

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.15.024.025.535.243

© Коллектив авторов

ПОДАВЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОТЕИНАЗ *CANDIDA ALBICANS* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХЛОРИДА КОБАЛЬТА

М.П. Кутырева, А.Р. Мухаметзянова, Н.А. Улахович*

Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, Казань,
ул. Кремлевская, 18; тел.: (843)2315302; эл. почта: mkutyreva@mail.ru.

Оценено влияние хлорида кобальта(II) на систему протеиназ *Candida albicans* (*SAP C. alb.*), находящихся как в растворе, так и для ферментов ковалентно закрепленных на поверхности нитратцеллюлозной мембраны. Определены оптимальные условия ферментативной активности *SAP C. alb.* Установлено, что собственная активность *SAP C. alb.* при гетерогенном ферментативном катализе в 2 раза ниже, чем в гомогенном катализе. Определено влияние различных концентраций хлорида кобальта(II) на протеолитическую активность *SAP C. alb.* по отношению к гемоглобину. В растворе индуцируемая протеиназа подвергается инактивации в присутствии хлорида кобальта, чего не наблюдается для фермента конститутивного типа. Кроме того, и в гетерогенной системе сохраняется преимущественное влияние хлорида кобальта на индуцируемую протеиназу.

Ключевые слова: секреторные аспарагиновые протеиназы *Candida albicans*, кобальт, ферментативная активность, комплексообразование.

ВВЕДЕНИЕ. Грибковым инфекциям благоприятствуют инвазивные, хирургические, инструментальные вмешательства, обследование больных, внедрение в медицину новых материалов и покрытий для протезирования [1-3]. Кандидамикозы и в настоящее время являются одним из наиболее распространенных заболеваний. Высокая патогенная активность грибкового аллергена *Candida albicans* (*C. alb.*) непосредственно связана с количеством и многообразием функций вырабатываемых им секреторных аспарагиновых протеиназ (международное название - secretory aspartic proteinase, сокращение - *SAP C. alb.*) [4]. В литературе описаны результаты медицинских и биохимических исследований, которые убедительно доказывают влияние секреторных аспарагиновых протеиназ *Candida* на развитие и активизацию таких заболеваний как гастрит, стоматит, грибковые поражения слизистых и кожных покровов. Также наибольшее изучение способов влияния секреторных аспарагиновых

* - адресат для переписки

протеиназ получило в связи с исследованием прогрессирования вируса иммунодефицита человека [4-9].

Управление ферментативной активностью протеиназ с использованием модуляторов позволит управлять патогенностью *Candida* и оптимизировать существующие к настоящему времени методики лечения микозов *Candida*. Описание влияния модуляторов на ферментативную активность протеиназы ограничено только рассмотрением действия традиционных соединений – ингибиторов на каталитическую активность *SAP C. alb.* [10]. Традиционно лечение микозов *Candida* помимо основной антифунгальной терапии включает приём поливитаминных препаратов, содержащих неорганические соли биофильных элементов, в том числе ионы d-металлов, которые могут оказывать непосредственное влияние на течение кандидоза. В работе [11] рассмотрено влияние хлорида цинка на активность протеиназ *Candida* различных типов. Данная работа является продолжением исследований в этой области. Целью настоящей работы является оценка возможности подавления активности культуры *Candida albicans* с использованием хлорида кобальта.

МЕТОДИКА. В работе использовали секреторные аспарагиновые протеиназы *Candida albicans* индуцируемого (*ISAP C. alb.*) (53,68 кДа) и конститутивного (*KSAP C. alb.*) (42,82 кДа) типа, выделенные из надосадочной жидкости при выращивании патогенных грибковых микроорганизмов *C. alb.* с последующим центрифугированием биомассы и переосаждением этанолом [12-14].

