

УДК 577.152.311/547.8/548.73

**С.С. Декіна, А.М. Овсепян, А.Г. Артеменко,
І.І. Романовська, В.Є. Кузьмін**

Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України,
Люстдорфська дорога 86, Одеса, 65080, тел.: +38 (048) 765 94 31,
e-mail: s.dekina@gmail.com

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ІОНІВ МЕТАЛІВ НА АКТИВНІСТЬ ЛІЗОЦИМУ МЕТОДОМ QSAR АНАЛІЗУ

Досліджено вплив 16 хлоридів металів на гідролітичну активність лізоциму. Показано, що всі катіони пригнічують активність лізоциму, при цьому найбільш істотний вплив мають іони Al^{3+} , La^{3+} , Fe^{2+} , Li^+ , інгібуючи бактеріолітичну активність ферменту на 64,0–85,7% в концентрації 5 ммоль/дм³. Методом QSAR аналізу вперше отримано трьохпараметрову модель, з використанням як дескрипторів електронегативності за Полінгом, ентропії і ентальпії іонів металів у водному розчині, що описує вплив широкого набору хлоридів металів на активність лізоциму.

Ключові слова: лізоцим білка курячого яйця, іони металів, інгібування, QSAR аналіз.

Лізоцим (КФ 3.2.1.17) — гідролітичний фермент, що широко застосовується в терапії різних інфекційно-запальних та гнійно-септичних захворювань, для імунокорекції [6]. Незважаючи на досить високу стабільність, лізоцим частково або повністю втрачає гідролітичну активність в присутності іонів металів. З даних літератури відомо про вплив деяких катіонів (Zn^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , тривалентні іони лантанідів та ін.) на активність лізоциму; дослідження проводили з використанням методів денситометрії, віскозиметрії, спектрометрії, рефрактометрії, мікрокалориметрії, рентгеноструктурного аналізу [8, 12–14]. Оцінити внесок фізико-хімічних параметрів, що описують властивості іонів металів, у втрату активності лізоцимом, ми спробували вперше за допомогою QSAR аналізу (Quantitative Structure Activity Relationship). Подібні дослідження були проведені для карбоксилестерази печінки свині, що дозволило з високим ступенем вірогідності прогнозувати активність ферменту в присутності іонів металів [1]. У літературі стосовно лізоциму метод QSAR успішно використовували для пошуку зв'язку структура-властивість в системі «лізоцим-антитіла», «лізоцим-біофлавоноїди» [9, 15].



Метою роботи було дослідження впливу низки іонів металів з широким набором характеристик на гідролітичну активність лізоциму методом QSAR.

Матеріали і методи дослідження

У роботі використовували комерційний препарат лізоциму яєчного білка («Applichem», Бельгія), ацетоновий порошок *Micrococcus lysodeikticus* (штам 2665) (Мерск, Німеччина), хлориди металів («ТОР», Україна).

Гідролітичну активність лізоциму визначали бактеріолітичним методом в буферному розчині (імідазол-хлористоводнева кислота, рН 6,2, 0,1 моль/дм³), використовуючи як субстрат ацетоновий порошок *Micrococcus lysodeikticus* (штам 2665) [4]. За одиницю активності ферменту приймали таку його кількість, яка знижує оптичну густину суспензії клітин на 0,001 за 1 хв при 55 °С.

Вміст білка в препараті визначали методом Лоурі-Хартрі [11].

Вплив іонів металів визначали за зміною гідролітичної активності лізоциму, попередньо витримуючи фермент від 10 до 120 хв в їх присутності (кінцева концентрація хлоридів металів становила 5 ммоль/дм³).

Для пошуку зв'язку «структура-властивість» використовувався метод множинної лінійної регресії [7]. Як дескриптори, що описують властивості іонів металів, аналізували близько 70 характеристик [2], у тому числі:

- ефективні заряди атомів в основному стані;
- ефективні заряди ядер для різних валентних станів атомів;
- потенціали іонізації елементів;
- енергії дисоціації для солей Cl;
- середні енергії зв'язків у молекулах типу MCl_x;
- електронегативність елементів за шкалою Полінга;
- термодинамічні електронегативності;
- іонізаційні електронегативності елементів;
- довжини зв'язків в галогенідах типу MeCl_x;
- атомні радіуси;
- іонні радіуси;
- рекомендовані електронегативності елементів;
- спорідненість до електрону;
- основні термодинамічні характеристики;
- термодинамічні характеристики іонів і нейтральних молекул у водному розчині;
- енергія кристалічних решіток іонних сполук;
- стандартні електронні потенціали у водних розчинах та ін.

Результати та обговорення

Дослідження впливу 16 хлоридів металів на гідролітичну активність лізоциму показало, що їх додавання до розчину ферменту та витримування

протягом 2 год, в усіх випадках призводить до зниження ферментативної активності.

