

УДК 577.15.024.025.535.243  
© Коллектив авторов

## ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ЦИНКА (II) И МАРГАНЦА (II) НА КАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ИНДУЦИРУЕМОЙ АСПАРАГИНОВОЙ ПРОТЕИНАЗЫ *CANDIDA ALBICANS*

М.П. Кутырева<sup>1\*</sup>, Р.Р. Галимзанова<sup>1</sup>, Н.А. Улахович<sup>1</sup>, Н.И. Глушко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Казанский государственный университет, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18,  
тел.: (843)232-03-15; эл. почта: MariannaKutyreva@ksu.ru

<sup>2</sup>Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и  
микробиологии, 420015, Казань, ул. Большая Красная, 67, тел.: (843)236-56-59

Изучено взаимодействие индуцируемой аспарагиновой протеиназы *Candida albicans* (SAP) с  $ZnCl_2$  и  $MnCl_2$ . По данным электронной спектроскопии рассчитаны логарифмы значений констант устойчивости ( $lg\beta$ ), которые составили  $4,73 \pm 0,20$  и  $lg\beta = 7,02 \pm 0,20$  для комплексов фермента с ионами цинка и марганца соответственно. Рассчитаны состав и максимальные доли накопления комплексных форм в растворе. Определены оптимальные условия гидролиза субстрата SAP-MnII SAP-ZnII – человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) – в присутствии SAP *C. albicans*: концентрация субстрата 1 мг/мл, концентрация фермента 2,33 мкМ, pH среды 4,5, время инкубации – 25 мин. Оценена активность SAP *C. albicans* в присутствии солей  $ZnCl_2$  и  $MnCl_2$  в различных концентрациях в оптимальных условиях ферментативного гидролиза. Впервые обнаружено активирующее действие 0,5 мкМ  $ZnCl_2$  на каталитическую активность SAP *C. albicans*. Рассчитаны максимальные скорости ферментативной реакции ( $V_m$ ), кажущиеся константы Михаэлиса ( $K_m$ ) и константы эффектов в присутствии и отсутствии в качестве эффектора  $ZnCl_2$ . Проведена оценка альбуминазной активности патогенных штаммов *Candida albicans* различной локализации в отсутствие и в присутствии  $ZnCl_2$  в качестве эффектора.

**Ключевые слова:** протеиназа *Candida albicans*, ферментативный катализ, эффекторы, кинетические параметры.

**ВВЕДЕНИЕ.** В настоящее время активно изучаются структуры и свойства протеолитических ферментов и их связь с жизнедеятельностью организмов различной природы.

Патогенный для человека вид дрожжей – *Candida albicans* (*C. albicans*) – поражает наружные покровы и внутренние органы, вызывая глубокие микозы – кандидозы, болезни слизистых и сепсис. Благоприятными условиями для проявления болезни является общее истощение организма или дисбактериозы, возникающие в результате неправильного применения антибиотических препаратов. Именно *C. albicans*, являются возбудителями 70-80% системных микозов и 12-15% микозов кожных покровов [1]. Это связано как с суперантигенными способностями данного гриба, так и с количеством и многообразием функций вырабатываемых им секреторных аспарагиновых протеиназ (SAP *C. albicans*). В настоящее время выделены и охарактеризованы с точки зрения клинических параметров 10 видов SAP *C. albicans* [2]. Все они подразделены на три типа изоферментов. Основное внимание в настоящее время уделяется двум типам SAP *C. albicans*: индуцируемому (SAP<sub>1-3</sub>) и конститутивным (SAP<sub>4-6</sub>), выделяемым грибом *C. albicans in vivo*. Наиболее исследованной с точки зрения условий выделения, ферментативных характеристик, факторов

\*Адресат для переписки

патогенности являются индуцируемые SAP *C. albicans* (SAP<sub>1-3</sub>), которые и играют ведущую роль в возникновении циркулирующего кандидоза [2-4]. К настоящему времени подавляющее большинство SAP *C. albicans* идентифицируются иммунологами как биосоединения, обладающие суперантигенными способностями, в ответ на введение которых в организме практически не образуются антитела. Биологические и иммунологические особенности, а так же общность небольшого количества известных структуру позволяет ученым предположить родственность индуцируемых SAP *C. albicans* протеиназам ВИЧ [5, 6]. Вся система SAP *C. albicans* относится к классу аспарагиновых протеиназ, активный центр которых образован двумя каталитически активными остатками аспарагиновой кислоты [3, 7]. Однако вся система SAP *C. albicans* в современных источниках представлена только клиническими и биологическими показателями.

SAP *C. albicans* определяют скорость последовательных реакций в цепи метаболических превращений, и представляют поэтому особенный интерес как мишени для физиологически активных веществ и лекарственных агентов.

В качестве модуляторов ферментативной активности могут выступать как природные биологические органические вещества, так и неорганические вещества и ионы. Описание влияния эффекторов на ферментативную активность протеиназы ограничено только рассмотрением действия традиционных соединений - ингибиторов протеолитической активности: ацетилпепстатина, пепстатина А и синтетических аналогов IC50 и A70 450 амин 2-[3-бензил-4-*n*-(4-метилпиперазин-1-ил-карбонил)2-кетопиперазин-1-ил]-гексановой кислоты [8]. В работах [9, 10] упоминается об ингибирующем действии цистеина и мочевины и активирующем действии ЭДТА, метилового эфира, диазоацетила или классических ингибиторов протеиназ ВИЧ на каталитическую активность SAP *C. albicans*.

Круг металлов, рассматриваемых в качестве эффекторов ферментов, достаточно широк. В основном изучают влияние двухзарядных катионов металлов, таких как Hg (II), Cu(II), Co(II), Cd(II), Pb(II), Ni(II) [11]. Регуляция ферментативной активности системы SAP *C. albicans* за счет образования координационных соединений с катионами биофильных металлов Mn(II) и Zn(II) с учетом состава и влияния среды для индуцируемой SAP *C. albicans* рассматривается впервые.

В связи с этим, целью настоящей работы является оценка влияния хлоридов цинка (II) и марганца (II) на каталитическую активность индуцируемой SAP *C. albicans*.

**МЕТОДИКА.** В работе использовали SAP *C. albicans*, выделенную из культуральной жидкости, полученной при выращивании патогенных грибковых микроорганизмов *C. albicans*, с последующим центрифугированием биомассы и переосаждением белков надосадочной жидкости этанолом по оригинальной методике, разработанной в лаборатории по разработке грибковых аллергенов Казанского НИИ эпидемиологии и микробиологии.

