p. (In Russ.)]
8. Масимов Э.А., Багиров Т.О., Саламова У.Р., СалехАзерпур. *Вестник Бакинского университета, серия физико-математических наук*, 1998, № 2, с. 82-85. [Masimov E.A., Bagirov T.O., Salamova Y.R., Saleh Azerpur. *News of Baku University, A series of physical and mathematical sciences*, 1998, no. 2, pp. 82-85. (In Russ.)]
9. DobryA., Boyer-Kawencki F. Phase separation in polymer solution. *Polymer Sci.* 1947.
10. Albertsson P.A. Partition of cell particles and macromolecules. *3rd Ed., Willey Press: New York*, 1986, vol. 2, no. 1, pp. 90-100.
11. Кулезнев В.Н., Крохина Л.С., Оганесов Ю.Г., Злауск А.М. *Коллоидный журнал*, 1971, т. 33, № 1, с. 98-105. [Kuleznev V.N., Krokchina L.S., Oganessov Yu.Q., Zlausk A.M. *Colloid Journal*, 1971, vol. 33, no. 1, pp. 98-105. (In Russ.)]
12. Роговина Л.З., Слонимский Г.Л. *Успехи химии*, 1977, т. 46, № 10, с. 1871-1899. [Rogovina L.Z., Slonimskiy G.L. *Successes of Chemistry*, 1977, vol. 46, no. 10, pp.1871-1899. (In Russ.)]
13. Robara A., Patterson B. *Macromolecules*, 1977, vol. 10, no. 5, pp. 1021-1033.
14. Vandana G., Sunil N., Subhash C. *J.Polymer*, 2002, vol. 43, no. 11, pp. 3387-3390.
15. Zeman L., Patterson B. *Macromolecules*, 1972, vol. 3, no. 4, pp. 513-516.
16. Масимов Э.А., Багиров Т.О., Гасанова Х.Т. *Журнал изв. вузов «Химия и химическая технология»*, 2008, т. 51, вып. 2, с. 123-126. [Masimov E.A., Bagirov T.O., Hasanov H.T. *Journal of News of universities "Chemistry and Chemical technology"*, 2008, vol. 51, no. 2, pp.123-126. (In Russ.)]

СКАНИРУЮЩАЯ ЗОНДОВАЯ И ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ КАК ИНСТРУМЕНТ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ РАСТЕНИЙ НА КЛЕТОЧНОМ УРОВНЕ

Рогожин Е.А.¹, Васильченко А.С.²

¹ФГБУН Институт биоорганической химии им. ак. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, г. Москва, 117997, РФ
e-mail: rea21@list.ru

²ФГБУН Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН
Ул. Пионерская, 11, г. Оренбург, 460000, РФ
e-mail: avasilchenko@gmail.com

Аннотация. Применение методов сканирующей зондовой (атомно-силовой) и флуоресцентной микроскопии для детального изучения способов реализации биологической активности антимикробных пептидов (АМП) растительного происхождения на клеточном уровне организации может являться так называемой «отправной точкой» для их целенаправленного скрининга и последующего выбора для возможного прикладного использования в медицине, ветеринарии и сельском хозяйстве, в том числе для дизайна «антимикробных композиций», сочетающих несколько АМП с разным механизмом действия.

Ключевые слова: антимикробные пептиды растений, сканирующая зондовая (атомно-силовая) микроскопия, флуоресцентная микроскопия, механизм действия, клеточный уровень организации.

ATOMIC FORCE AND FLUORESCENT MICROSCOPY SUCH AS AN INVESTIGATION TOOL OF MODE OF PLANT ANTIMICROBIAL PEPTIDES ACTION AT THE CELLULAR LEVEL

Rogozhin E.A.¹, Vasilchenko A.S.²

Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences
ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997, Russia
e-mail: rea21@list.ru

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Russian Academy of Sciences
Pionerskaya str., 11, Orenburg, 460000, Russia
e-mail: avasilchenko@gmail.com

Abstract. An application of atomic force microscopy (AFM) and fluorescent microscopy to study in detail some approaches of biological activity realization of plant antimicrobial peptides (AMPs) at the cellular level could be appeared like mean “starting point” for their goal seeking followed selection to be practical used in medicine, veterinary and agriculture, further to design of “antimicrobial compositions” involving several AMPs with different modes.