Исходный антиген *C. alb.* получен центрифугированием биомассы гриба *C. alb.*, выращенного в течение 48 ч при 30°C. Исходную концентрацию водного раствора протеиназы *C. alb.* определяли спектрофотометрически при $t = 25^\circ\text{C}$ и $\lambda = 278$ нм по формуле

$$c(\text{мкг/мл}) = A_{278} \times n/1,3,$$

где A_{278} – оптическая плотность исследуемого раствора, n – коэффициент разбавления, 1,3 – коэффициент градуировочной кривой.

Исходная концентрация *SAP C. alb.* в разведении 1:10 составила, для индуцируемой протеиназы $1,83 \times 10^{-4}$ М, для конститутивной протеиназы $1,98 \times 10^{-9}$ М, растворы $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, в качестве субстрата использовали бычий гемоглобин (Hb) марки “Агат-Мед”, буферные растворы с $\text{pH}=1,08-8,00$.

Электронные спектры поглощения снимали на спектрофотометре Lambda 35 (“Perkin Elmer”, Великобритания) в области длин волн 190-900 нм, при $t=36,6 \pm 0,01^\circ\text{C}$ с использованием термостатирующей системы, включающей термостатируемый держатель кювет, проточный термостат Julabo MB-5A и термостаты Пельте РТР-1. Для измерения использовали кварцевые кюветы, толщина которых равна 1 см.

Измерения pH проводились при $t=25 \pm 0,05^\circ\text{C}$ на pH метре - pH 150 М, точность определения pH составила 0,01 логарифмической единицы.

Выделение индуцируемой протеиназы SAP Candida albicans (ISAP). В коническую колбу на 1 литр вводили питательную среду состоящую из 2 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 г K_2HPO_4 , 2 г глюкозы, 6,5 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,5 г KCl , 4 г БСА, $\text{pH}=7,0$. Затем добавляли штамм грибкового аллергена *C. alb.* полученные среды автоклавировали в течение 1 часа при $t=120^\circ\text{C}$ и оставляли в стерильном боксе на 7 дней. В течение этого времени проводили измерения оптической плотности и pH надосадочной жидкости. Затем сливали надосадочную жидкость, переосаждали трехкратным объемом этанола, центрифугировали в течение 1 ч при 3000 об/мин на центрифуге ЦЛС-3 [15-17].

Выделение конститутивной протеиназы SAP Candida albicans (KSAP). В коническую колбу на 1 литр вводили питательную среду состоящую из 2 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 г K_2HPO_4 , 20 г глюкозы, 6,5 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,5 г KCl , $\text{pH}=7,0$, витамины “Гендевит” из расчёта 1 таблетка на литр воды. В эту среду добавляли штамм грибкового аллергена *C. alb.* Дальнейшие операции проводились аналогично *SAP2* [13].

Изготовление нитроцеллюлозных мембран с иммобилизованной SAP *Candida albicans*. Нитроцеллюлозу (0,06 г) растворяли в смеси органических растворителей – этилацетата (1,75 мл) и толуола (0,25 мл). При изготовлении матриц с включённым ферментом добавляли 0,5 мл SAP *C. alb.* (c_{ISAP} в матрице составляла $2,64 \times 10^{-7}$ моль/см², c_{KSAP} – $3,11 \times 10^{-12}$ моль/см²). После перемешивания добавляли 0,06 мл глутарового альдегида (25%, марки “Reanal”) и затем 2-3 капли гексана в качестве коагулянта. После тщательного перемешивания из этой смеси на стеклянной поверхности чашки Петри (d = 90 мм) получали плёнку, которую высушивали в потоке воздуха. Готовые пленки хранили в холодильнике при температуре 4°C. Площадь рабочей поверхности матрицы составляла 6 см².