Исходный антиген *C. albicans* получен центрифугированием биомассы гриба *C. albicans*, выращенного в течение 48 часов при 30°C. Молекулярную массу SAP *C. albicans* определяли методом электрофореза. Гель-электрофорез в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия (Ds-Na) проводили на установке АВГЭ-1 р/к "Хийу калур" (Эстония) в 4,5 и 9% полиакриламидном геле при pH 8,3. Нагрузка белка – метчика на одну дорожку составляла 20 мкг, нагрузка SAP – 30–50 мкг. Электрофорез проводили при 20°C в течение 90 мин при силе тока 45 мА. Гели окрашивали в течение 30 мин в растворе кумасси бриллиантовый голубой G-250 и отмывали в течение суток в растворе 5% уксусной кислоты. Молекулярная масса (М.м.) выделяемого фермента составила 53,68 кДа.

Концентрацию лиофилизированной формы фермента ( $7,26 \times 10^{-6}$  моль/л) определяли исходя из его подобности к антигену *C. albicans* методом циклической вольтамперометрии с помощью иммуноферментного сенсора на основе иммобилизованной холинэстеразы и антител к антигену *C. albicans* [12].

Растворы  $ZnCl_2$  и  $MnCl_2$  с концентрацией  $1 \times 10^{-9}$ – $1 \times 10^{-1}$  моль/л, готовили из соответствующих хлоридов марки “ч.д.а.”, методом последовательного разбавления.

Использовали сывороточный альбумин человека (САЧ) (95%, М.м. = 65кДа), приготовленный из препарата производства “Reanal” (Венгрия). Растворы САЧ получали растворением точной навески в бидистиллированной воде. Исходная концентрация САЧ составила  $1,54 \times 10^{-4}$  моль/л.

В работе использовали цитратные (рН диапазон 1,08–4,8) и фосфатные (рН диапазон 5,4–8,0) буферные растворы, приготовленные по стандартным методикам из реактивов марки ч.д.а. [13].

Электронные спектры поглощения снимали на спектрофотометре Hitachi U-2000 в области длин волн 190–600 нм. Измерения проводили в кварцевых кюветах толщиной 1 и 5 см с точностью измерения оптической плотности (A)  $\pm 1\%$ . Молярные коэффициенты экстинкции растворов ( $\epsilon_\lambda$ ) при нескольких длинах волн ( $\lambda$ ) рассчитывали по соотношению

$\epsilon_\lambda = (A - A_0)/(c_L l)$ , где A и  $A_0$  – оптические плотности растворителя в присутствии и отсутствии реагентов соответственно,  $c_L$  – концентрация изучаемого реагента.

рН измеряли при помощи прибора рН 150 М с точностью 0,01 логарифмической единицы. Активность фермента определяли в стандартных условиях по увеличению скорости каталитической реакции по сравнению с некаталитической. Скорость реакции указывали как изменение концентрации субстрата или продукта за единицу времени (1 час) [14].

Расчет констант устойчивости и состава комплексных форм в растворе (метод молярных отношений). Сущность метода заключается в установлении зависимости A (или  $\Delta A$ ) от концентрации одного из компонентов при постоянной концентрации второго компонента и наоборот. Зависимость A (или  $\Delta A$ ) от  $C_R/C_M$  при постоянной концентрации  $C_M$  (кривая насыщения) изображена на рисунке 1. Точка излома на кривой отвечает отношению стехиометрических коэффициентов, которое равно отношению концентраций реагирующих компонентов в точке  $x_{т.э.}$  – абсциссе точки эквивалентности [15].

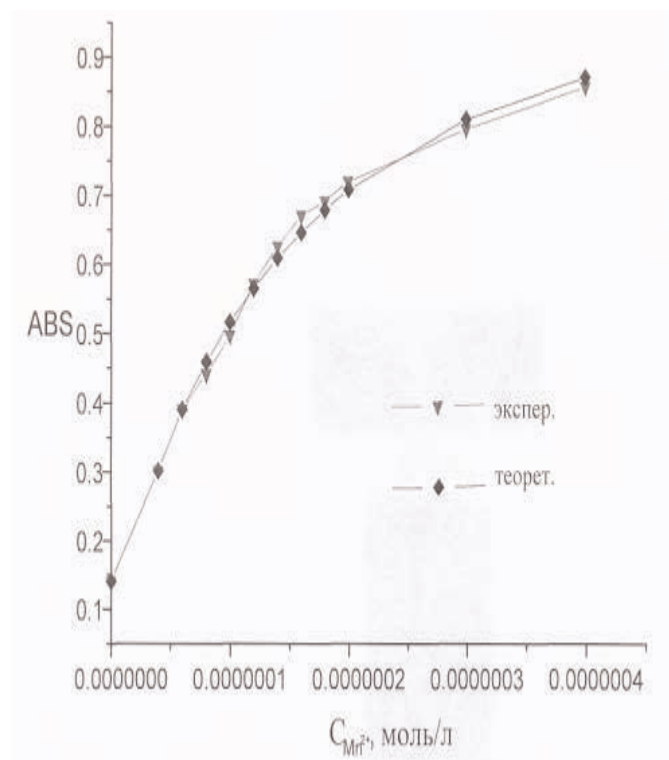


Рисунок 1.

Кривые насыщения  $[Mn(II)][SAP C. albicans.]$  в цитратном буферном растворе рН=4,5;  $[SAP]=9,32 \times 10^{-8}$  моль/л;  $\lambda=238$  нм;  $\epsilon_{SAP}=1,5 \times 10^6$ ;  $\epsilon_{SAP-Mn(II)}=1,160 \times 10^7$ .

Молярные коэффициенты светопоглощения ( $\epsilon_K$ ) и константы устойчивости комплексов рассчитывали по данным кривой насыщения, используя следующие уравнения:

$$\epsilon_K = \frac{n \cdot A}{l \cdot C_K},$$

где  $n$  – стехиометрический коэффициент,  $l$  – длина оптического пути кюветы.

$$C_K = \frac{A}{l \cdot \epsilon_K},$$

где  $C_K$  – концентрация комплекса металла в растворе.

$$\beta_n = \frac{[M_n]}{[M^{2+}][L]^n} = \frac{C_K}{C_M - C_K[C_L - nC_K]^n},$$

Для определения состава комплексных форм строили графики зависимости  $A$  от соотношения концентраций или объемов компонентов изомолярной серии и определяли положение максимума поглощения на изомолярной кривой.

$$A = f \frac{C_R}{C_M} \quad ; \quad A = f \frac{V_R}{V_M} \quad \text{или} \quad A = f \frac{C_R}{C_M + C_R}$$

Максимальным светопоглощением обладает такой раствор, в котором содержание образующегося комплексного соединения является наибольшим. Поэтому объемное соотношение компонентов изомолярной серии, отвечающее максимуму поглощения, соответствует стехиометрическому соотношению реагирующих веществ.

