

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 577

МОДЕЛЬНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ТРАНСПОРТА ПРОТИВОВИРУСНОГО ПРЕПАРАТА

© 2021 г. Я. А. Забродская^{1,2,3,4,*}, Ю. Е. Горшкова^{5,6}, А.-П. С. Шурыгина³, А. В. Бродская³,
Д. Е. Бобков^{3,7}, А. Н. Горшков³, А. Б. Бондаренко³, Д. В. Лебедев^{1,4}, В. В. Егоров^{1,4,8}

¹ НИЦ “Курчатовский институт” – ПИЯФ, Гатчина, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

³ Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородиной Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

⁵ Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

⁶ Институт физики, Казанский федеральный университет, Казань, Россия

⁷ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

⁸ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: yana@zabrodskaaya.net; zabrodskaaya_ya@pnpi.nrcki.ru

Поступила в редакцию 09.09.2020 г.

После доработки 08.04.2021 г.

Принята к публикации 09.04.2021 г.

Установление механизма действия потенциальных лекарственных субстанций является неотъемлемым этапом разработки новых лекарственных препаратов. Показано взаимодействие противовирусного пептида РВ1_{6–14} с липидными мембранами в клеточной и бесклеточной модельных системах. Проникновение флуоресцентно меченого аналога пептида в клетки в течение 15 мин показано методами проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии. Особенности взаимодействия исследуемого пептида с клеточными мембранами изучены методами малоуглового рассеяния нейтронов, атомно-силовой микроскопии и динамического светорассеяния. Показано, что в присутствии пептида (в буфере 5% этанола/5% ДМСО/ФСБ) наблюдается увеличение размера модельных липосом (ФХ/ФГ) с одновременным незначительным изменением ζ-потенциала, что может быть интерпретировано как следствие изменения поверхностного заряда и свидетельствовать о способности пептида к взаимодействию с липидным бислоем, в том числе не исключая его проникновение внутрь мембраны. Полученные данные могут быть использованы как при изучении механизма транспорта терапевтического пептида, так и для разработки средств доставки лекарственных препаратов.

DOI: 10.31857/S0023476121050258

ВВЕДЕНИЕ

Воздействие лекарственных препаратов на основе пептидов можно считать наиболее специфичными как при взаимодействии с белками, так и при модулировании белок-белковых взаимодействий. Однако такие препараты могут как нарушать взаимодействия, лежащие в основе возникновения и развития каких-либо патологических состояний, так и приводить к возникновению способности белков к новым взаимодействиям [1], что может быть использовано в терапевтических целях. Белок-белковые взаимодействия лежат в основе большей части биологических процессов, включая комплексы структурных белков, регуляцию транскрипции, трансляции и репликации. В то же время изменение белок-белковых взаимодействий и возникнове-

ние способности белков к гомоолигомеризации являются причиной различных заболеваний, в том числе онкологических и нейродегенеративных [2].

Важным этапом при разработке лекарственных препаратов является выяснение их механизма действия [3]. При этом необходимо не только определить мишень и показать достаточную специфичность, но и доказать, что разрабатываемый препарат способен достичь, как минимум, в модельной системе той мишени, на которую он направлен.

В данной работе рассматривается противовирусный пептидный препарат (РВ1_{6–14}), описанный в [4, 5]. Показано, что пептид РВ1_{6–14} способен воздействовать на N-концевой участок субъединицы РВ1 полимеразного комплекса вируса

гриппа А, вызывая изменение его конформации. Это приводит к нарушению структуры нативного полимеразного комплекса вируса гриппа, что, в свою очередь, делает невозможной репликацию вируса и обуславливает противовирусный эффект пептида [6, 7]. В контексте применения данного пептида в качестве активного компонента потенциального противовирусного препарата необходимо показать, что он способен проникать в клетки, а также установить механизм проникновения, поскольку репликация вируса гриппа и работа полимеразного комплекса происходит внутри инфицированной клетки.

Одним из барьеров, преодолеваемых данным пептидом на пути к белковой мишени, является плазматическая мембрана. Биологическая мембрана (БМ) – структурный элемент клетки, представляющий собой динамичную функциональную оболочку, которая отделяет клетку от внешней среды (а клеточные органеллы от цитоплазмы клетки) и осуществляет важные клеточные процессы. Основными компонентами БМ являются липиды (фосфолипиды, гликолипиды и др.), белки и холестерин, каждый из которых выполняет важную роль в биофизических и биохимических процессах. Поскольку фосфолипидный бислой – это структурная основа биологических мембран, то крайне важно понять не только механизм пептид-липидного взаимодействия, но и создать методические основы для изучения проникновения противовирусного пептида РВ1_{6–14} внутрь липидного бислоя.

На первом этапе изучения механизма взаимодействия пептида с липидными мембранами и его проникновения в клетку были использованы модельные однослойные липосомы, состоящие из нейтральных фосфолипидов ДМФХ, а также смеси ДПФХ и ДПФЭ (80/20), которые являются основными компонентами мембран млекопитающих [8]. Поскольку пептид РВ1_{6–14} имеет положительный заряд, для установления роли электростатического взаимодействия между пептидом и липидными мембранами использовали отрицательно заряженные фосфолипидные бислои ДМФХ/ДМФГ (70/30) [9].

Цель данного исследования – показать возможность проникновения пептида РВ1_{6–14} внутрь клеток, а также изучить механизм проникновения пептида РВ1_{6–14} через клеточную мембрану на модельной системе, используя методы проточной цитофлуориметрии, конфокальной микроскопии и малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Пептиды РВ1_{6–14} (Ac-TLLFLKVPV-NH₂) и FITC-РВ1_{6–14} (FITC-TLLFLKVPV-NH₂)

были синтезированы в ООО “Пептидные технологии” (Санкт-Петербург, Россия). Чистота составила более 95%.

Клетки А549 (карциномы легкого человека) получены из коллекции ФГБУ “НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева” Минздрава России. В экспериментах по проточной цитофлуориметрии использовали однодневный монослой клеток А549, выращенный в лунках шестилуночного планшета, каждая из которых содержала примерно 10⁶ клеток. Перед экспериментом клетки отмывали от бычьей эмбриональной сыворотки фосфатно-солевым буфером (ФСБ, Sigma). В экспериментах по конфокальной микроскопии использовали однодневный монослой клеток А549, выращенный в лунках 24-луночного планшета на круглых покровных стеклах (Menzel).

Для приготовления липосом использовали нейтральные фосфолипиды ДПФЭ (1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин), ДПФХ (1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолин), ДМФХ (1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолин) и отрицательно заряженные фосфолипиды ДМФГ (1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфоглицерин) производства Sigma-Aldrich (Merck).

Использовали ФСБ, приготовленный на дистиллированной (18.2 МΩ·см, Merck Millipore) или дейтерированной воде (НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ) без или с добавлением дейтерированного этанола (этанол-d₆, Fluka AG, Buchs, Switzerland) и дейтерированного диметилсульфоксида (ДМСО-d₆, Sigma-Aldrich).