Найнижча гідролітична активність спостерігається при взаємодії лізоциму з катіонами тривалентних металів La^{3+} (33,0%), Al^{3+} (14,3%) (рис. 1). Інгібування активності ензиму у випадку з залізом Fe^{2+} (37,8%) можливо відбувається через зміну валентості катіону з Fe^{2+} на Fe^{3+} , а Li^+ (активність ензиму 34,8%) (на відміну від Na^+ і K^+) належить до токсичних біологічно активних катіонів, і утворює з лізоцимом міцний комплекс, суттєво змінюючи конформацію білкової молекули [5, 10].

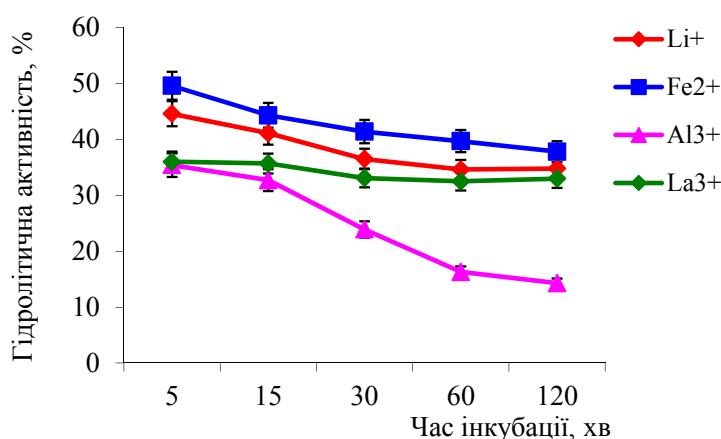


Рис. 1. Залежність гідролітичної активності лізоциму в присутності катіонів La^{3+} , Al^{3+} , Fe^{2+} , Li^+ від часу інкубації у 0,1 М буферному розчині імідазол- HCl (рН 6,2, 55 °С)

Fig. 1. Dependence of lysozyme hydrolytic activity in the presence of cations La^{3+} , Al^{3+} , Fe^{2+} , Li^+ (рН 6,2; 0,1 М imidazole- HCl , 55 °С)

Як показано в роботі [14], іони металів знижують ефективність перетворення субстрату в активному центрі лізоциму внаслідок можливого конкурентного інгібування, а також можливого зв'язування поза активним центром з вільними функціональними групами, що впливають на каталітичні властивості ензиму [3].

Для кількісної оцінки впливу іонів металів на каталітичну активність лізоциму був застосований метод покрокової лінійної регресії [7]. Вся вибірка була розділена на два набори: навчальний (13 іонів) і тестовий (3 іони). До тестового набору були віднесені випадкові іони металів з різних груп активності (Zn^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+}). У результаті була отримана адекватна трьохпараметрова QSPR модель, що описує гідролітичну активність лізоциму (A, %) в присутності хлоридів металів:

$$A = -173 + 0,52 S^\circ + 151 \text{EN} - 0,22 \Delta fH^\circ,$$

де EN — електронегативність за Полінгом,

S° , ΔfH° — ентропія і ентальпія іонів металів у водному розчині.



Статистичні характеристики моделі: коефіцієнт кореляції $R=0,89$; середньоквадратична помилка прогнозування $SE=9,2$; критерій Фішера $F=12,56$, що перевищує критичне значення ($F_{кр}=7,49$) для рівня значущості $0,99$.

Моделі також є стійкою (коефіцієнт кореляції в умовах ковзного контролю $Q^2=0,66$), має хорошу здатність прогнозування ($R^2_{test}=0,96$).

Дослідні і прогнозовані значення збереження гідролітичної активності лізоциму в присутності хлоридів металів і вихідні значення структурних параметрів, задіяних в отриманій регресійній моделі, представлені в таблиці.

Таблиця

Дослідні і прогнозовані значення гідролітичної активності лізоциму і вихідні значення структурних параметрів, задіяних в отриманій регресійній моделі

Table

Observed and predicated values of lysozyme hydrolytic activity and output data of structural parameters used in the regressive model