Использование для расчета констант устойчивости, состава и максимальных долей накопления комплексных форм метода математического моделирования (программа SPESSP) основывается на формировании модели (матрицы) существования в растворе всех теоретически возможных комплексных форм (в данной системе при данных условиях). Максимальная корреляция экспериментальных данных с теоретически рассчитанными ( $R < 3\%$ ) позволяет определить параметры реально существующих в растворе комплексов [16].

**Определение альбуминазной активности.** В мерную колбу на 3 мл вводили 0,9 мл раствора САЧ с концентрацией 0,01 г/мл ( $C_{\text{САЧ}}$  в рабочем растворе – 0,003 г/мл); от 0,3 до 7,9 мкл растворов SAP *C. albicans* в разведении 1:10. Рабочая концентрация SAP *C. albicans* составляла  $1,91 \times 10^{-9}$  моль/л. Раствор доводили до метки, перемешивали и переносили в спектрофотометрическую кювету. После инкубирования в течение от 5 до 120 минут при  $t = 25^\circ\text{C}$  регистрировали электронный спектр поглощения полученного раствора в области длин волн 190–600 нм. Измеряли интенсивность полосы поглощения при длине волны  $\lambda = 278$  нм.

Концентрацию альбумина, оставшуюся после взаимодействия с SAP *C. albicans* в растворе, определяли по градуировочному графику зависимости величины поглощения от концентрации альбумина описываемого соответствующими уравнениями.

Альбуминазная активность =  $\Delta C_{\text{САЧ}}/t$ , где  $\Delta C_{\text{САЧ}} = C_{\text{исх}}(\text{САЧ}) - C_{\text{ост}}(\text{САЧ})$  (мг/мл),  $t$  - время (час).

Для биохимических исследований использовали одноразовые чашки Петри  $d=100$  мм, соли  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4$ ,  $KCl$ ,  $FeSO_4$ ,  $ZnCl_2$  (ч.д.а.), агар-агар микробиологический, автоклав марки ВК-75, овальбумин (яичный альбумин). Проведена оценка альбуминазной активности патогенных штаммов *Candida albicans* различной локализации. Для работы готовили солевую питательную среду, следующего состава (г): 1л  $H_2O$ , 1  $K_2HPO_4$ , 0,5  $MgSO_4$ , 0,5  $KCl$ , 0,01  $FeSO_4$ . Солевую смесь разливали во флаконы, добавляли по 1 г агар-агара, а несколько флаконов оставили без агар-агара (для белка). Во флаконы добавляли соль  $ZnCl_2$  с концентрацией  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $5 \times 10^{-7}$  моль/л, и несколько контрольных флаконов оставили без соли. Затем ставили в автоклав (при  $t=120^\circ\text{C}$ ) на 1,5-2 часа. Куриное яйцо промывали водой, протирали этанолом, обжигали на спиртовой горелке. Затем отделяли белок от желтка. Белок добавляли во флаконы с солевой смесью без агар-агара и взбивали. Полученную смесь по 10 мл разливали в 18 флаконов (14 с солями эффекторов и 4 контрольные) нагревали до легкой денатурации белка и взбалтывали до получения однородной массы белого цвета. Полученную массу с pH 5,5 разливали по чашкам Петри, помещали в термокомнату при температуре  $29^\circ\text{C}$  для застывания массы.

Каждое воздействие исследовали не менее чем в трех отдельных опытах. При построении графиков использовали усредненные величины, определенные из трёх-пяти измерений.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Особенности координации ионов металлов по отношению к биологическим макромолекулам представляют несомненный интерес с точки зрения изучения активного центра фермента и влияния комплексообразования на его конформацию. В настоящее время соединения  $Zn(II)$  признаны в качестве одного из основных компонентов антимикотических препаратов [17]. Однако механизм действия данных препаратов описан только с позиций медицинской и биологической диагностики. Химические аспекты координационных взаимодействий ионов  $Zn(II)$  и  $Mn(II)$  с SAP *C. albicans* в литературе практически отсутствуют. Поэтому в нашей работе предложено исследование координационных систем с участием SAP *C. albicans* и соединений цинка и марганца.

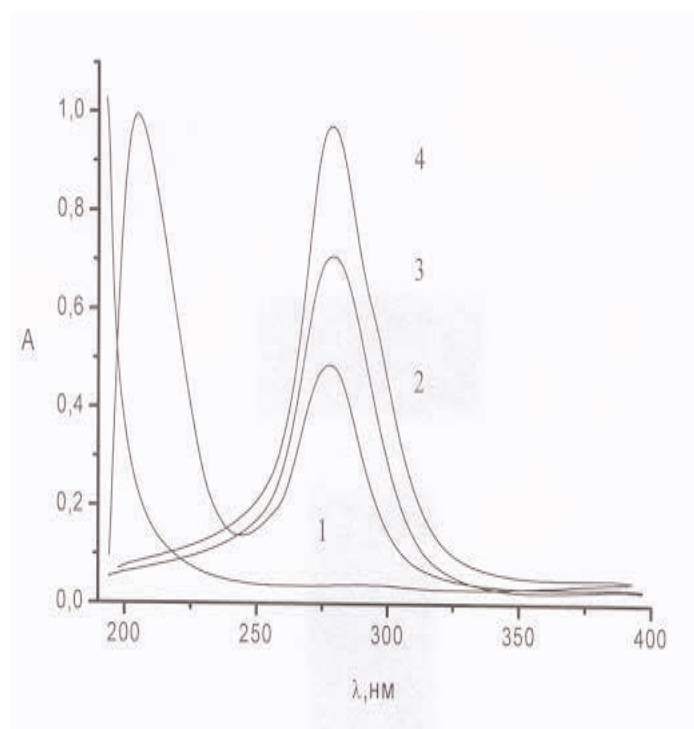
Для оценки взаимодействия SAP *C. albicans* с ионами  $Zn(II)$  и  $Mn(II)$  использовали метод сдвига равновесий с обработкой данных спектрофотометрических исследований методом математического моделирования.