Проточная цитофлуориметрия. Сухой пептид РВ1_{6–14} был растворен в буфере 5% этанол/5% ДМСО (недейтерированные), разбавлен в 10 раз средой альфа-МЕМ (Биолот) без бычьей эмбриональной сыворотки до конечной концентрации 33 мкМ и добавлен к клеткам А549 (по 5 мл в каждую лунку). В контрольные лунки была внесена среда альфа-МЕМ без сыворотки, содержащая 0.5% этанол/0.5% ДМСО. Таким образом, количество молекул пептида, приходящееся на одну клетку, составило около 10¹². Пептид вносили в лунки шестилуночного планшета за 60, 30, 15, 5 и 1 мин до остановки эксперимента, после чего клетки инкубировали в течение соответствующего времени в СО₂-инкубаторе (в атмосфере 5%-ного СО₂) при температуре 37°C. Клетки А549 в лунках без добавления пептида (контрольные клетки) инкубировали в течение 60 мин. После двукратной отмывки ФСБ к клеткам добавили 300 мкл раствора трипсин-ЭДТА. Отмытые от трипсина клетки ресуспендировали в ФСБ и разделили на три аликвоты (технические повторы) до концентрации 0.5 × 10⁵ клеток/мл для проведения измерений на проточном цитофлуориметре.

Образцы анализировали с использованием проточного цитофлуориметра Navios (Beckman Coulter), оснащенного диодным лазером с длиной волны возбуждения 488 нм, для детектирования клеток, положительных по флуоресценции FITC. По диаграммам прямого и бокового рассеяния была определена популяция клеток A549, имеющих одинаковые размер и форму; в каждом образце проанализировано не менее 10^5 клеток. Клетки, положительные по флуоресценции FITC, принимали за содержащие пептид. Математическое описание проводили с помощью программного обеспечения Navios Software v.1.2 и Kaluza v.1.2, Beckman Coulter. Данные визуализировали с использованием программного обеспечения Origin2015.

Конфокальная микроскопия. К клеткам A549 добавляли пептид FITC-PB1₆₋₁₄ до конечной концентрации 33 мкМ. После инкубации в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂, клетки отмывали ФСБ и фиксировали раствором 4%-ного параформальдегида в ФСБ. Препараты клеток заключали в раствор, препятствующий выгоранию флуоресцентного красителя (Mounting medium, Sigma, США), и исследовали с помощью лазерного сканирующего микроскопа Leica TSC SP8, оснащенного гибридным детектором с повышенной чувствительностью. Флуоресценцию FITC возбуждали при помощи аргонового лазера (488 нм) и регистрировали в области длины волн флуоресценции 510–550 нм. Использовали объектив 63×, получали изображение размером 1024 × 1024 пикселя. Съемку и обработку изображений проводили в программе Leica Application Suite X.

Малогоугольное рассеяние нейтронов. Для приготовления липосом использовали фосфолипиды ДМФХ, ДПФХ, ДМФГ и ДМФЭ. Сухой липид ДМФХ (ФХ) или смеси липидов ДМФХ/ДМФГ (ФХ/ФГ) в соотношении 70/30, ДПФХ/ДПФЭ (ФХ/ФЭ) в соотношении 80/20 растворяли в ФСБ, приготовленном на D₂O (pD = 7.4). Концентрация липидов в буфере составляла 2 мас. %. Для гомогенизации раствора использовали шейкер. Однородный раствор мультислойных везикул (МСВ) был получен методом замораживания–оттаивания в диапазоне $t = \pm 20^\circ\text{C}$ от температуры главного фазового перехода (t_m) используемых липидов. Процедуру повторяли 6 раз. Однослойные везикулы (ОСВ) были приготовлены путем пропускания приготовленного раствора МСВ через поликарбонатные фильтры диаметром 50 нм с помощью экструдера (Hamilton Co., Reno, Nevada, USA) при температуре выше t_m . После 25 повторений получался стабильный раствор ОСВ.

Полученные липосомы смешивали в равных объемах с пептидом в концентрации 1 мг/мл, растворенном в смеси этанол-d₆/ДМСО-d₆/ФСБ.

В качестве контроля использовали липосомы, к которым добавляли только растворитель. Конечная концентрация липида составляла 1 мас. %. В работе использовали два различных состава растворителя: конечная концентрация этанол-d₆/ДМСО-d₆ составляла 5%/5% (обозначены ФХ/ФГ_5-5, ФХ/ФЭ_5-5) либо 2.5%/2.5% (обозначены ФХ/ФГ_2-2). Для оценки влияния растворителя на полученные липосомы зарегистрировали спектры исходных липосом в ФСБ и спектры липосом, к которым был добавлен растворитель ДМСО-d₆/ФСБ или этанол-d₆/ДМСО-d₆/ФСБ.

Измерения проводили на высокопоточном реакторе ИБР-2, спектрометр ЮМО (ОИЯИ, г. Дубна, Россия), с использованием двух детекторов методом времени пролета [10, 11] в диапазоне переданного импульса 0.005–0.5 Å⁻¹. Первичную обработку экспериментальных данных проводили в программе SAS [12], позволяющей нормировать полученный спектр на независимый ванадиевый рассеиватель, вычитать данные фонового образца [13]. Образцы в кварцевых кюветах помещали в термостатический бокс. Измерения проводили 20 мин при 37°C для всех исследуемых систем.

В общем случае рассеяние от монодисперсных центросимметричных частиц имеет вид

$$I(q) = I_0 P(q) S(q) + bkg, \quad (1)$$

где $I_0 = nV^2(\Delta\rho)^2$ – интенсивность рассеяния в нулевой угол, q – переданный импульс, n – объемная концентрация частиц с объемом V , $\Delta\rho = \rho_s - \bar{\rho}_m$ – контраст между плотностями длин рассеяния растворителя и липосом, $P(q) \equiv F^2(q)$ – квадрат форм-фактора, $S(q)$ – структурный фактор, описывающий взаимодействие между частицами, bkg – остаточный некогерентный фон, имеющий место в эксперименте по рассеянию нейтронов. Для сильно разбавленных и слабо взаимодействующих между собой частиц, какими являются фосфолипидные ОСВ с массовой долей ≤ 2 мас. %, $S(q) = 1$ [14, 15]. В первом приближении ОСВ представляют собой полые сферы с оболочкой (липидный бислоем), разделяющей внутреннюю и внешнюю среду. Таким образом, рассеяние на ОСВ будет описываться форм-фактором, нормированным на объем оболочки, сформированной липидным бислоем (V_b) [16]:

$$P(q) = \frac{\phi}{V_b} \left[\frac{3V_{in}(\rho_s - \bar{\rho}_m)J_1(qR_{in})}{qR_{in}} + \frac{3V_v(\bar{\rho}_m - \rho_s)J_1(qR_v)}{qR_v} \right]^2 + bkg, \quad (2)$$

где ϕ – объемная доля липидного бислоя, V_{in} и R_{in} – объем и радиус сферы, образованной растворителем

внутри мембраны соответственно, V_v и R_v – объем и радиус ОСВ, J_1 – сферическая функция Бесселя первого порядка ($J_1 = (\sin(x) - x\cos(x))/x^2$).

Структурные параметры ОСВ получены в результате аппроксимации экспериментальных спектров моделью (2) в программе SasView 4.2.2 [17].