Определение протеолитической активности протеиназы *Candida albicans*. Активность фермента (A) определяли в стандартных условиях по увеличению скорости каталитической реакции по сравнению с некаталитической. Скорость реакции выражали как изменение концентрации субстрата (мкг/л) за единицу времени (мин). При определении каталитической активности протеиназы SAP *C. alb.* в растворе, в мерную колбу на 5 мл вводили 0,52 мл раствора гемоглобина (Hb) (63000 Да) с концентрацией $1,914 \times 10^{-5}$ М (c_{Hb} в рабочем растворе – 2×10^{-6} М или 126×10^3 мкг/л); 0,1 мл SAP *C. alb.* с концентрацией в исследуемом растворе $3,70 \times 10^{-7}$ М для индуцируемой протеиназы и $1,19 \times 10^{-12}$ М для конститутивной. Окончательный объём доводили буферным раствором pH = 4,3-4,0. Раствор перемешивали и переносили в кварцевую спектрофотометрическую кювету. После инкубирования в течение 15 минут при $t = 36^\circ\text{C}$ регистрировали электронный спектр поглощения полученного раствора в области длин волн 190-900 нм и измеряли интенсивность полосы поглощения при длине волны $\lambda = 407$ нм.

При определении протеолитической активности SAP *C. alb.*, иммобилизованной на полимерной нитратцеллюлозной мембране в раствор вносили нитроцеллюлозную мембрану, площадью $s = 6$ см² с иммобилизованной SAP *C. alb.* (концентрация фермента на поверхности $c_{ISAP} = 2,64 \times 10^{-7}$ моль/см² и $c_{KSAP} = 3,11 \times 10^{-12}$ моль/см²). Оставшуюся после взаимодействия с протеиназой *C. alb.* в растворе концентрацию Hb определяли по градуировочному графику зависимости величины поглощения от концентрации гемоглобина (уравнение 1). В качестве растворов сравнения использовали растворы без Hb:

$$Y = (0,17 \pm 0,09) + (409195,79 \pm 27211,89) \times c_{Hb} \quad R=0,98912 \quad (1)$$

Активность фермента определяли по формуле 2

$$A = \frac{\Delta C_{Hb}}{t}, \quad (2)$$

где A – активность, t - время,

$$\Delta C_{Hb} = C_{исх(Hb)} - C_{ост(Hb)}$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Система аспарагиновых протеиназ *C. alb.* неразрывно связана с уровнем иммунитета и в настоящее время включает в себя десять изоферментов SAP1-SAP10, обладающих различными функциями и определяющих локализацию и тяжесть кандидиинфекции [4, 18]. Основным интерес представляют два типа протеиназ *Candida* взаимосвязанных друг с другом: индуцируемые SAP *C. alb.*, проявляющие антигенные свойства, и конститутивные SAP *C. alb.*, обладающие преимущественно сорбционными функциями и необходимые для последующей секреции и функционирования протеиназ первой группы. Для работы выбраны наиболее изученные протеиназы *Candida albicans*: индуцируемая ISAP-SAP2 (Protein Data Bank: doi: 10.2210/pdb 1zap/pdb) и конститутивная KSAP-SAP4 (Protein Data Bank: doi: 10.2210/pdb 2qzx/pdb) [19]. Аминокислотная последовательность SAP представлена на рисунке 1.