Kew words: plant antimicrobial peptides, atomic force microscopy, fluorescent microscopy, mode of action, cellular level of arrangement.

На фоне наличия большого числа выделенных и охарактеризованных растительных полипептидов, обладающих антимикробными свойствами, наиболее актуальной является проблема их, так называемой дальнейшей «сортировки» по способу действия на микроорганизмы. В связи с этим в рамках данной работы было исследовано взаимодействие рекомбинантного аналога харпино-подобного катионного антимикробного пептида семян ежовника ЕсАМР1 (*Echinochloa crusgalli* L.), полученного методом гетерологической экспрессии в системе *Escherichia coli*, с конидиями фитопатогенного гриба *Fusarium solani* на клеточном уровне с использованием сочетания методом микроскопии высокого разрешения (лазерной флуоресцентной и атомно-силовой). Для детальной характеристики связывания ЕсАМР1 с оболочкой спор, а также его распределения внутри клеток впервые для высших грибов была проведена их визуализация методом сканирующей лазерной двухфотонной флуоресцентной микроскопией. В результате были получены изображения распределения пептида ЕсАМР1 в спорах гриба *F. solani* с разрешением около 130 нм. Для сравнения необходимо подчеркнуть, что предельно допустимое разрешение при измерении методом конфокальной флуоресцентной микроскопии составляло в среднем 600 нм. После 6 ч инкубирования значительное количество пептида было локализовано в цитоплазме споры, причем данное распределение было неравномерным. Сканирование оболочки споры в поперечном сечении также выявило неоднородность связывания пептида с ее оболочкой. Кроме того, характер связывания пептида с внешней поверхностью клеток спор носил равномерный характер, без образования агрегаций на поверхности спор. Полученные результаты могут указывать на внутриклеточную локализацию на специфической мишени действия ЕсАМР1. Наши данные свидетельствуют о механизме действия ЕсАМР1, который заключается в задержке роста мицелия из спор гриба без повреждения цитоплазматической мембраны. Известно, что особенностью строения грибов-микромикетов, в частности видов рода *Fusarium*, является наличие внутреннего слоя между внешним слоем клеточной стенки и плазматической мембраной. Общая толщина оболочки может достигать 200 нм [1, 2]. Измеренная толщина слоя, с которым связывается пептид оказалась равна 170 ± 40 нм. Разрешающая способность 4Рi-микроскопии около 130 нм, поэтому профиль распределения пептида через оболочку позволяет предположить, что действительная толщина слоя, с которым связывается пептид, может быть гораздо меньше измеренной. По данным электронной микроскопии [1], толщина внутреннего слоя клеточной стенки у грибов рода *Fusarium* около 50 нм, толщина плазматической мембраны около 10 нм, внешнего слоя клеточной стенки – около 120 нм. Размеры каждой из этих структур меньше разрешающей возможности используемой в данной работе экспериментальной установки для 4Рi-микроскопии, следовательно, на основании полученных данных на данном этапе исследований невозможно достоверно определить с какой именно из этих структур связывается пептид семян ежовника. Измерения, проведенные с разрешением 130 нм, показали, что пептид распределён по оболочке равномерно. При инкубации грибов с пептидом в течение 1-6 ч признаков неоднородного связывания ЕсАМР1 на оболочке не обнаружено. Это позволяет предположить, что на оболочке споры присутствует большое число центров связывания пептида, распределенных однородно.

С использованием метода АСМ была изучена способность пептида ЕсАМР1 изменять физические свойства поверхности грибных спор. Пептиды тестировали в диапазоне действующих концентраций 4,0-62,0 мкМ. В рамках данной работы была установлена зависимость между возрастанием его действующей концентрации и степенью нарушения (разрушения, разрыхления) поверхности грибных спор путем экспериментального определения среднеквадратичной шероховатости поверхности.