Толщину липидного бислоя T определяли с точностью до 1 Å [18] с использованием приближения Кратки–Порода:

$$I(q) = I_0 q^{-2} \exp(-R_v^2 q^2), \quad (3)$$

где радиус гирации $R_v = \sqrt{-\text{tg} \alpha}$ при построении зависимости $\ln(Iq^2) vs q^2$, тогда

$$T = \sqrt{12} R_v. \quad (4)$$

Атомно-силовая микроскопия (АСМ). Для исследования морфологии методом АСМ образцы готовили по стандартной методике [20]. Раствор исходного образца (50 мкл), приготовленного по процедуре, описанной в разделе МУРН, был разбавлен 3 мл ФСБ для уменьшения концентрации липосом в растворе. 50 мкл приготовленного образца помещали на свежерасщепленную подложку из слюды, инкубировали 3 мин для адсорбции везикул из раствора на поверхности слюды, после чего осторожно отмывали дистиллированной водой без воздействия на образец воздуха для удаления свободных липосом. Образцы высушивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Измерения топографии поверхности образца и фазы проводили в полуконтактном режиме с использованием зонда NSG01 на атомно-силовом микроскопе NTEGRA PRIMA (NT-MDT Spectrum Instruments, Зеленоград, Россия). Обработку изображений и получение распределения частиц по размерам осуществляли в программе Image Analysis P9, версия 3.5 (NT-MDT Spectrum Instruments).

Измерение дзета-потенциала. Для определения стабильности исследуемых систем проводили измерение дзета-потенциала (ζ) на приборе Photocor (Фотокор, Россия). В кювету помещали 3 мл раствора, приготовленного, как описано для АСМ. Измерения проводили, как и в МУРН-эксперименте, при $t = 37^\circ\text{C}$.

Метод определения ζ -потенциала основан на исследовании динамического рассеяния света в режиме измерения скорости потока. Скорость движения частиц в поле, рассчитанная из фазовой функции, позволяет определить электрофоретическую подвижность частиц, $\mu_E = v/E$, где v – скорость движения заряженных частиц в электрическом поле с напряженностью E . Электрофоретическую подвижность частиц пересчитывали в ζ -потенциал, ζ , с использованием теории Смолуховского и применением поправок для

различной толщины двойного электрического слоя по формуле

$$\zeta = (3\eta\mu_E)/2\epsilon, \quad (5)$$

где ϵ – диэлектрическая проницаемость, η – вязкость среды.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проникновение пептида PVI₆₋₁₄ в клетки. Перспектива применения пептидов, как и любого другого соединения-кандидата, в качестве лекарственного препарата определяется, в том числе, его способностью к проникновению в клетки, а также временными параметрами этого процесса. В качестве модельной системы для изучения транспорта пептида использовали клетки A549 (карциномы легкого человека) как наиболее адекватную модель для изучения функционирования вируса гриппа, поражающего именно эпителиальные клетки дыхательных путей [19]. Клетки инкубировали с FITC-меченым пептидом в условиях, описанных выше. Возможность использования FITC-меченого пептида как аналога не модифицированного была показана в [4] на клетках MDCK для малых концентраций пептида. Поскольку обе изучаемые формы пептида обладают сходной противовирусной активностью, то предполагается, что эффективность и механизм проникновения в клетки у них также аналогичны.

Временные и количественные параметры проникновения (относительное число клеток A549, положительно флуоресцирующих при длине волны возбуждения 488 нм, соответствующей FITC, через разные промежутки времени) оценивали методом проточной цитофлуориметрии. Динамика проникновения пептида в клетки представлена на рис. 1а.

По полученным данным можно сделать вывод, что пептид проникает в клетки между 5-й и 15-й минутами инкубации. Данный временной интервал является приемлемым для использования исследуемого пептида в дальнейшем в качестве лекарственно препарата.

Основываясь на результатах, полученных методом цитофлуориметрии, нельзя однозначно определить, проник ли пептид внутрь клеток или сорбировался на клеточных мембранах. В связи с этим проникновение пептида внутрь клеток подтверждало методом конфокальной микроскопии, регистрируя флуоресценцию FITC-меченого пептида на оптическом срезе, проходящем через ядро клетки. На рис. 1б представлены конфокальные изображения клеток A549, инкубированных с пептидом в присутствии ДМСО и этанола.

Результаты эксперимента показали, что пептид, растворенный в оптимальной смеси 5%

ДМСО и 5% этанола [5] и разбавленный до необходимой концентрации клеточной средой, способен не только проникать внутрь клеток в виде гранул (отмечено стрелкой 1 на рис. 1б), но и диффузно распределяться по их цитоплазме (отмечено стрелками 2, 3 на рис. 1б). Отметим, что клетки имеют форму, характерную для живых и нормально функционирующих клеток А549.

Таким образом показано, что пептид РВ1₆₋₁₄ проникает в клетки А549 в присутствии ДМСО к 15-й минуте инкубации по данным проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии. При использовании растворителя 5% этанол/5% ДМСО клетки сохраняют характерную для живых нормально функционирующих клеток форму, что подтверждается данными конфокальной микроскопии.

Взаимодействие пептида РВ1₆₋₁₄ с моделями клеточных мембран. Особенности механизма проникновения пептида РВ1₆₋₁₄ через клеточную мембрану изучали с использованием модельной системы – однослойных мембранных везикул.

Взаимодействие пептида с мембраной включает три основных этапа [21]:

- в водном растворе амфифильные пептиды образуют спиральные структуры, чтобы “спрятать” свои гидрофобные сегменты внутрь и “столкнуться” с мембранами посредством диффузии, а также электростатического притяжения;

- после накопления вокруг мембран происходят конформационные изменения, вызванные гидрофобными взаимодействиями. Пептиды претерпевают конформационные изменения, экспонируют гидрофобные сегменты, за счет чего встраиваются в поверхность раздела двух липидных слоев;

- связанные пептиды выполняют свои биологические функции за счет кооперативного взаимодействия друг с другом и с мембранами. Следовательно, функции, индуцированные пептидами, существенным образом зависят от концентрации и физико-химических свойств пептида (структура, заряд, гидрофобность и др.), а также от липидного состава и свойств мембраны (заряда, модуля изгиба, модуля растяжения и др.).

На первом этапе работы было оценено влияние растворителя (2.5% этанол-d₆/2.5% ДМСО-d₆/ФСБ) на структуру модельных липосом ФХ/ФГ. Сначала к приготовленным липосомам добавляли только ДМСО-d₆ до конечной концентрации 2.5% и регистрировали спектр МУРН. Затем был получен спектр липосом в 2.5% этанол-d₆/2.5% ДМСО-d₆/ФСБ и в 5% этанол-d₆/5% ДМСО-d₆/ФСБ (рис. 2а). Изменение толщины липидного бислоя T (Å) оценивали из построения Кратки–Порода в координатах $\ln(Iq^2)$ vs q^2 (рис. 2б). Толщина бислоя составила 36–38 Å и не