На спектрах растворов SAP *C. albicans*, наблюдаются полосы поглощения при 210 и 278 нм (рис. 2 А, Б). Введение в раствор, содержащий SAP *C. albicans*, солей  $Zn(II)$  и  $Mn(II)$  приводит к исчезновению полосы поглощения при 210 нм и увеличению оптической плотности при 278 нм (рис. 2 А). Введение в раствор SAP *C. albicans* солей  $Mn(II)$  вызывает смещение одной из полос поглощения в длинноволновую область (рис. 2 Б). Величина оптической плотности в максимумах зависит от концентрации вводимых в раствор хлоридов  $Zn(II)$  и  $Mn(II)$ . Полученные данные указывают на образование комплексов [SAP *C. albicans* -  $Zn(II)$ ] и [SAP *C. albicans* -  $Mn(II)$ ] в растворе.

Значения логарифмов констант устойчивости составили  $\lg \beta = 4,73 \pm 0,20$  для комплекса [SAP *C. albicans* -  $Zn(II)$ ] и  $\lg \beta = 7,02 \pm 0,20$  для комплекса [SAP *C. albicans* -  $Mn(II)$ ].

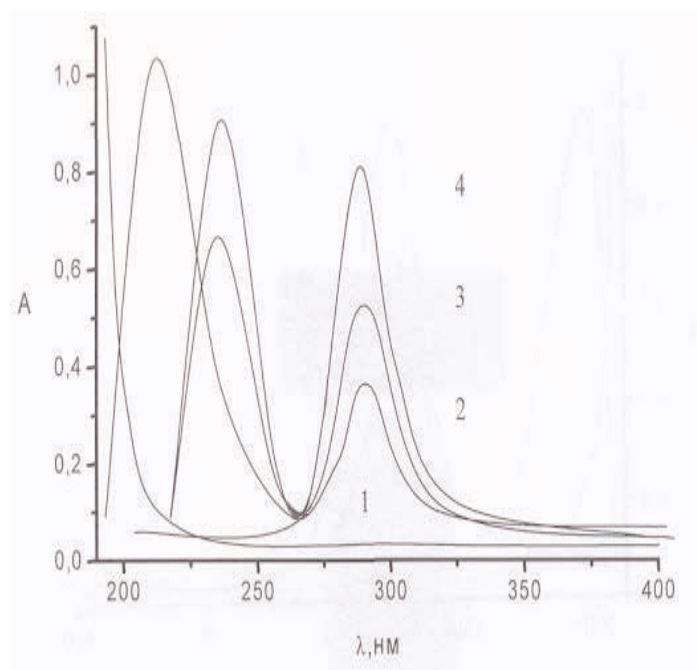
Согласно проведенным расчетам, при pH=4,5 образуются комплексы [SAP *C. albicans* -  $Zn(II)$ ] и [SAP *C. albicans* -  $Mn(II)$ ] состава - 1:1. Максимальная доля накопления комплексов [SAP *C. albicans* -  $Zn(II)$ ] 96,39, [SAP *C. albicans* -  $Mn(II)$ ] 39,4.





**Рисунок 2 А.**

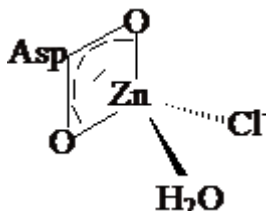
Электронные спектры поглощения растворов SAP *C. albicans*: 1 –  $[\text{ZnCl}_2] = 1 \times 10^{-3}$  моль/л, 2 –  $[\text{SAP}] = 2,33 \times 10^{-6}$  моль/л, 3 –  $[\text{SAP}] = 2,33 \times 10^{-6}$  моль/л,  $[\text{ZnCl}_2] = 6 \times 10^{-4}$  моль/л, 4 –  $[\text{SAP}] = 2,33 \times 10^{-6}$  моль/л,  $[\text{ZnCl}_2] = 1 \times 10^{-3}$  моль/л в цитратном буферном растворе, pH=4,5.



**Рисунок 2 Б.**

Электронные спектры поглощения растворов SAP *C. albicans*: 1 –  $[\text{MnCl}_2] = 1 \times 10^{-3}$  моль/л, 2 –  $[\text{SAP}] = 2,33 \times 10^{-6}$  моль/л, 3 –  $[\text{SAP}] = 2,33 \times 10^{-6}$  моль/л,  $[\text{MnCl}_2] = 1 \times 10^{-7}$  моль/л, 4 –  $[\text{SAP}] = 2,33 \times 10^{-6}$  моль/л,  $[\text{MnCl}_2] = 3 \times 10^{-7}$  моль/л в цитратном буферном растворе, pH = 4,5.

Исследуемая нами SAP *C. albicans* является индуцируемой и отвечает за возникновение циркулирующего кандидоза [18, 19]. SAP *C. albicans* в основном состоит из двух доменов, в центре каждого из которых существуют две последовательности Asp-Thr-Gly (DTG) / Asp-Ser-Gly (DSG), которые формируют активный центр фермента. Два каталитических остатка аспарагиновой кислоты Asp 32 и Asp 218, находящиеся на расстоянии водородной связи друг от друга, действуют совместно по отношению к входящим молекулам субстрата, разрывая пептидную связь.



При взаимодействии с SAP *C. albicans* Zn(II) координируется с депротонированным при pH 4,5 остатком аспарагиновой кислоты Asp 57, отвечающим за связывание ионов металлов с ферментом, с образованием комплекса 1:1. Координированный ион Zn(II) имеет тетраэдрическое окружение. Нельзя также исключать возможность координации иона Zn (II) с гидроксильной группой тирозина и аминогруппой, находящейся в аллостерическом центре фермента. Предположение о возможности координации металла с аминогруппой связано со сдвигом полосы поглощения при 210 нм в коротковолновую область, что говорит о возможности использования при координации аминогрупп, находящейся в аллостерическом центре фермента [20].

Для оценки каталитической активности SAP *C. albicans* в качестве субстрата использовали сывороточный альбумин человека (САЧ). Введение в раствор САЧ протеиназы *Candida* приводит к протеолизу субстрата, преимущественно по гидрофобным аминокислотам (фенилаланину и тирозину), а следовательно, уменьшению общей концентрации субстрата в растворе. Величина каталитической активности фермента оценивается по изменению величины оптической плотности при  $\lambda=278$  нм, соответствующей поглощению САЧ пропорциональной уменьшению концентрации субстрата в результате ферментативного гидролиза. На рисунках 3-5 представлена зависимость каталитической активности SAP *C. albicans* по отношению к САЧ от концентрации фермента (рис. 3), pH (рис. 4) и времени инкубации (рис. 5) исследуемых растворов.