На изображения, полученных посредством атомно-силовой микроскопии, конидии *F. solani* выглядели как продолговатые объекты расположенные поодиночке, средние размеры которых составили $11,57 \pm 0,92$ мкм в длину, $3,66 \pm 0,81$ мкм в ширину и $0,78 \pm 0,11$ мкм в высоту, рассчитанный на этой основе объем составил $5,32$ мкм³. Клеточная стенка конидий визуализировалась как относительно гладкая поверхность со средними значениями шероховатости $4,21 \pm 1,34$ нм, без выраженных инвагинаций или эрозий. Конидии, обработанные антимикробным пептидом ЕсАМР1, взятым в концентрации 4 мкМ, не имели значимых качественных отличий от объектов в контрольной группе, однако морфометрическое исследование зафиксировало достоверное ($p < 0,05$) снижение значений длины и высоты спор. В свою очередь, увеличение действующей концентрации АМР до 32 мкМ позволило наблюдать определенные морфологические изменения грибных конидий, что в качественном отношении выразилось в уплощении клеток, вокруг которых визуализировался гранулярный материал, являющийся, предположительно фрагментами клеточной стенки. В количественном отношении обработанные АМР конидии характеризовались меньшими значениями ширины и высоты клеток по сравнению с контрольной группой. Ультраструктура поверхности конидий имела выраженные повреждения, заключающиеся во фрагментации и образовании инвагинаций, шероховатость клеточной стенки увеличивалась с $4,21 \pm 1,34$ до $6,3 \pm 1,45$ нм.

Дальнейшее двукратное увеличение концентрации ЕсАМР1 до 64 мкМ вело к полному или частичному лизису конидий *F. solani*, что фиксировалось также как уменьшение объема клеток на 83 %. При этом среднеквадратичная шероховатость поверхности увеличивалась более чем на 400 %, что свидетельствует о значительном изменении нормальной структуры клеточной стенки конидий. Известно, что клеточная поверхность защищает содержимое самой клетки и выполняет функцию посредника при взаимодействии с различными субстратами, другими клетками, организмами, так же как принимает участие в регуляции клеточной активности в ответ на внешние воздействия. Выяснение химических и физических особенностей строения клеточной поверхности и объяснение причин, по которым эти свойства изменяются в ответ на различные внешние факторы, является одной из основных задач для понимания функционирования живых

организмов. Характеристика структуры и свойств биологических поверхностей в значительной степени решается использованием разнообразных физических методов. Использование метода атомно-силовой микроскопии для решения данных задач в последнее время является одним из основных инструментов для количественного определения результатов воздействия разнообразных соединений на грибные споры. Экспериментальные данные по увеличению шероховатости поверхности грибных спор могут свидетельствовать о связи пептида ЕсАМР1, в первую очередь с внешним слоем клеточной стенки, структура которого дестабилизируется. Известно, что поверхностный слой клеточной стенки грибов состоит из глюканов и гликопротеидного ретикулума, в который погружены микрофибриллы хитина и хитозана [3]. Кроме того, в ее состав входит ряд поверхностных белков - амилоидов, представляющих собой агрегаты с филаментной морфологией и высоким содержанием с своей структуре β -слоев с β -тяжами, функция которых заключается в образовании фибрилл. Помимо амилоидов, на поверхности клеточной стенки грибов могут располагаться гидрофобные белки, названные гидрофобинами. Они представляют собой секреторные молекулы, содержащие семь остатков цистеина и выполняющие функцию закрепления (приклеивания) гиф и спор на твердых субстратах [4]. Ранее с помощью метода АСМ были проведены работы по исследованию механизмов патогенеза грибов рода *Fusarium* в растениях, изучению последовательных стадий внедрения грибного мицелия в растения и локализации в различных тканях (преимущественно в корнях). Подобные исследования имеют первоочередное значение для понимания факторов вирулентности патогенов и устойчивости растений, препятствующих первичному контакту спор и гиф на своих поверхностях.