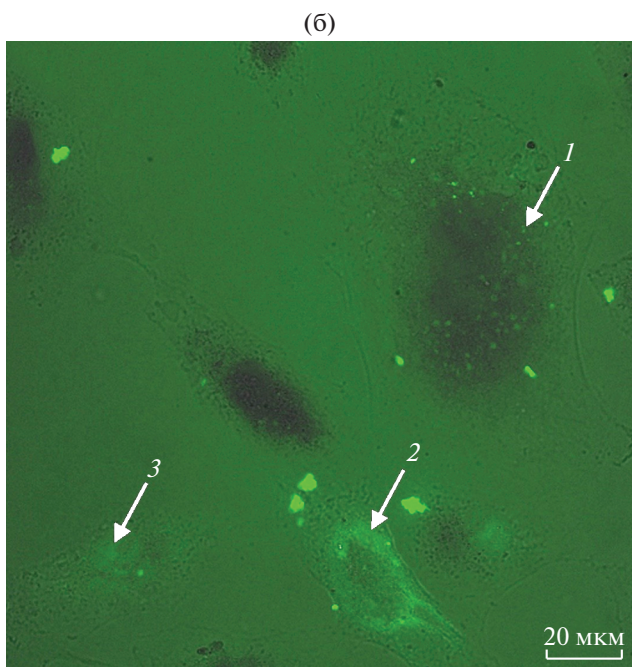
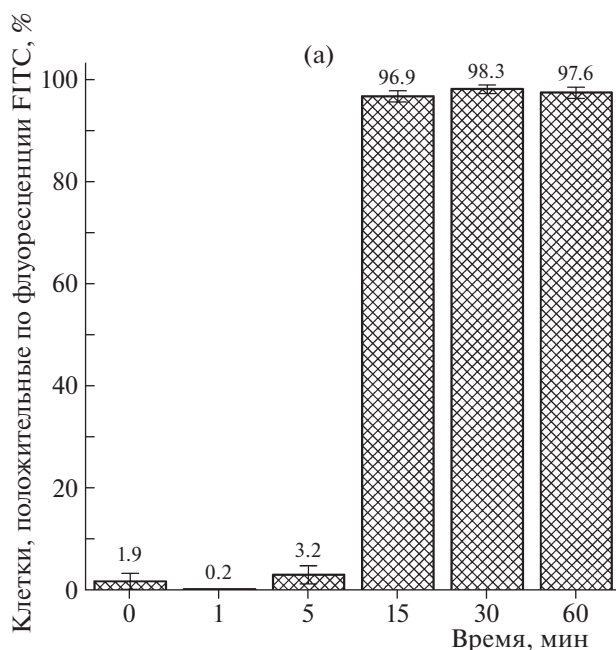


Рис. 1. Зависимость относительного числа клеток, флуоресцирующих на длине волны, соответствующей меченому FITC-пептиду, от продолжительности инкубации клеток А549 в присутствии данного пептида (а). Конфокальное изображение – оптический срез, проходящий через ядро клетки А549, инкубированной с пептидом, растворенным в 5% этанол/5% ДМСО и разбавленным средой альфа-МЕМ в 20 раз до концентрации 33 мкМ. Представлено совмещенное изображение флуоресценции при длине волны возбуждения 488 нм и оптического изображения в проходящем свете. Стрелками отмечены области клеток, в которых наблюдается флуоресценция FITC-меченого пептида. Длина масштабного отрезка составляет 20 мкм. Стрелка 1 – пептид в виде гранул, стрелки 2, 3 – пептид, диффузно распределенный по цитоплазме клеток (пояснения в тексте) (б).

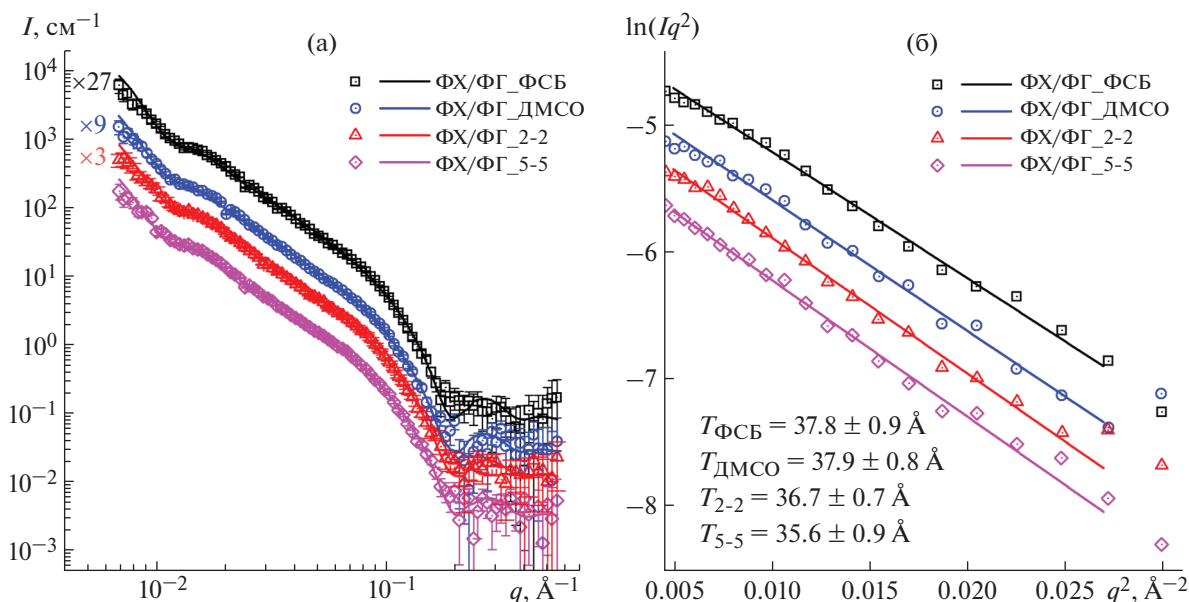


Рис. 2. Кривые МУРН для ОСВ ФХ/ФГ (2 мас. %) в ФСБ (квадраты), в 2.5% ДМСО-d₆/ФСБ (круги), в 2.5% этанол-d₆/2.5% ДМСО-d₆/ФСБ (треугольники) и в 5% этанол-d₆/5% ДМСО-d₆/ФСБ (ромбы); значения интенсивности спектра ФХ/ФГ_ФСБ, ФХ/ФГ_ДМСО и ФХ/ФГ_2-2 умножены на 27, 9 и 3 соответственно для лучшей визуализации данных (а). Построение Кратки–Порода ($\ln(Iq^2)$ vs q^2) спектров из (а) для определения толщины липидного бислоя $T = \sqrt{12}R_l$, где $R_l = \sqrt{-\text{tg } \alpha}$ (б).

зависела (в пределах погрешности) от растворителя, однако наблюдалась тенденция к уменьшению толщины везикул в растворах, содержащих одновременно этанол и ДМСО. При этом добавление только ДМСО не влияло на структурные параметры модельных мембран. Подобный результат был ожидаем, поскольку незначительное содержание ДМСО (до 20 мас. %) в растворе ДМСО/вода приводит лишь к изменению структуры свободной воды и частичной дегидратации липидного бислоя ФХ-липосом, и только при концентрации ДМСО более 40 мас. % молекулы ДМСО взаимодействуют непосредственно с поверхностью липидной мембраны [22], приводя к слипанию ОСВ с дальнейшим образованием МСВ [23, 24].