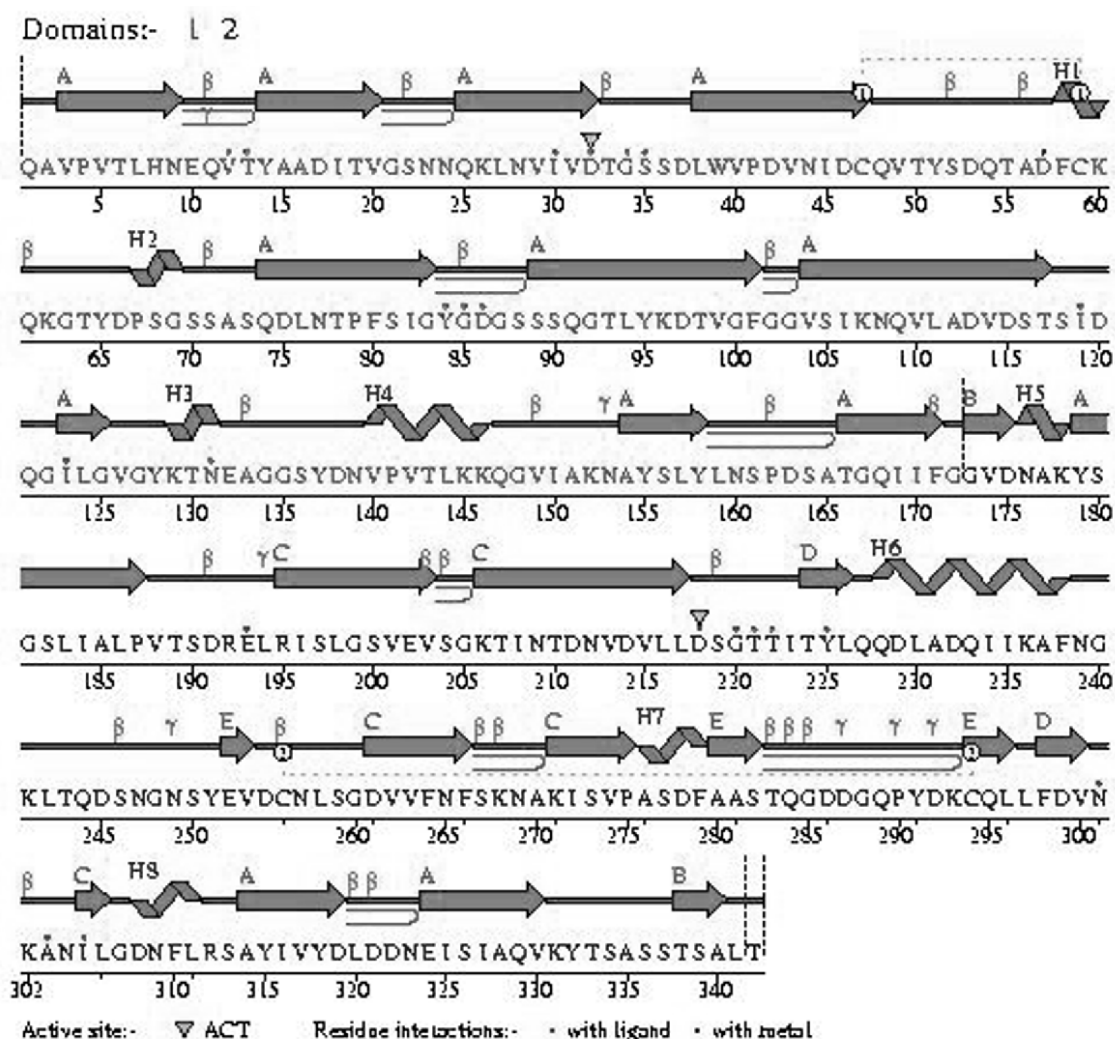


Рисунок 1.

Аминокислотная последовательность секреторной аспарагиновой протеиназы.

Для наглядности α -спиральные участки представлены в виде цилиндров.

β -складки - в виде лент со стрелкой, указывающей направление цепи в складке от N-конца к C-концу. ▽ - активный центр.

В структуре *SAP C.alb.* присутствуют 2 функционально-активных участка:

1. *Активный центр фермента* - два депротонированных каталитически активных остатка аспарагиновой кислоты Asp 32 и Asp 218, расположенные на расстоянии водородной связи друг от друга и действующие совместно по отношению к молекуле субстрата, катализируя разрыв пептидной связи между гидрофобными аминокислотами (15Leu / Tyr16 16Tyr / Leu17 24Phe / Phe25) [1,18];

2. *Центр связывания с d-металлами* - Asp 57, отвечающий за связывание фермента с металлом [19].