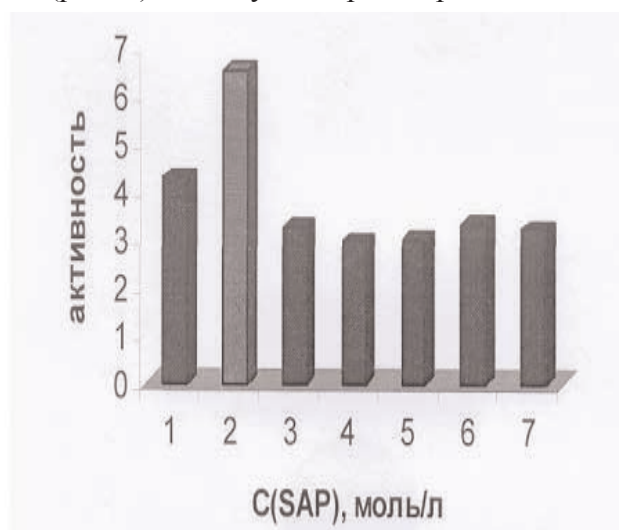
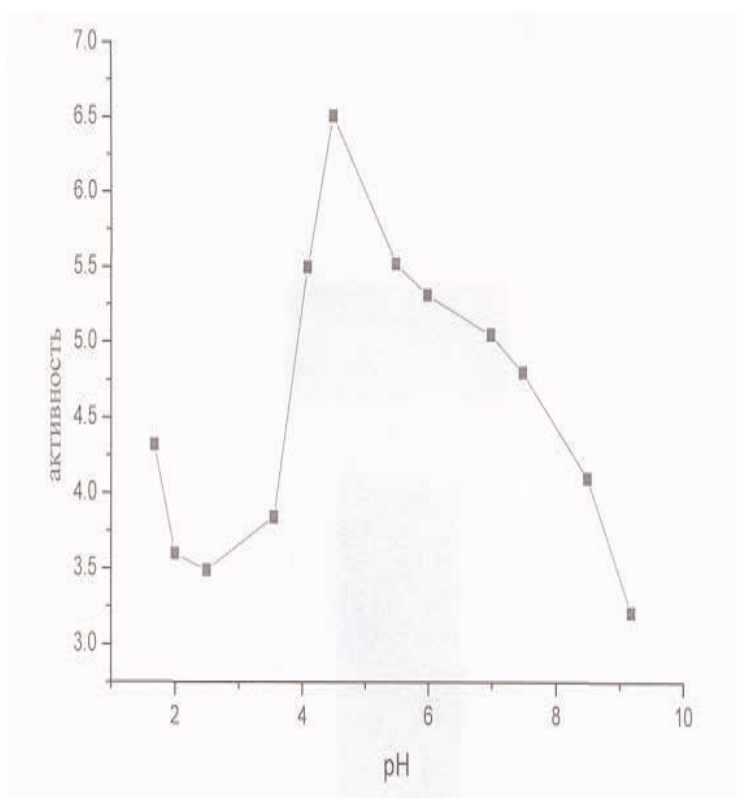


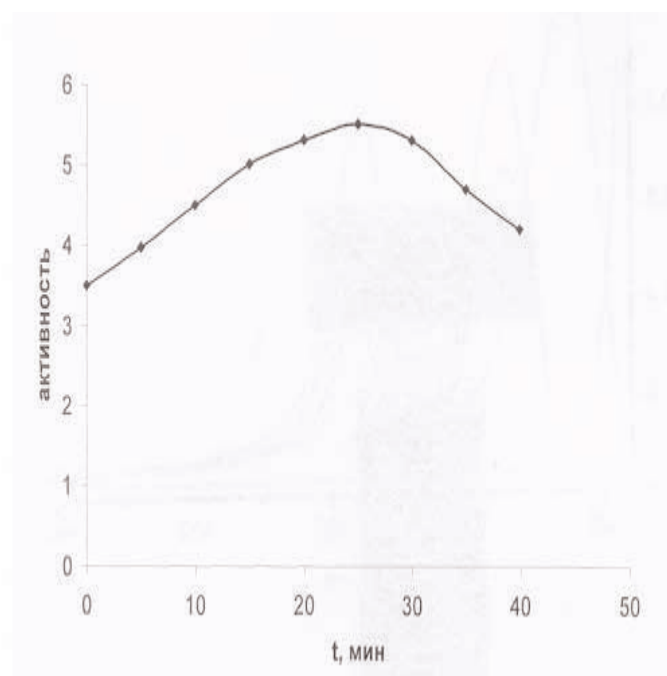
Рисунок 3.

Зависимость активности SAP *C. albicans* от концентрации фермента ( $[CAЧ]=0,003$  мг/мл, pH=4,5).



**Рисунок 4.**

Зависимость активности SAP *C. albicans* от pH раствора ([САЧ]=0,003 мг/мл, [SAP]= $2,33 \times 10^{-6}$  моль/л).



**Рисунок 5.**

Зависимость активности SAP *C. albicans* от времени инкубации фермент-субстратного комплекса [SAP *C. albicans* - САЧ] с ионами Zn(II) ([САЧ]=0,003 г/мл, [SAP]= $2,33 \times 10^{-6}$  моль/л, [Zn<sup>2+</sup>]= $1 \times 10^{-6}$  моль/л, pH=4,5).



По результатам проведенных экспериментов оптимальные условия гидролиза субстрата – ЧСА в присутствии протеазы составили:  $[САЧ]=0,004$  г/мл,  $[SAP]=2,33 \times 10^{-6}$  моль/л, pH 4,5, время инкубации 25 минут.

Оценено влияние различных концентраций  $Zn(II)$  и  $Mn(II)$  на активность SAP *C. albicans* при оптимальных условиях ферментативного гидролиза. Полученные данные представлены в диаграмме 1. Из них следует, что в диапазоне концентраций от  $1 \times 10^{-8}$  до  $1 \times 10^{-7}$  и от  $1 \times 10^{-6}$  до  $1 \times 10^{-2}$  моль/л ион цинка проявляет ингибирующее действие, а при концентрации  $5 \times 10^{-7}$  моль/л активирующее действие на исследуемую протеиназу.