Влияние пептида РВ1_{6–14} на структуру липосом ФХ/ФГ изучали методом МУРН в двух растворителях: 2.5% этанол-d₆/2.5% ДМСО-d₆/ФСБ и 5% этанол-d₆/5% ДМСО-d₆/ФСБ (рис. 3а). Анализ толщины липидного бислоя проводили по построению Кратки–Порода (рис. 3б). Для ОСВ ДМФХ/ДМФГ в ФСБ $T^* = 37.8 \pm 0.9 \text{ \AA}$, что с учетом коэффициента 1.15 (для липосом ДМФХ в воде в жидкокристаллической (ЖК) фазе) [25] составляет 43.47 Å. Это значение близко к 44.20 Å для ДМФХ-d54 в воде в ЖК-фазе [26] и отлично согласуется с толщиной липидного бислоя 44.60 Å, полученной для ДМФХ-d54/ДМФГ в отсутствие пептида в [27]. Отметим, что если в слу-

чае растворения пептида РВ1_{6–14} в 2.5% этанол-d₆/2.5% ДМСО-d₆/ФСБ, а также при добавлении буфера 5% этанол-d₆/5% ДМСО-d₆/ФСБ наблюдалась небольшая тенденция к уменьшению толщины липидного бислоя до $\sim 35.5 \text{ \AA}$ (табл. 1), то при добавлении пептида, растворенного в 5% этанол-d₆/5% ДМСО-d₆/ФСБ, наблюдалось значительное уменьшение толщины липидного бислоя (до $32.1 \pm 0.7 \text{ \AA}$). Данный эффект может быть связан как с увеличением растворимой реакционно-способной формы пептида (в растворителе, содержащем большую концентрацию этанола и ДМСО), так и со стабилизацией конформации пептида, способной к взаимодействию с мембраной.

Аналогичные данные относительно уменьшения толщины липидного бислоя модельных липосом ФХ/ФГ в присутствии пептида РВ1_{6–14}, растворенного в 5% этанол-d₆/5% ДМСО-d₆/ФСБ, получены в результате аппроксимации спектров МУРН в программе SasView моделью “ядро–оболочка” (рис. 3а, сплошные линии). Заведомо заниженные значения толщин T не анализировали, поскольку для корректного извлечения информации из нейтронного эксперимента необходимо использовать смесь ДМФХ-d54/ДМФГ совместно с частичной заменой D₂O на H₂O и применять модель, в которой гидрофобные и гидрофильные участки (головы и углеводородные хвосты) бислоя рассматриваются как отдельные слои [27].

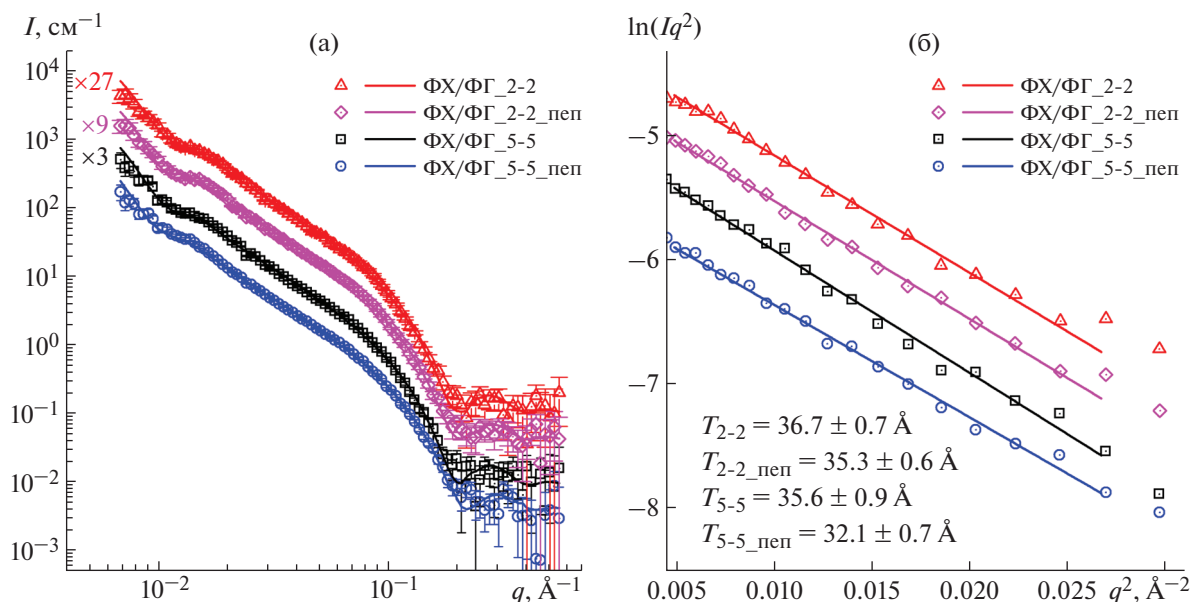


Рис. 3. Спектры МУРН липосом $\Phi X/\Phi Г$ в присутствии и в отсутствие пептида $PВ1_{6-14}$; точки – экспериментальные кривые, линии – теоретические спектры, полученные в программе SasView по рассчитанным параметрам липосом. Спектр $\Phi X/\Phi Г_{5-5_пеп}$ (круги) представлен без изменений; интенсивности спектров $\Phi X/\Phi Г_{5-5}$ (квадраты), $\Phi X/\Phi Г_{2-2_пеп}$ (ромбы) и $\Phi X/\Phi Г_{2-2}$ (треугольники) умножены на 3, 9 и 27 соответственно (а). Построение Кратки–Порода спектров из а для определения толщины липидного бислоя T (б).

Тем не менее полученный результат свидетельствует об уменьшении толщины липидного бислоя в присутствии пептида, как и данные, извлеченные из построения Кратки–Порода. Кроме того, для данной системы ($\Phi X/\Phi Г_{5-5_пеп}$) наблюдалось значительное увеличение радиуса липосомы с 250 до 285 Å (табл. 1, рис. 4). Отметим, что интенсивность рассеяния от чистого пептида $PВ1_{6-14}$, растворенного в 5% этанол- d_6 /5% ДМСО- d_6 /ФСБ (рис. 5а), меньше на 2 порядка, чем интенсивность рассеяния от липосом, в связи с чем оно не может оказывать значительного влияния на итоговый спектр рассеяния. Таким образом, наблюдаемое увеличение радиуса и уменьшение толщины ОСВ $\Phi X/\Phi Г$ обусловлены влиянием пептида на структуру липосом.

Одним из возможных объяснений наблюдаемых структурных изменений ОСВ $\Phi X/\Phi Г$ могло бы быть предположение о встраивании пептида

$PВ1_{6-14}$ в липидный бислой, поскольку увеличение количества вещества в мембране приводит к увеличению внутреннего радиуса липосом. Однако высказанное предположение не может объяснить уменьшения толщины бислоя и требует более детального изучения.

Интересным является тот факт, что при добавлении пептида $PВ1_{6-14}$ не наблюдалось изменений в спектрах МУРН модельных липосом $\Phi X/\Phi Э$ и, следовательно, детектируемых изменений структуры липосом (рис. 5б): толщина бислоя, вычисленная по построению Кратки–Порода (врезка на рис. 5б), составила ~ 42 Å для обеих систем. При аппроксимации кривых в программе SasView моделью “ядро–оболочка” параметры обеих систем также не различались в пределах погрешности: толщина бислоя составила 41.7 ± 0.3 и 41.6 ± 0.4 Å для липосом без пептида и с пептидом соответственно, а размер липосом со-

Таблица 1. Параметры липосом $\Phi X/\Phi Г$ (70/30), приготовленных в ФСБ; в ФСБ с 2.5% ДМСО; в ФСБ с 2.5% этанол- d_6 /2.5% ДМСО- d_6 (2-2) или 5% этанол- d_6 /5% ДМСО- d_6 (5-5); с пептидом $PВ1_{6-14}$, растворенным в 2.5% этанол- d_6 /2.5% ДМСО- d_6 /ФСБ (2-2_пеп) или 5% этанол- d_6 /5% ДМСО- d_6 /ФСБ (5-5_пеп)

	ФСБ	2.5% ДМСО	2-2	2-2_пеп	5-5	5-5_пеп
T^* , Å	37.8 ± 0.9	37.9 ± 0.8	36.7 ± 0.7	35.3 ± 0.6	35.6 ± 0.9	32.1 ± 0.7
T , Å	32.0 ± 0.2	31.9 ± 0.2	31.2 ± 0.2	30.7 ± 0.2	30.7 ± 0.2	28.7 ± 0.2
R , Å	248.0 ± 2.6	251.4 ± 4.6	252.0 ± 4.5	255.8 ± 2.0	258.5 ± 4.6	285.1 ± 2.3

Примечание. R – внутренний радиус везикулы; T – толщина липидного бислоя везикулы (согласно аппроксимации в SasView), T^* – толщина липидного бислоя везикулы (согласно построению в координатах Кратки–Порода).