Определены оптимальные условия ферментативной активности *SAP C. alb.* в растворе (*SAP^r*) и для ферментов ковалентно закрепленного на поверхности нитроцеллюлозной мембраны (*SAP^s*).

Графики зависимости скорости ферментативной реакции гидролиза Нб в присутствии *SAP^r* и *SAP^s* от pH и имеют классическую [20] колоколообразную форму, обусловленную наличием двух ионогенных группировок в активном центре фермента. На кривых зависимости ферментативной активности индуцируемой протеиназы в растворе и на поверхности нитроцеллюлозной мембраны от pH

наблюдается один максимум в области $pH = 3,9-4,3$, что соответствует области значения pK аспарагиновой кислоты (3,95), а для конститутивной протеиназы в растворе на кривой зависимости ферментативной активности от pH наблюдается два максимума при $pH = 3,9-4,3$ и $pH = 7,0$, второй из которых соответствует pH клеточной мембраны [21].

Оптимальные условия, в которых ферменты SAP^V и SAP^S проявляют максимальную протеолитическую активность по отношению к субстрату Нб представлены в таблице.

Таблица. Оптимальные условия протеолитического действия SAP^V и SAP^S по отношению к гемоглобину ($c_S=126 \times 10^3$, мкг/л).

<i>Candida albicans</i>		c_{SAP} , М	pH	$t_{инк}$, мин	Активность (A), мкг/л×мин
Индукцируемая протеиназа	$HSAP^V$	$3,70 \times 10^{-7}$ М	4,3	15	$474,6 \pm 0,5$
	$HSAP^S$	$2,64 \times 10^{-7}$ моль/см ²	4,3	30	$277,2 \pm 0,2$
Конститутивная протеиназа	$KSAP^V$	$1,19 \times 10^{-12}$ М	4,0	15	$88,6 \pm 0,3$
	$KSAP^S$	$3,11 \times 10^{-12}$ моль/см ²	4,0	30	$42,7 \pm 0,2$

Согласно полученным экспериментальным данным, собственная активность SAP *C. alb.* при гетерогенном ферментативном катализе в 2 раза ниже, чем в гомогенном катализе. Это может быть обусловлено, во-первых, частичной инактивацией фермента в процессе его иммобилизации при контакте с органическими растворителями. Во-вторых, реакция ферментативного гидролиза гемоглобина с использованием SAP *C. alb.*, находящейся в растворе, ведется при значительном избытке субстрата. Поэтому влияние диффузионной составляющей на скорость гомогенного ферментативного катализа незначительно.

Влияние кобальта(II) на ферментативную активность протеиназ *Candida albicans*. Присутствие различных концентраций $Co(II)$ оказывает влияние на протеолитическую активность SAP *C. alb.* по отношению к Нб. На диаграммах (рис. 2, 3) представлена каталитическая активность индуцируемой и конститутивной SAP *C. alb.* в растворе и на поверхности нитратцеллюлозной мембраны в присутствии $Co(II)$ в различных концентрациях в оптимальных условиях ферментативного гидролиза. Установлено, что для $HSAP^S$, $HSAP^V$ в зависимости от концентрации эффектора наблюдаются как эффект ингибирования, так и эффект активации ферментативной активности.

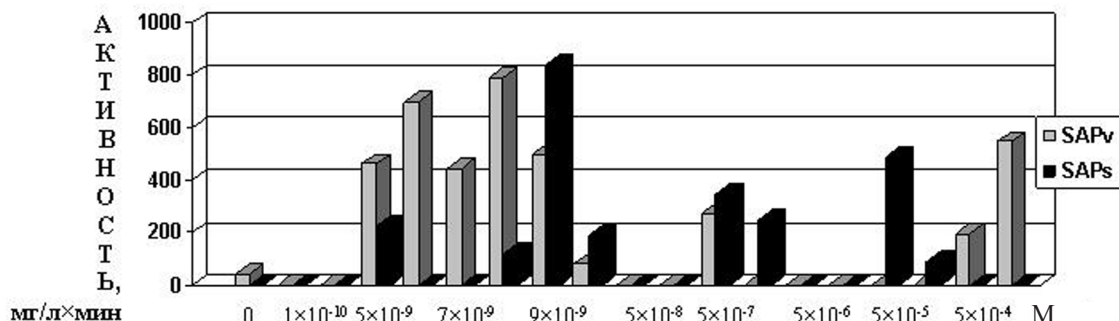


Рисунок 2.