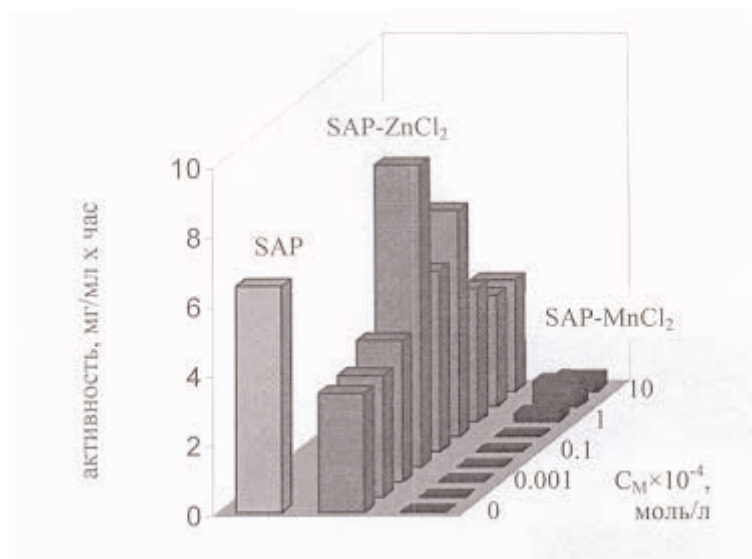


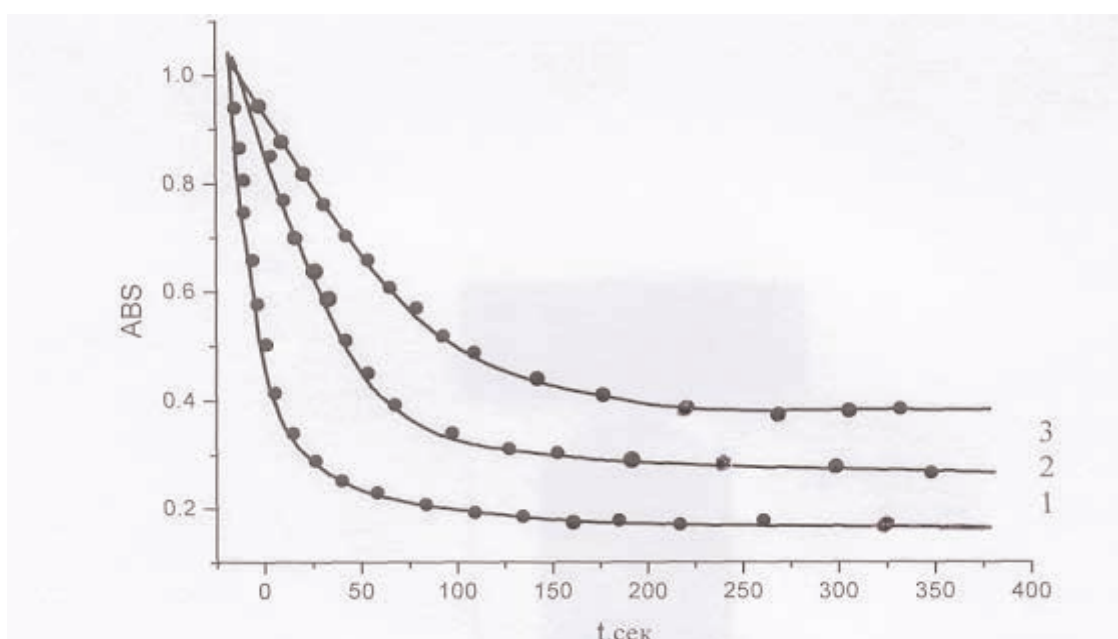
Диаграмма 1.

Зависимость активности SAP *C. albicans* от концентрации эффектов  $ZnCl_2$  и  $MnCl_2$  в растворе ( $[САЧ]=0,004$  г/мл,  $[SAP]=2,33 \times 10^{-6}$  моль/л, pH=4,5).

Ион марганца проявляет только ингибирующее действие во всем диапазоне исследуемых концентраций. Эффект ингибирования ионом  $Mn(II)$  намного сильнее, чем в присутствии ионов  $Zn(II)$  вплоть до денатурации фермента в области концентраций от  $5 \times 10^{-4}$  моль/л. Наблюдаемое увеличение торможения активности SAP *C. albicans* в присутствии ионов марганца по сравнению с ионами цинка, по нашему мнению, связано с тем, что марганец, как более "жесткий" ион [21], обладает большей поляризующей способностью и будет координироваться с атомами кислорода фрагмента аспарагиновой кислоты, находящейся в активном центре в большей степени, чем цинк. Поэтому марганец, по-видимому, является более токсичным металлом для данного фермента, он не просто изменяет конформацию исследуемой протеиназы, делая стерически недоступными активные участки, а при некоторых концентрациях даже разрушает её на отдельные фрагменты.

Полученные результаты согласуются с большими величинами констант устойчивости для комплекса  $[SAP \text{ } C. \text{ albicans} - Mn(II)]$  по сравнению с комплексом  $[SAP \text{ } C. \text{ albicans} - Zn(II)]$ .

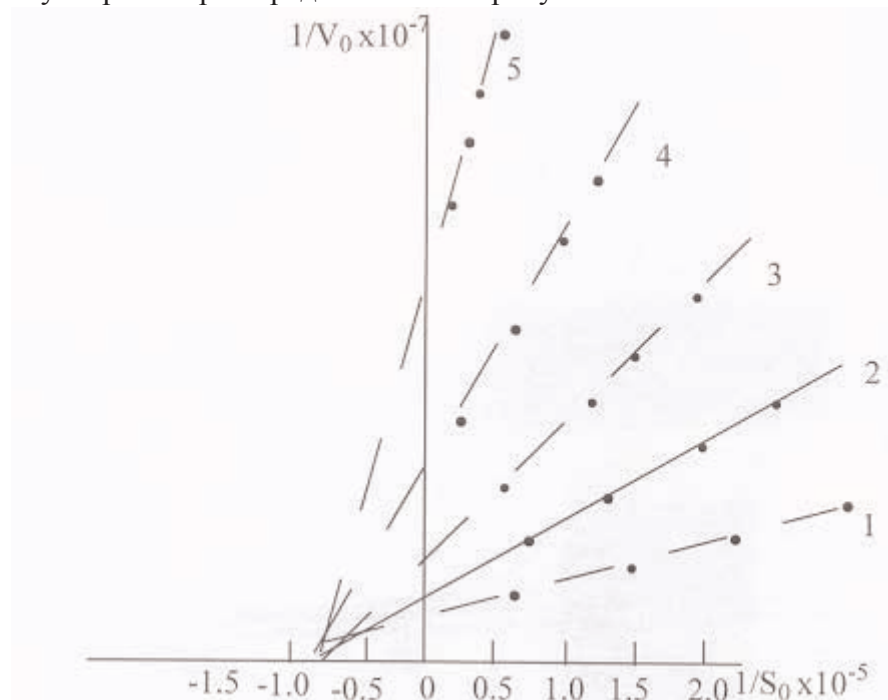
Описание биохимического процесса с участием фермента требует проведения кинетических исследований взаимодействий в изучаемой системе в отсутствие и присутствии эффекторов. В настоящей работе представлены кинетические исследования реакций протеолиза САЧ в присутствии хлорида цинка. Выбор для кинетических исследований именно соли цинка обусловлен ее двойным действием на SAP *C. albicans* в качестве эффектора, в том числе впервые обнаруженным активирующим эффектом. На рисунке 6 представлена кинетическая кривая зависимости оптической плотности от времени при  $\lambda=278$  нм, относящейся к поглощению субстрата САЧ.