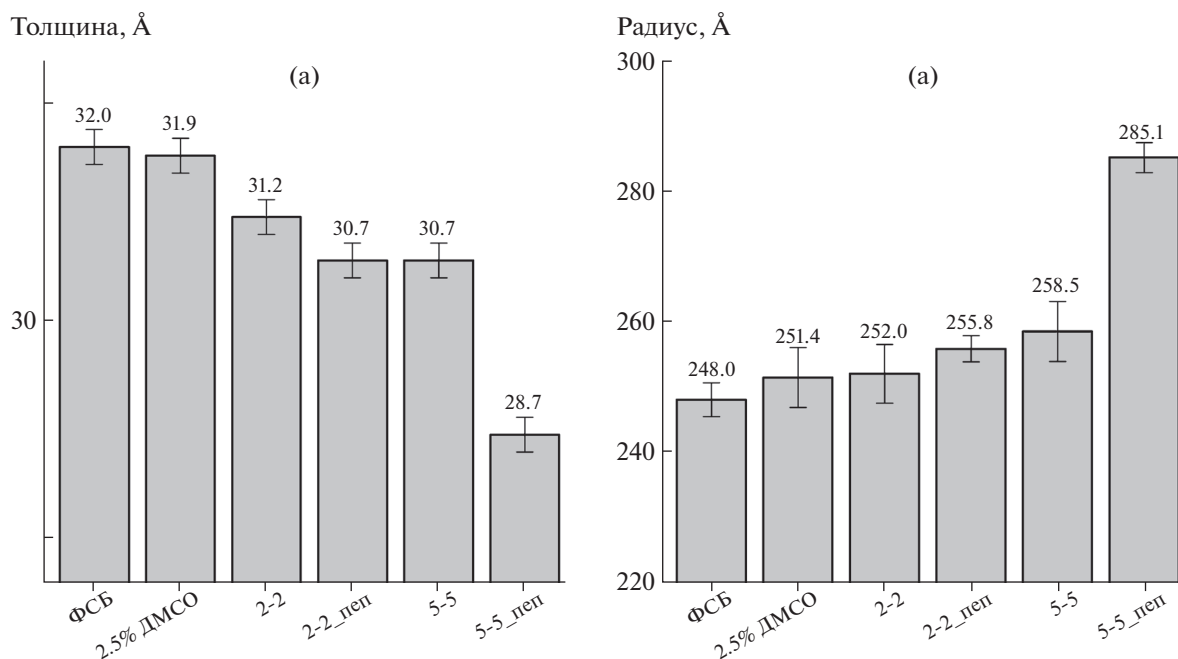


Рис. 4. Параметры липосом, рассчитанные в программе SasView. Расшифровка параметров указана в подписи к табл. 1.

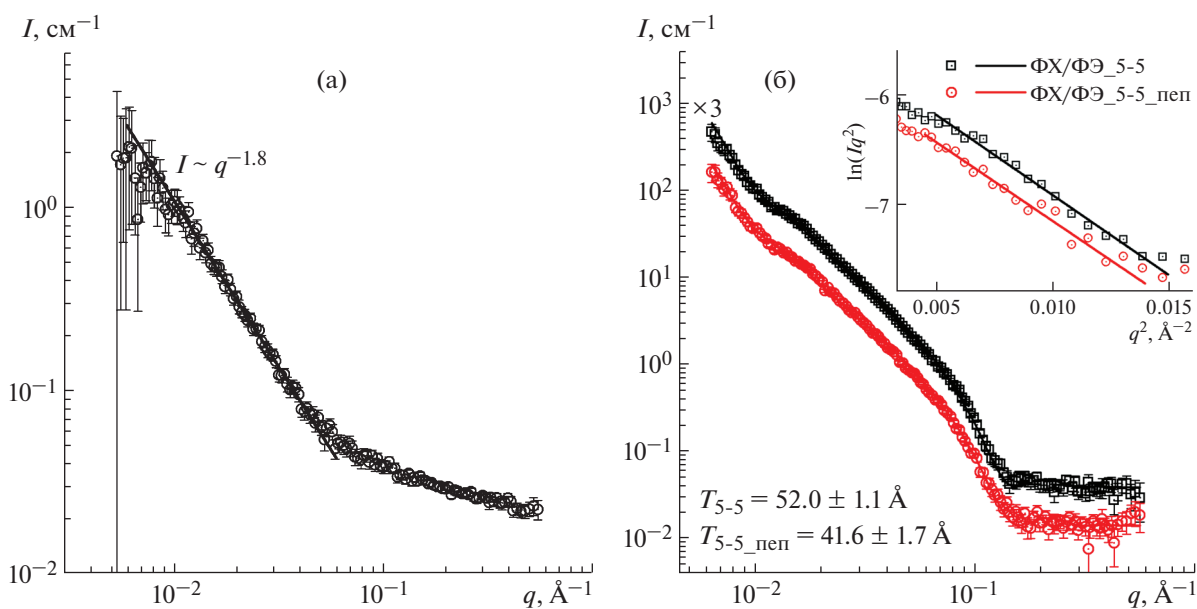


Рис. 5. Спектр МУРН раствора пептида RB1₆₋₁₄ в 5% этанол-d₆/5% ДМСО-d₆/ФСБ (а); спектры МУРН липосом ФХ/ФЭ в присутствии (круги) и в отсутствие (квадраты) пептида RB1₆₋₁₄ (б). Точки – экспериментальные кривые, сплошные линии – аппроксимация в программе SasView. На врезке построение кривых в координатах Кратки–Порода для вычисления толщины бислоя $T, \text{Å}$.

ставил 288.7 ± 4.5 и $282.3 \pm 8.1 \text{ Å}$. Это указывает на различный характер пептид-липидного взаимодействия положительно заряженного пептида с липидными бислоями в зависимости от их состава, в частности от заряда мембранной поверхности и/или фазового состояния липидного бислоя.