Катіон	Активність лізоциму, А, %, $M \pm m$	Ентропія іонів в водному розчині, S° , Дж/моль · К	Електро-негативність за Полінгом, EN	Ентальпія іонів металів в водному розчині, ΔfH° , кДж/моль	Прогнозована активність, А, %
Li ⁺	34,8±2,4	13,4	1,0	278,5	42,2
Na ⁺	67,4±3,4	59,0	0,9	-240,1	50,2
K ⁺	50,0±2,5	102,5	0,8	-252,4	59,0
Cs ⁺	73,6±3,7	133,1	0,8	-258,3	71,8
Mn ²⁺	70,9±3,5	-73,6	1,6	-220,8	70,1
Fe ²⁺	37,8±1,9	-137,7	1,8	-89,1	50,1
Co ²⁺	72,9±3,7	-113,0	1,9	-58,2	63,8
Cu ²⁺	75,2±3,8	-98,7	1,9	-64,4	75,2
Mg ²⁺	68,4±3,4	-138,1	1,3	-466,9	53,8
Ca ²⁺	64,0±3,2	-53,1	1,0	-542,8	68,0
Zn ²⁺	47,1±2,4	-112,1	1,7	-153,9	50,5
Sr ²⁺	69,4±3,5	-32,6	1,0	-545,8	71,9
Cd ²⁺	58,3±2,9	-73,2	1,7	-75,9	59,9
Ba ²⁺	77,7±3,9	9,6	0,9	-537,6	83,1
Al ³⁺	14,3±0,7	-321,7	1,6	-531,0	16,9
La ³⁺	33,0±1,6	-217,6	1,1	-707,1	32,8

Співвідношення дослідних і прогнозованих значень активності лізоциму для навчальної та тестової виборки, представлено на рис. 2.

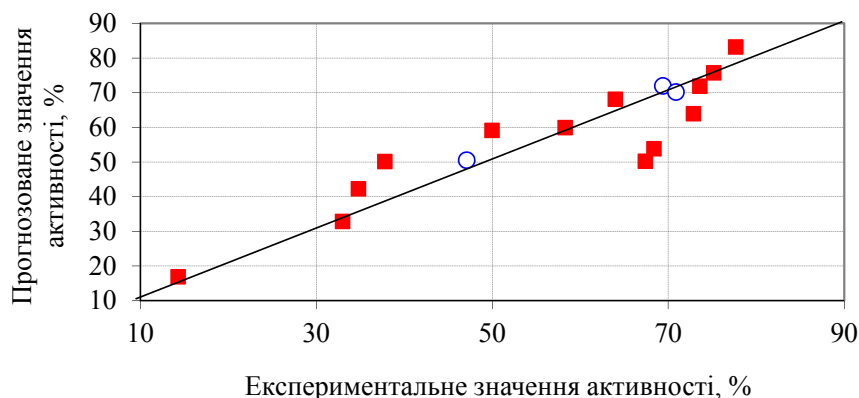


Рис. 2. Дослідні (■) і прогнозовані (○) значення гідролітичної активності лізоциму
 Fig. 2. Observed (■) and predicted (○) values of lysozyme hydrolytic activity

На діаграмі (рис. 3) наведені відсоткові співвідношення абсолютних величин нормованих внесків структурних параметрів у досліджувану активність — всі три параметри однаковою мірою впливають на зміну гідролітичної активності.

Виходячи з рівняння, гідролітична активність лізоциму збільшується у присутності іонів металів з високою електронегативністю і їх ентропією у водному розчині та низькою ентальпією у такому.

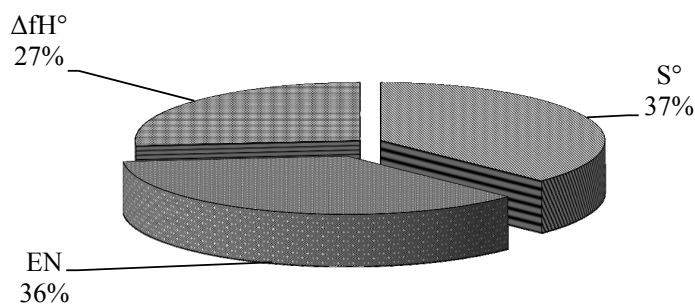


Рис. 3. Співвідношення абсолютних величин нормованих внесків структурних дескрипторів в досліджувану властивість

Fig. 3. Percentage of the absolute values of the normalized contributions of the structural parameters in the property under consideration