**Рисунок 6.**

Кинетические кривые гидролиза САЧ в присутствии SAP *C. albicans* при различных концентрациях  $\text{ZnCl}_2$  (моль/л): 0 (2),  $1 \times 10^{-2}$  (3),  $5 \times 10^{-7}$  (1) ( $\lambda=278$  нм,  $[\text{САЧ}]=4,61 \times 10^{-5}$  моль/л,  $[\text{SAP}]=1,91 \times 10^{-9}$  моль/л).

Начальную скорость реакции протеолиза альбумина определяли по наклону касательной к кинетической кривой оптическая плотность субстрата – время на начальном участке, ограниченном шестью минутами.

Данные для определения кинетических параметров в координатах Лайнуивера – Берка представлены на рисунке 7.


**Рисунок 7.**

Зависимость начальных скоростей гидролиза ЧСА в присутствии SAP *C. albicans* от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера–Берка при различных концентрациях эффектора (моль/л):  $[\text{Zn(II)}]=5 \times 10^{-7}$  (1), 0 (2),  $1 \times 10^{-2}$  (3),  $1 \times 10^{-6}$  (4),  $1 \times 10^{-5}$  (5) ( $\lambda=278$  нм,  $[\text{САЧ}]=4,61 \times 10^{-5}$  моль/л,  $[\text{SAP}]=1,91 \times 10^{-9}$  моль/л).

По результатам кинетических исследований рассчитаны максимальная скорость ферментативной реакции ( $V_m$ ), кажущаяся константа Михаэлиса ( $K_m$ ) и константа эффекта в присутствии и отсутствие в качестве эффектора  $ZnCl_2$ . Полученные данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. Кинетические параметры ферментативной реакции гидролиза САЧ в присутствии SAP *C. albicans* и  $ZnCl_2$ .

Эффектор	$C_{эфф}$ , моль/л	$V_m^0 \times 10^{-7}$ , (моль·л)/с	$K_m^0 \times 10^{-5}$ , моль/л	$K_m$ , моль/л	Тип эффекта
$ZnCl_2$	0	6,34±0,02	1,35±0,03		
	$1 \times 10^{-2}$	3,61±0,01	1,39±0,05	$(1,32 \pm 0,02) \times 10^{-2}$	Частично неконкурентное или каталитическое ингибирование
	$1 \times 10^{-6}$	3,02±0,02	1,34±0,02	$(7,61 \pm 0,01) \times 10^{-7}$	
	$5 \times 10^{-7}$	19,70±0,20	1,32±0,01	$(2,30 \pm 0,02) \times 10^{-8}$	Неконкурентная или каталитическая активация
	$1 \times 10^{-8}$	1,83±0,02	1,33±0,03	$(2,01 \pm 0,01) \times 10^{-9}$	Частично неконкурентное или каталитическое ингибирование

Примечание. [САЧ]=0,003 г/мл, [SAP]= $1,91 \times 10^{-9}$  моль/л, pH=4,5 (n=5, p=0,95).

В присутствии солей Zn(II) в диапазонах концентраций  $1 \times 10^{-8}$ - $4 \times 10^{-7}$  и  $1 \times 10^{-6}$ - $1 \times 10^{-2}$  моль/л наблюдается эффект частично неконкурентного или каталитического ингибирования.

В данном случае в фермент – субстратной системе ион Zn(II) связывается не по активному центру, что приводит к уменьшению максимальной скорости реакции ( $\beta < 1$ ,  $V_m' < V_m^0$ ), и не влияет на связывание субстрата с активным центром фермента ( $\alpha = 1$ ,  $K_m = K_m^0$ ), то есть не затрудняет образование EIS комплексов. В результате EIS комплексы распадаются со скоростями значительно меньшими ( $\beta < 1$ ) скоростей распада ES-комплексов. Кроме эффекта ингибирования в исследуемой системе в присутствии ионов Zn(II) в концентрации  $5 \times 10^{-7}$  моль/л наблюдается эффект активации, который относится к типу неконкурентной или каталитической активации. Особенности взаимодействия Zn(II) с SAP *C. albicans* свидетельствуют о том, что субстрат и активатор связываются независимо с ферментом ( $\alpha = 1$ ,  $\beta > 1$ ), образуя комплекс EAS. При этом увеличивается максимальная скорость расщепления ферментом субстрата, и степень связывания между ними не изменяется.

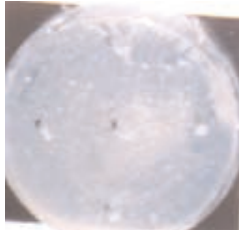

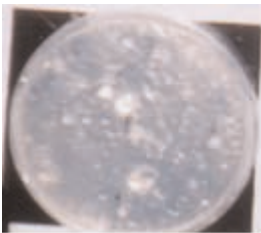
Известно, что SAP *C. albicans* является основным действующим компонентом и причиной микозов, вызванных грибами *C. albicans* [22]. В связи с этим непосредственная оценка влияния эффектора  $ZnCl_2$  на протеолитическую активность живых патогенных культур *Candida albicans* поможет получить практически значимую для медицинских и фармакологических целей информацию.

На застывшую питательную среду с носителем (агар-агаром) производили посев штаммов *C. albicans* различной локализации: отомироз, онихомироз, кандидоз ротовой полости. Чашки Петри помещали в термостат с определенной температурой 29-32°C и через 9 суток определили альбуминазную активность по степени просветления белковой среды и скорости этого процесса. По наличию и размерам зон просветления (зоны лизиса) вокруг растущей колонии гриба определяли присутствие и активность протеолитического фермента SAP *C. albicans*.

Данные по влиянию  $ZnCl_2$  на каталитическую активность SAP *C. albicans*, полученные в лабораторных условиях на модельных системах представлены в таблице 2.