Следует предположить, что электростатические взаимодействия играют существенную роль в процессах адсорбции в случае взаимодействия пептида RB1₆₋₁₄ с нейтральными (ФХ/ФЭ) липосомами или встраивания пептида в липидный бислой в случае взаимодействия пептида RB1₆₋₁₄ с

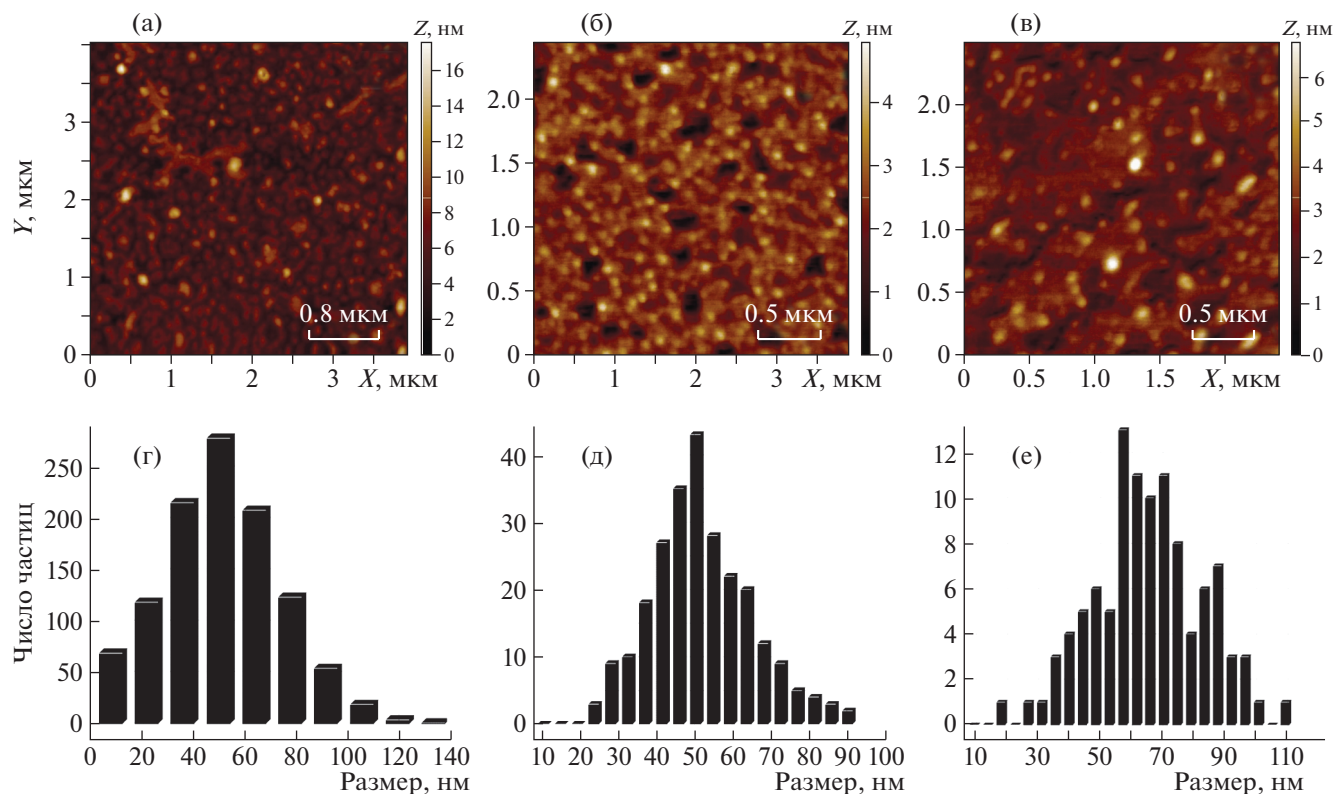


Рис. 6. Топография поверхности и распределение по размерам для ОСВ ФХ/ФГ: а, г – в ФСБ; б, д – в 5% этанол/5% ДМСО/ФСБ; в, е – ОСВ ФХ/ФГ-РВ1₆₋₁₄ в 5% этанол/5% ДМСО/ФСБ.

анионными (ФХ/ФГ) липосомами. Кроме того, при $t = 37^\circ\text{C}$ система ФХ/ФЭ (80/20) находится в гелевой L_β -фазе [28]. При этом углеводородные цепи менее подвижны, чем в случае системы ФХ/ФГ при той же температуре, что может создавать дополнительный “барьер” для проникновения пептида внутрь липосом.

Контроль возможных морфологических изменений при взаимодействии пептида с ОСВ ФХ/ФГ осуществлялся методом АСМ. Профили высот, представленные на рис. 6 для ОСВ ФХ/ФГ в ФСБ (а), в 5% этанол/5% ДМСО/ФСБ (б) и ОСВ ФХ/ФГ-РВ1₆₋₁₄ в 5% этанол/5% ДМСО/ФСБ (в), явно свидетельствуют о сферической форме исследуемых объектов. Кроме того, полученные значения средних размеров наблюдаемых объектов, D_A , (табл. 2) из распределения числа частиц по размерам указывают на увеличение диаметра ОСВ при добавлении пептида, что хорошо согласуется с данными, полученными из аппроксимации кривых МУРН. Диаметры липосом, $D = 2(R + T)$, в ФСБ и 5% этанол/5% ДМСО/ФСБ равны 56.0 ± 0.6 и 57.3 ± 1.0 нм соответственно. Добавление пептида, растворенного в 5% этанол/5% ДМСО/ФСБ, к ОСВ ФХ/ФГ в ФСБ приводит к росту диаметра до 62.8 ± 0.5 нм.

Для выяснения роли электростатического взаимодействия в системе пептид–липид провели измерения ζ -потенциала для ОСВ, сформированных из нейтральных липидов ДМФХ, ДПФХ/ДПФЭ (80/20) и смеси нейтральных (ФХ) и отрицательно заряженных (ФГ) липидов ДМФХ/ДМФГ (70/30) при температуре 37°C , $\text{pH} = 7.4$. При добавлении положительно заряженного пептида к ОСВ, состоящего только из молекул ФХ, значение ζ изменялось незначительно: от $-11.21(0.04)$ мВ для чистых липосом до $-5.38(0.09)$ мВ, что может свидетельствовать о слабом пептид-липидном взаимодействии. В случае смешанной системы ФХ/ФЭ можно конста-

Таблица 2. Размерность и ζ -потенциал (ζ) для ОСВ ФХ/ФГ в ФСБ, ОСВ ФХ/ФГ и ОСВ ФХ/ФГ-РВ1₆₋₁₄ в 5% этанол/5% ДМСО/ФСБ

	ФСБ	5-5	5-5_пеп
D , нм	56.0 ± 0.6	57.3 ± 1.0	62.8 ± 0.5
D_A , нм	57.7 ± 3.1	53.5 ± 5.2	65.9 ± 7.1
ζ , мВ	-33.08 ± 0.27	-30.29 ± 0.34	-24.74 ± 0.18

Примечание. D – диаметр, полученный из данных МУРН при обработке в программе SasView, D_A – средний размер по данным АСМ.

Таблица 3. ζ -потенциал (мВ) для ОСВ ФХ, ОСВ ФХ/ФЭ и ОСВ ФХ/ФГ в присутствии и в отсутствие пептида РВ1₆₋₁₄ в 5% этанол/5% ДМСО/ФСБ

	ФХ	ФХ/ФЭ	ФХ/ФГ
Без пептида	-11.21 ± 0.04	-33.47 ± 0.31	-33.08 ± 0.27
С пептидом	-5.38 ± 0.09	+13.38 ± 0.07	-24.74 ± 0.18

тировать адсорбцию пептида на мембранной поверхности: ζ -потенциал меняет знак с отрицательного на положительный ($\zeta = -33.47(0.31)$ мВ для ФХ/ФЭ, $\zeta = +13.38(0.07)$ мВ для ФХ/ФЭ-РВ1₆₋₁₄). ОСВ, состоящие из ФХ/ФГ, являются достаточно стабильной системой ($\zeta > \pm 30$ мВ), как и в случае ФХ/ФЭ (табл. 3). Поскольку ζ -потенциал изменяется не существенно (табл. 2), то очевидно, что при взаимодействии пептида с мембранной поверхностью лишь небольшая часть пептида адсорбируется на поверхности мембран ФХ/ФГ, а большая часть встраивается в липидный бислой, как предполагали при анализе данных МУРН.