Диаграмма зависимости протеолитической активности индуцируемой протеиназы SAP^S , SAP^V от концентрации эффектора $Co(II)$.

Здесь и на рисунке 3 представлены усреднённые данные пяти измерений, при этом разброс составляет 1-3%.

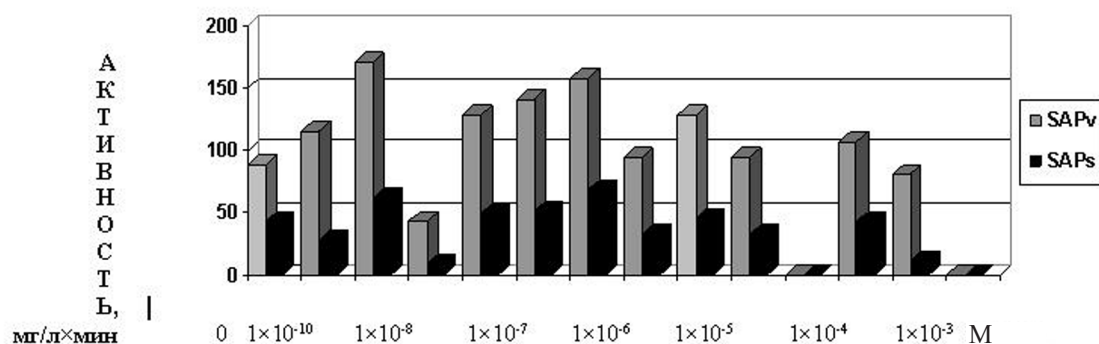


Рисунок 3.

Диаграмма зависимости протеолитической активности конститутивной протеиназы *SAP^s*, *SAP^v* от концентрации эффектора Co(II).

Для индуцируемой *SAP C. alb.* в растворе и в иммобилизованном состоянии в присутствии ионов Co(II) в диапазонах концентраций 1×10^{-8} – 1×10^{-4} и 1×10^{-10} – 1×10^{-9} М преимущественно наблюдается ингибирование каталитической активности фермента. Присутствие Co(II) в концентрациях 5×10^{-9} – 1×10^{-8} М приводит к увеличению каталитической активности индуцируемой *SAP C. alb.* Следует отметить, что активационный эффект в присутствии Co(II) проявляется в случае нахождения индуцируемой *SAP C. alb.* в растворе.

Для конститутивной *SAP C. alb.* в растворе и в иммобилизованном состоянии выраженный эффект ингибирования наблюдается при концентрациях Co(II) 5×10^{-4} и 1×10^{-8} М. В присутствии Co(II) в иных концентрациях в рамках диапазона 1×10^{-10} – 1×10^{-3} М наблюдается эффект активации или слабовыраженного ингибирования. Таким образом, ион Co(II) оказывает большее ингибирующее действие на *SAP C. alb.* индуцируемого типа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. В растворе индуцируемая протеиназа подвергается инактивации в присутствии CoCl_2 , чего не наблюдается для фермента конститутивного типа. Кроме того, и в гетерогенной системе сохраняется преимущественное влияние хлорида кобальта на индуцируемую протеиназу.