# АСПАРАГИНОВАЯ ПРОТЕИНАЗА *C. ALBICANS*

Таблица 2. Результаты биохимического эксперимента по определению альбуминазной активности штамма *C. albicans* в присутствии  $ZnCl_2$  ( $[CAЧ]=0,003$  г/мл,  $[SAP]=1,91 \times 10^{-9}$  моль/л, pH=4,5.

Эффектор	С эффектора, моль/л	Активность в модельном растворе, мл/мл×час	Альбуминазная активность
	контроль	6,82±0,03	контроль 
$ZnCl_2$	$1 \times 10^{-2}$ $1 \times 10^{-6}$ $1 \times 10^{-7}$	0,72±0,05 5,21±0,01 0,96±0,05	ингибирование 
	$5 \times 10^{-7}$	8,68±0,01	активация 

Полученные в ходе биохимического эксперимента результаты хорошо воспроизводятся, соответствуют данным лабораторных испытаний в модельных системах и могут быть использованы для медицинской диагностики и разработки фармакологических препаратов для лечения микозов *Candida albicans*.

Коллектив авторов выражает благодарность профессору Сальникову Ю.И. и старшему научному сотруднику Штырлину В.Г. кафедры неорганической химии Казанского государственного университета за помощь и консультации при проведении расчетов по программе CPRESSP.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бурова С.А., Буслаев Г.Н., Шахтмейстер И.Я. (1999) Приложение к журналу "Здоровье", **6**, 16-17.
2. Naglik J.R., Challacombe S.J., Hube B. (2003) Mol. Biol. Rev., **67**, 400-428.
3. Smolenski G., Sullivan P.A., Cutfield S.M., Cutfield J.F. (1997) Microbiology, **143**, 349-356.
4. Tavanti A., Pardini G., Campa D., Davini P., Lupetti A., Senesi S. (2004) J. Clinical Microbiol., **42**, 4726-4734.
5. Ernest J.F. (2000) Microbiology, **146**, 1763-1774.
6. Shaller M., Hube B., Ollert M.W., Thoma-Greber E., Schafer W., Born-von Zepelin M., Korting H.C. (1999) J. Invest. Dermatol., **112**, 383-386.
7. Calderone R.A., Fonzi W.A. (2001) Trends in Microbiology, **9**, 327-335.
8. Aba-Zapatero C., Goldman R., Muchmore S.W., Hutchins C., Stewart J., Payne C.D., Ray T.L. (1996) Protein Sci., **5**, 640-652.
9. Kaminishi H., Hagihara Y., Hayashi S., Cho T. (1986) Infect. Immun., **53**, 312-316.
10. Cassone A., Bernardis De F., Torosantucci A., Tacconelli E., Tumbarello M., Cauda R. (1999) J. Infect. Disease, **180**, 68-71.
11. Медянцева Э.П., Вертлиб М.Г., Будников Г.К. (1998) Успехи химии, **67**(3), 252-260.
12. Кутырева М.П., Медянцева Э.П., Халдеева Е.В., Будников Г.К., Глушко Н.И. (1998) Вопр. мед. хим., **44**, 172-178.
13. Лурье Ю.Ю. (1989) Справочник по аналитической химии. Химия, М.
14. Березин И.В., Клесов А.А. (1976) Практический курс химической и ферментативной кинетики. МГЦ, М.
15. Булатов М.И., Калинин И.П. (1986), Практическое руководство по фотометрическим методам анализа. Химия, Л.
16. Сальников Ю.И., Глебов А.Н., Девятов Ф.В. (1989) Полиядерные комплексы в растворах. Изд. Казанск. Ун-та, Казань.
17. Леценко В. М., Леценко Г. М. (2000) Проблемы медицинской микологии, **2**, 49-50.
18. Shaller M., Januschke E., Schackert C., Woerle B., Korting H. (2001) J. Med. Microbiol., **50**, 743-747.
19. Tavanti A., Pardini G., Campa D., Davini P., Lupetti A., Senesi S. (2004) J. Clinical Microbiol., **42**, 4726-4734.
20. Мецлер Д. (1980) Биохимия. Мир, М.
21. Хартли Ф., Бергес К. (1983) Равновесия в растворах. Мир, М.
22. Hube B., Naglik J. (2001) Microbiology, **147**, 80-87.

Поступила: 27. 01. 06.

INFLUENCE OF ZN(II) AND MN(II) ON CATALYTIC ACTIVITY OF ASPARTIC  
PROTEINASES OF *CANDIDA ALBICANS*

*M.P. Kuttyreva<sup>1</sup>, R.R. Galimzanova<sup>1</sup>, N.A. Ulahovich<sup>1</sup>, N.I. Glushko<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Kazan State University, ul. Kremlevskaya, 18, Kazan, 420008 Russia, tel.: (843)232-03-15;  
e-mail: MariannaKuttyreva@ksu.ru

<sup>2</sup>Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, ul. Bolshaya Krasnaya, 67,  
Kazan, 420008 Russia; tel.: (843)236-56-59

The interaction of secreted aspartic proteinases *Candida albicans* (SAP *C. albicans*) with ZnCl<sub>2</sub> and MnCl<sub>2</sub> was studied. Logarithms of stability constant from the data of electronic spectroscopy were calculated:  $\lg\beta = 4,73 \pm 0,20$  for the complex [SAP *C. albicans* - Zn(II)] and  $\lg\beta = 7,02 \pm 0,20$  for the complex [SAP *C. albicans* - Mn(II)]. The composition and maximum accumulation of complexes in solution were calculated. The optimal conditions of hydrolysis of the substrate, HAS (human serum albumin) in the presence of proteinases were determined: [HSA]=0.004 g/ml, [SAP]=2.33  $\mu$ M, pH=4.5, the time of incubation of 25 min. The activity SAP *C. albicans* in the presence of ZnCl<sub>2</sub> and MnCl<sub>2</sub> in different concentrations in optimal conditions of enzymic hydrolysis was estimated. For the first time the activating action of ZnCl<sub>2</sub> on catalytic activity of proteinase in concentration  $5 \times 10^{-7}$  mol/l was discovered. The maximal rate of enzymic reaction ( $V_m$ ), the Michaelis constant ( $K_m$ ) and constants of effects in presence and absence as the effector of ZnCl<sub>2</sub> were calculated. The estimation of albuminatic activity of *C. albicans* infections family in different diseases localization in the presence and the absence as the effector of ZnCl<sub>2</sub> was evaluated.

**Key words:** proteinases of *Candida albicans*, enzymic catalysts, effectors, kinetic parameters.