Таким образом, в рамках данной работы впервые был изучен на клеточном уровне специфический для АМП растений механизм действия. Большинство АМП обладают мембранотропным механизмом действия, тогда как пептид ежовника ЕсАМР1 оставляет клетки-мишени без видимых повреждений. В работах [5, 6] была исследована взаимосвязь дефензина NaD1 из цветков душистого табака (*Nicotiana glauca*) с гифами фитопатогенного гриба *Fusarium graminearum* с использованием методов конфокальной флуоресцентной и трансмиссионной электронной микроскопии. Была показана временная зависимость степени связывания дефензина на компонентах клеточной стенки мицелия и попадание его в цитоплазму. При этом проникновение пептида внутрь клеток сопровождалось изменением проницаемости цитоплазматической мембраны без нарушения ее структуры. Методом электронной микроскопии было идентифицировано образование гранулированных структур в цитоплазме со средним диаметром частиц около 14-23 ангстрем через 2 ч после добавления АМП в концентрации 10 мкМ. Кроме того, показано, что гранулирование содержимого цитоплазмы приводило в конечном итоге к гибели клеток. Данный результат предполагает наличие внутриклеточных мишеней данного АМП для реализации его биологической функции. Также с использованием специфического органического флуорофора, дигидрорадамина 123, способного окисляться до родамина 123 в клетках грибов, было определено суммарное содержание активных форм кислорода, которое возрастало при концентрации дефензина 2 мкМ примерно в 400 раз по сравнению с контролем, а при 10 мкМ - примерно в 900 раз [5]. В дальнейшем была установлена кинетика изменения проницаемости мембраны гиф гриба *F. graminearum* в присутствии различных концентраций NaD1. Показано, что пептид увеличивал степень проницаемости цитоплазматической мембраны в диапазоне действующих концентраций 2,5-20 мкМ. Кроме того, поочередное удаление различных компонентов клеточной стенки гриба (внешнего слоя гликозилированных белков обработкой протеиназой К, β -1,3-глюканов инкубированием с NaOH с добавлением DTT, или обработкой β -глюканазой) позволило установить данные структурные полимеры, с которыми связывается данный дефензин для последующего проникновения в цитоплазму путем изменения проницаемости мембраны [6]. Кроме того, для данного АМП характерно образование димеров *in vivo*, увеличивающих антифунгальную активность [7], также установлено наличие гомологичного дефензина NsD2, секретируемого в культуральную среду [8].

В заключении хотелось бы подчеркнуть, что в рамках данной работы была проведена серия исследований по изучению взаимодействия антимикробного харпино-подобного пептида ЕсАМР1 семян ежовника (*E. crusgalli*) с фитопатогенным грибом *F. solani* на клеточном уровне. Впервые показано, что изучаемый пептид может обладать специфичностью действия, которая может заключаться в реализации особого механизма действия, что в конечном итоге приводит к проявлению фунгистатического эффекта.

Список литературы / References:

1. Glenn A.E., Richardson E.A., Bacon C.W. Genetic and morphological characterization of a *Fusarium verticillioides* conidiation mutant. *Mycologia*, 2004, vol. 96, no. 5, pp. 968-980.
2. Shi Z., Shen S., Zhou W., Wang F., Fan Y. *Fusarium graminearum* growth inhibition due to glucose starvation caused by osthon. *Int. J. Mol. Sci.*, 2008, vol. 9, pp. 371-382.
3. Georgopapadakou N.H. Update on antifungals targeted to the cell wall: focus on β -1,3-glucan synthase inhibitors. *Expert Opin. Investig. Drugs.*, 2001, vol. 10, pp. 269-280.
4. Belozerskaya T.A. Fungal hydrophobins: structure and function. *Mikologiya i fitopatologiya*, 2001, vol. 35, no. 1, pp. 3-11.
5. van der Weerden N.L., Lay F.T., Anderson M.A. The plant defensin, NaD1, enters the cytoplasm of *Fusarium oxysporum* hyphae. *J. Biol. Chem.*, 2008, vol. 283, no. 21, pp. 14445-14452.
6. van der Weerden N.L., Hancock R.E.W., Anderson M.A. Permeabilization of fungal hyphae by the plant defensin NaD1 occurs through a cell wall-dependent process. *J. Biol. Chem.*, 2010, vol. 285, no. 48, pp. 37513-37520.

7. Lay F.T., Schirra H.J., Scanlon M.J., Anderson M.A., Craik D.J. The three-dimensional solution structure of NaD1, a new floral defensin from *Nicotiana glauca* and its application to a homology model of the crop defense protein alAFP. *J. Mol. Biol.*, 2003, vol. 325, pp. 175-188.