Наблюдаемый характер взаимодействия пептида с модельными липосомами может быть обусловлен сочетанием положительно заряженных аминокислотных остатков с гидрофобными, которые, с одной стороны, способны взаимодействовать с отрицательно заряженными головками фосфолипидов, а с другой – с гидрофобными хвостами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии указывают на то, что FITC-меченый аналог пептида проникает внутрь клеток. Ранее на основании только сходной противовирусной активности [4] было сделано предположение [6], что немеченый пептид РВ1₆₋₁₄ проникает внутрь клеток аналогичным образом. В настоящей работе на модельной системе при помощи малоуглового рассеяния нейтронов показали, что немеченый пептид способен взаимодействовать с мембранами клеток и, вероятно, проходить через липидный бислой. Важным является тот факт, что проникновение пептида РВ1₆₋₁₄ в мембрану определяется исключительно свойствами мембраны и растворителя, поскольку происходит в модельной системе без участия каких-либо клеточных факторов.

Наиболее перспективной для дальнейшего изучения является модельная система липосом ФХ/ФГ (70/30) в буфере 5% этанол-d₆/5% ДМСО-d₆, поскольку наблюдаемые изменения под действием пептида РВ1₆₋₁₄ в этом случае наиболее значительные и приводят, в том числе, к существенному увеличению размера липосом. Для

более комплексной характеристики транспорта пептида через мембрану следует использовать комбинацию методов МУРН, АСМ (для описания крупномасштабных перестроек, как, например, изменения размера липосом) и рефлектометрии (для получения информации о параметрах взаимодействия на более мелких масштабах, например, в каком конкретно участке липидного бислоя располагается пептид, какие надмолекулярные структуры образует и т.д.).

Использованная модельная система может быть также применена в качестве системы доставки лекарственных препаратов с возможностью контроля содержания препарата в носителе.

Работа частично поддержана государственным контрактом № 14.N08.11.0080: ФЦП “Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу” (эксперименты по проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии). Эксперименты по малоугловому рассеянию нейтронов выполнены на спектрометре ЮМО, реактор ИБР-2, ОИЯИ, г. Дубна (№ 2017-10-14-16-55-35, 2018-04-14-23-49-44). Измерения ζ -потенциала и АСМ проведены при финансовой поддержке гранта Полномочного представителя Румынии в ОИЯИ (приказ № 267, п. 17 от 20.05.2020).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fosgerau K., Hoffmann T. // Drug Discov. Today. 2015. V. 20. № 1. P. 122. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2014.10.003>
2. Protein-Protein Interactions: Methods and Applications. Second ed. / Eds. Meyerkord C.L., Fu H. New York: Springer New York, 2015. V. 1278. 635 p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2425-7>
3. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
4. Matusevich O.V., Egorov V.V., Gluzdikov I.A. et al. // Antiviral Res. 2015. V. 113. P. 4. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.10.015>
5. Егоров В.В., Забродская Я.А., Шалджян А.А. и др. Пат. RU 2695336 С1. Российская Федерация: Федеральная служба по интеллектуальной собственности. 2019. № 21. С. 1–18.
6. Zabrodskaya Y.A., Lebedev D.V., Egorova M.A. et al. // Biophys. Chem. 2018. V. 234. P. 16. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2018.01.001>
7. Egorov V.V., Matusevich O.V., Shaldzhyan A.A. et al. // Int. J. Pep. 2013. V. 2013. P. 370832. <https://doi.org/10.1155/2013/370832>
8. Li Z., Agellon L.B., Allen T.M. et al. // Cell Metab. 2006. V. 3. № 5. P. 321. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.03.007>
9. Sun S., Zhao G., Huang Y. et al. // Sci. Rep. 2016. V. 6. № 1. P. 29145. <https://doi.org/10.1038/srep29145>

10. *Kuklin A.I., Islamov A.K., Gordeliy V.I.* // Neutron News. 2005. V. 16. № 3. P. 16.
<https://doi.org/10.1080/10448630500454361>
11. *Kuklin A.I., Soloviov D.V., Rogachev A.V. et al.* // J. Phys. Conf. Ser. 2011. V. 291. № 1. P. 012013.
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/291/1/012013>
12. *Soloviev A.G., Murugova T.N., Islamov A.H., Kuklin A.I.* // J. Phys. Conf. Ser. 2012. V. 351. № 1. P. 012027.
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/351/1/012027>
13. *Ostanevich Y.M.* // Makromol. Chem. Macromol. Symp. 1988. V. 15. № 1. P. 91.
<https://doi.org/10.1002/masy.19880150107>
14. *Knoll W., Haas J., Stuhmann H.B. et al.* // J. Appl. Cryst. 1981. V. 14. № 3. P. 191.
<https://doi.org/10.1107/S0021889881009102>
15. *Nawroth T., Conrad H., Dose K.* // Phys. B. Phys. Condens. Matter. 1989. V. 156–157. P. 477.
[https://doi.org/10.1016/0921-4526\(89\)90708-4](https://doi.org/10.1016/0921-4526(89)90708-4)
16. *Guinier A., Fournet G.* Small-angle scattering of X-rays / Eds. Mayer M.G. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1955. 268 p.
17. SasView – Small Angle Scattering Analysis.
<http://www.sasview.org/>
18. *Feigin L.A., Svergun D.I.* Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering. New York: Springer US, 1987. 335 p.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4757-6624-0>
19. *Ujje M., Takada K., Kiso M. et al.* // J. Gen. Virol. 2019. V. 100. № 10. P. 1345.
<https://doi.org/10.1099/jgv.0.001314>
20. *Benne N., Leboux R.J.T., Glandrup M. et al.* // J. Control. Release. 2020. V. 318. P. 246.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.12.003>
21. *Lee M.-T.* // Adv. Phys. X. 2018. V. 3. № 1. P. 1408428.
<https://doi.org/10.1080/23746149.2017.1408428>
22. *Bonora S., Markarian S.A., Trincherio A., Grigorian K.R.* // Thermochim. Acta. 2005. V. 433. № 1–2. P. 19.
<https://doi.org/10.1016/j.tca.2005.02.011>
23. *Горшкова Ю.Е.* // Поверхность. Рентген., синхротр. и нейтр. исследования. 2018. Т. 7. С. 34.
<https://doi.org/10.7868/S0207352818070053>
24. *Gorshkova Y.E.* // J. Optoelectron. Adv. Mater. 2015. V. 17. P. 1532.
25. *Gordeliy V.I., Cherezov V., Teixeira J.* // Phys. Rev. E. Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys. 2005. V. 72. № 6. P. 061913.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevE.72.061913>
26. *Горшкова Ю.Е., Горделий В.И.* // Кристаллография. 2007. Т. 52. № 3. С. 560.
27. *Qian S., Heller W.T.* // J. Phys. Chem. B. 2011. V. 115. № 32. P. 9831.
<https://doi.org/10.1021/jp204045t>
28. *Kamal M.A., Pal A., Raghunathan V.A., Rao M.* // Phys. Rev. E. State Nonlin Soft Matter. Phys. 2012. V. 85. № 5. Pt. 1. P. 051701.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevE.85.051701>