Встановлено пригнічувальний вплив хлоридів металів на каталітичну активність лізоциму. З використанням ентропії і ентальпії іонів металів у водному розчині, а також іонізаційної електронегативності, як дескрипторів, вперше отримана QSAR модель, що адекватно описує вплив іонів металів на активність лізоциму.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Андронати С.А., Шестеренко Е.А., Артеменко А. Г. и др. Исследование влияния ионов металлов на активность карбоксилэстеразы печени свиньи методом QSAR // Доповіді НАН України. — 2012. — № 9. — С. 154–158
2. Волков А.И., Жарский И.М. Большой химический справочник. — Минск: Современная школа, 2005. — 608 с.
3. Гудзенко Е.В., Борзова Н.В., Варбанец Л.Д. Влияние ионов металлов и специфических химических реагентов на активность α -L-рамнозидазы *Eurepencillium erubescens* // Укр. біохім. журн. — 2012. — Т. 84, № 2. — С. 30–40.
4. Декина С.С., Романовская И.И., Громовой Т.Ю. Влияние полимеров на процессы ассоциации молекул лизоцима // Biopolymers and cells. — 2011. — V. 27, № 6. — P. 442–445.
5. Коршун М.Н., Краснокутская Л.М. Соли как объект гигиенического нормирования в воздухе рабочей зоны // Український журнал з проблем медицини праці. — 2011. — Т. 25, № 1. — С. 35–41.
6. Машковский М.Д. Лекарственные средства. В двух томах. Т. 2. — Изд. 13-е, новое. — Харьков: Торсинг, 1997. — 432 с.
7. Фёрстер Э., Рёньц Б. Методы корреляционного и регрессионного анализа. — М.: Финансы и статистика, 1983. — 304 с.
8. Abad C., Trueba M., Campos A. Dilatometric, refractometric and viscometric study of lysozyme-cation interaction // Biophysical chemistry. — 1987. — V. 14. — P. 293–300.
9. Freyhult E.K., Andersson K., Gustafsson M.G. Structural modelling extends QSAR analysis of antibody-lysozyme interactions to 3D-QSAR // Biophysical journal. — 2003. — V. 84. — P. 2264–2272.
10. Hamaguchi K., Kurono A., Goto S. Structure of muramidase (lysozyme) II. Effect of lithium chloride and bromide on the stability of muramidase // The journal of biochemistry. — 1963. — 54, № 3. — P. 259–266.
11. Hartree E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response // Anal. Biochem. — 1972. — V. 48, № 2. — P. 422–427.
12. Hughes A.J., Hussain R., Cosentino C. et al. A zinc complex of heparan sulfate destabilises lysozyme and alters its conformation // Biochemical and biophysical research communications. — 2012. — V. 425. — P. 794–799.
13. Ostroy F., Gams R.A., Glickson J.D. et al. Inhibition of lysozyme by polyvalent metal ions // Biochimica et biophysica acta. — 1978. — V. 527. — P. 56–62.
14. Olmo R., Huerta P., Blanco D. et al. Viscometric, densimetric, and spectrophotometric study of lysozyme-Zn (II) and lysozyme-Hg (II)



interactions // Journal of inorganic biochemistry. — 1992. — V. 47. — P. 89–97.

15. Yang R., Yu L., Zeng H., Liang R., Chen X., Qu L. The interaction of flavonoid-lysozyme and the relationship between molecular structure of flavonoids and their binding activity to lysozyme // Journal of fluorescence. — 2012. — V. 22 (6). — P. 1449–1459.

Стаття надійшла до редакції 05.12.2012 р.

УДК 577.152.311/547.8/548.73

С.С. Декина, И.И. Романовская, А.М. Овсепян, А.Г. Артеменко,
В.Е. Кузьмин

Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины,
Люстдорфская дорога 86, Одесса, 65080, тел.: +38 (048) 765 94 31,
e-mail: s.dekina@gmail.com

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ НА АКТИВНОСТЬ ЛИЗОЦИМА МЕТОДОМ QSAR АНАЛИЗА

Реферат

Исследовано влияние 16 хлоридов металлов на гидролитическую активность лизоцима. Показано, что все катионы угнетают активность лизоцима, при этом наиболее существенное влияние оказывают ионы Al^{3+} , La^{3+} , Fe^{2+} , Li^{+} , ингибирующие активность фермента на 64–85,7% в концентрации 5 ммоль/дм³. Методом QSAR анализа впервые получена трехпараметровая модель, с использованием в качестве дескрипторов электроотрицательности по Полингу, энтропии и энтальпии ионов металлов в водном растворе, описывающая влияние широкого набора хлоридов металлов на активность лизоцима.

Ключевые слова: лизоцим белка куриного яйца, ионы металлов, ингибиторы, QSAR анализ.



**S.S. Dekina, I.I. Romanovska, A.M. Ovsepyan, A.G. Artemenko,
V.E. Kuzmin**

A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute, NAS of Ukraine,
86, Lustdorfskaya St., Odesa, Ukraine, 65080, tel.: +38 (048) 765 94 31,
e-mail: s.dekina@gmail.com

INVESTIGATION OF METAL IONS INFLUENCE ON LYSOZYME ACTIVITY BY THE QSAR ANALYSIS METHOD

Summary

The influence of 16 metal chlorides on lysozyme hydrolytic activity was studied. All cations, as it was shown, depresses lysozyme activity, besides the most significant influence exerts Al^{3+} , La^{3+} , Fe^{2+} and Li^{+} ions, inhibiting the enzyme activity on 64–85.7% in concentration of 5 mmol/dm³. For the first time, by the QSAR analysis method, the three parametric model was obtained, using, as descriptors, the Pauling's electronegativity, entropy and enthalpy of metal ions in aqueous solution, describing the influence of a wide range of metal chlorides on lysozyme activity.

Key words: hen eggs white lysozyme, metal ions, inhibitors, QSAR analysis.