8. Dracatos P.M., van der Weerden N.L., Carroll K.T., Johnson E.D., Plummer K.M., Anderson M.A. Inhibition of cereal rust fungi by both class I and II defensins derived from the flowers of *Nicotiana glauca*. *Mol. Plant Pathol.*, 2014, vol. 15, no. 1, pp. 67-79.

ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНАЯ СИСТЕМА ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МУЦИНА

Шолина Е.А., Филатова Л.Ю., Киржанова Е.А., Балабушевич Н.Г.
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Ленинские горы, 1-3, г. Москва, 119991, РФ
e-mail: nbalab2008@gmail.com

Аннотация. Мукозальное применение биологически активных веществ, в том числе высокомолекулярных веществ, интенсивно развивается последние десятилетия. Полиэлектrolитная система доставки лекарственных веществ получена путем послойной адсорбции муцина и протамина на микросферах ватеритной формы карбоната кальция. Условия процесса влияли как на включение муцина в процессе получения микросфер CaCO₃, так и на его адсорбцию на мезопористой поверхности частиц. Изучены стабильность, морфология, изменение поверхностного заряда частиц при попеременной адсорбции на микросферах CaCO₃ отрицательно заряженного муцина и положительно заряженного протамина. Проведен подбор условий растворения ядер CaCO₃ в готовых полиэлектролитных микрочастицах. Обсуждены три способа иммобилизации биологически активных веществ (преимущественно белков, ферментов, пептидов) в полиэлектролитную систему на основе муцина, а также перспективность ее использования для доставки биологически активных веществ через слизистые оболочки.

Ключевые слова: муцин, адсорбция, микросферы CaCO₃, протамин, послойная адсорбция полиэлектролитов, мукоадгезивная система доставки лекарственных веществ.

POLYELECTROLYTE SYSTEM DELIVERY USING MUCIN

Sholina E.A., Filatova L.Y., Kirzhanova E.A., Balabushevich N.G.
Lomonosov Moscow State University
Leninskie gory, 1-3, Moscow, 119991, Russia
e-mail: nbalab2008@gmail.com

Abstract. Mucosal applications for different biologically active ingredients including high molecular weight substances have been developed actively last decades. Polyelectrolyte drug delivery system was obtained by mucin and protamine layer-by-layer (LbL) adsorption on microspheres made of calcium carbonate vaterite form. Process conditions influenced both mucin entrapment during CaCO₃ microspheres formation and its further adsorption on mesoporous surface of the particles. Particle stability, morphology, surface charge during negatively charged mucin and positively charged protamine LbL adsorption on CaCO₃ microspheres have been studied. Conditions for CaCO₃-core dissolution inside formed LbL-particles have been selected. Three different ways for biologically active substances (mostly proteins, enzymes and peptides) immobilization in polyelectrolyte mucin-based system have been discussed together with their possible mucosal application.

Key words: mucin, adsorption, CaCO₃-microspheres, protamine, polyelectrolyte layer-by-layer adsorption, mucoadhesive drug delivery system.

В настоящее время активно растет интерес к муцинам – гликопротеинам, которые являются основным компонентом слизистых поверхностей, выстилающих желудочно-кишечный тракт, носовую и ротовую полости, глаза и т.д. [1, 2]. Муцины обладают высокой молекулярной массой и имеют в составе до 80 % углеводов, представленных галактозой, *N*-ацетилглюкозамином, *N*-ацетилгалактозамином, фукозой и сиаловыми кислотами. Белковый стержень состоит из центрального гликозилированного участка, содержащего преимущественно серин, треонин и пролин, а также участков, богатых цистеином, благодаря которым образуются дисульфидные связи как внутри, так и между молекулами мономеров. В составе слизи муцины выполняют функцию барьера для всасывания как патогенов, так и лекарственных веществ. Мукоадгезивные лекарственные формы способны взаимодействовать со слизистыми оболочками, удерживаясь на их поверхности продолжительное время, что способствует увеличению биодоступности включенных в них биологически активных веществ (БАВ). В связи с этим разработка мукозальных систем доставки БАВ является актуальной.

Метод последовательной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов на коллоидных частицах различной природы активно исследуется для иммобилизации БАВ, включая белки и пептиды, перспективных для системной и направленной доставки [3]. Использование в качестве коллоидных частиц мезопористых ватеритных микросфер CaCO₃ позволяет включать значительные количества БАВ, а после