Таким образом, полученные экспериментальные данные позволяют охарактеризовать хлорид кобальта (II) как активный модулятор ферментативной активности протеиназ *SAP C. alb.* Возможность как полного ингибирования, так и значительной активации фермента в растворённом и иммобилизованном состояниях открывает широкие возможности практического использования данных систем в медико-биологической и фармацевтической областях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gold J.W.M. (1984) Am. J. Med., **76**, 458-463.
2. Klein R.S., Harris C.A., Small C.B., Moll B., Lesser M., Friedland G.H. (1984) New Engl. J. Med., **311**, 354-357.
3. Burnie J.P. (1997) Current Anaesthesia and Critical Care, **8**(4), 180-183.
4. Naglik J.R., Challacombe S.J., Hube B. (2003) Microbiol. Mol. Biol. Rev., **67**, 400-428.
5. Ernst J.F. (2000) Microbiology, **146**, 1763-1774.
6. Fallon K., Bausch K., Noonan J., Huguenel E., Tamburini P. (1997) Infect. Immun., **65**, 551-556.
7. Fidel P.L., Vazquez J.A., Sobel J.D. (1999) Clin. Microbiol., **12**, 80-96.
8. Na B.-K., Song C.-Y. (1999) Clin. Diag. Lab. Immunol., **6**(6), 924-929.

9. *Pichova I., Pavličková L., Dostal J., Dolejší E., Hrušková-Heidingsfeldova O., Weber J., Ruml T., Souček M.* (2001) *Eur. J. Biochem.*, **268**, 2669-2677.
10. *Borg von Zepelin M., Meyer I., Thomssen R., Würzner R., Sanglard D., Telenti A., Monod M.* (1999) *J. Invest. Dermatol.*, **113**, 747-751.
11. Кутырева М.П., Галимзанова Р.Р., Улахович Н.А., Глушко Н.И. (2007) *Биомед. хим.*, **53**, 72-85.
12. *White T.C., Miyasaki S.H., Agabian N.* (1993) *J. Bacterion.*, **175**(19), 6126-6133.
13. *Borg von Zepelin M.* (1998) *Mol. Microbiol.*, **28**, 543-554.
14. Методы экспериментальной микологии. Справочник (1982) Киев, М.
15. *Macdonald F., Odds C.* (1980) *J. Med. Microbiol.*, **13**, 423-435.
16. *Smolenski G., Sullivan P.A., Cutfield S.M., Cutfield J.F.* (1997) *Microbiology*, **143**(2), 349-356.
17. *Hube B., Monod M., Schofield D.A., Brown A.J., Gow N.A.* (1994) *Mol. Microbiol.*, **14**, 87-99.
18. *Hube B., Naglik J.* (2001) *Microbiology*, **147**, 1997-2005.
19. *Abad-Zapatero C., Goldman R., Muchmore S.W., Hutchins C., Stewar J., Payne C.D., Ray T.L.* (1996) *Protein Sci.*, **5**, 640-652.
20. Березин И.В., Клесов А.А. (1976) Практический курс химической и ферментативной кинетики, МГУ, М.
21. Яцимирский К.Б. (1979) Константы устойчивости комплексов с биолигандами. Справочник, Киев, М.
22. Скальный А.В., Рудаков И.А. (2004) Биоэлементы в медицине, Мир, М.

Поступила: 28. 12. 2010.

SUPPRESSION OF ACTIVITY OF *CANDIDA ALBICANS* PROTEINASES BY COBALT CHLORIDE

M.P. Kutyreva, A.R. Mukhametzyanova, N.A. Ulakhovich

Kazan State University, Kazan, Kremlevskaya ul., 18, 420008 Russia; tel.: (843) 2315302;
e-mail: mkutyreva@mail.ru

Influence of cobalt (II) chloride on the system of *Candida albicans* proteinase (*SAP C. alb.*) (both in solution and immobilized on a surface of nitrocellulose membranes) has been investigated. In solution cobalt chloride inactivated inducible but not constitutive enzyme. In the heterogenous system proteolytic effect of the cobalt ion on inducible proteinase was also observed.

Key words: proteinase *Candida albicans*, cobalt, enzyme activity, complex formation.