

УДК 547.1'128.577.15.025

## КОМПОЗИЦИЯ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ И Zn(II) КАК МОДУЛЯТОР АКТИВНОСТИ ПРОТЕИНАЗ

А.Р. Мухаметзянова, М.П. Кутырева, О.И. Медведева, Вл.В. Горбачук,  
Л.С. Якимова, И.И. Стойков, Н.А. Улахович

### Аннотация

Проведена модификация поверхности наночастиц на основе диоксида кремния ( $\text{SiO}_2(\text{NH}_2)_n$ ) 3-аминопропилтриметоксисилоном. Средний размер частиц составил 43.6 нм. Индекс полидисперсности PDI 0.25. Оценена биохимическая активность системы протеиназ *Candida albicans* в присутствии  $\text{SiO}_2(\text{NH}_2)_n$ . Установлено, что введение  $\text{SiO}_2(\text{NH}_2)_n$  как в гомогенную систему индуцируемой протеиназы  $\text{SAP}_2$ , так и в гетерогенную систему конститутивного фермента  $\text{SAP}_4$  приводит к изменению протеолитической активности. Увеличение концентрации  $\text{SiO}_2(\text{NH}_2)_n$  в растворе приводит к снижению степени полидисперсности и к уменьшению диаметра наночастиц. Методом Скэтчарда определены константы связывания в системах [ $\text{SAP}_2 - \text{SiO}_2(\text{NH}_2)_n$ ], [гемоглобин –  $\text{SiO}_2(\text{NH}_2)_n$ ]. И гемоглобин, и  $\text{SAP}_2$  связываются с наночастицами по одному участку биомолекулы:  $K_A 8.9 \cdot 10^6$  и  $7.65 \cdot 10^7$  моль<sup>-1</sup> соответственно. Логарифмы значения констант устойчивости составили  $4.73 \pm 0.20$  и  $5.25 \pm 0.04$  для координационных форм [ $\text{Zn(II)} - \text{SAP}_2 \text{ C. alb.}$ ] и [ $\text{Zn(II)} - \text{SAP}_4 \text{ C. alb.}$ ] соответственно. Одновременное введение в систему  $\text{SAP}_2 \text{ C. alb} - \text{Hb}$  ионов  $\text{Zn(II)}$  и наночастиц на основе диоксида кремния приводит к ярко выраженному эффекту ингибирования протеолиза субстрата. Причем действие композиции значительно эффективнее, чем действие отдельных компонентов.

**Ключевые слова:** аминомодифицированные наночастицы, секреторная аспарагиновая протеиназа *Candida albicans*, константы аффинности, константы устойчивости.

### Введение

Подавляющее большинство вирусов и бактериальных культур обеспечены системой собственных ферментов, регулирующих их активность как патогенной субстанции [1]. Ионы металлов известны как активные регуляторы ферментативной активности [2–5]. Среди ионов биофильных d-металлов, большинство из которых имеют переменную степень окисления, можно выделить ионы  $\text{Zn(II)}$ . Низкая окислительно-восстановительная активность делает ион  $\text{Zn(II)}$  стабильным в биологических средах, потенциал которых постоянно изменяется. Поэтому ионы  $\text{Zn(II)}$  являются идеальными для регулирования реакций, которые требуют участия редокс-стабильных ионов. К данному типу реакций относятся и протеолитические реакции. При комплексообразовании  $\text{Zn(II)}$  имеет энергию стабилизации кристаллическим полем, равную нулю в любом лигандном окружении и геометрии. Во всех соединениях с ферментами  $\text{Zn(II)}$  в основном присутствует в виде тетраэдрических координационных соединений,

в которых ион металла связан с тремя или четырьмя аминокислотными остатками белковых цепей. Однако иногда наблюдается и пятичленная координация (тригональная бипирамида) или шестичленная координация с октаэдрической ориентацией донорных атомов [6].

Использование металлокомплексов в регулировании ферментативной активности позволяет сочетать специфичность и в зависимости от природы лиганда программировать изменение активности фермента. ГРП (гиперразветвленные полимеры) на основе органических и неорганических соединений обладают полифункциональностью в сочетании с наноразмерностью молекул [7]. Разветвленные структуры на основе диоксида кремния, образующие наноразмерные частицы, являются интересными объектами для создания многокомпонентных модуляторов ферментативной активности. Отсутствие токсичности и легкость получения коллоидных частиц  $\text{SiO}_2$  обусловили повышенный интерес к ним как к потенциальным комплексообразователям с биологическими субстратами. Образование комплекса биомолекулы с частицей связано не только с образованием специфических водородных связей, но и с поверхностным зарядом и его распределением на поверхности [8, 9].

Модификация нетоксичных наночастиц  $\text{SiO}_2$  аминосилильными группами позволит получить многофункциональные соединения, сочетающие способность к эффективному комплексообразованию с возможностью водородного связывания с биосубстратами. Подобный подход хорошо зарекомендовал себя в области создания лекарственных препаратов нового поколения [10] и будет использован в настоящей работе для создания композиций, обладающих антипротеиназной активностью.

## 1. Экспериментальная часть

Использовали следующие реагенты и растворители: коллоидный раствор силикатных частиц LUDOX TM40 (Sigma-Aldrich), 3-аминопропилтриметоксисилан (Aldrich, 97%), растворы  $\text{ZnCl}_2$ , в качестве субстрата использовали бычий гемоглобин (Hb) (Sigma-Aldrich), нитратцеллюлоза, секреторные аспарагиновые протеиназы *Candida albicans* (*C. alb.*) индуцируемого ( $\text{SAP}_2$ ) и конститутивного ( $\text{SAP}_4$ ) типов, толуол, этилацетат, гексан (Sigma-Aldrich), глутаровый альдегид (Reanal). Деионизированную воду с удельным сопротивлением  $> 18.0$  МОм/см получали с помощью системы Millipore-Q.

ИК-спектры поглощения в вазелиновом масле и ИК-спектры нарушенного полного внутреннего отражения регистрировали на фурье-спектрометре Spectrum 400 (Perkin Elmer): разрешение  $1 \text{ см}^{-1}$ , накопление 64 скана, время регистрации 16 с, диапазон съемки  $4000\text{--}400 \text{ см}^{-1}$ .

Электронные спектры поглощения записывали на спектрофотометре Lambda 35 (Perkin Elmer) в области длин волн  $190\text{--}900 \text{ нм}$ , при температуре  $36 \pm 0.01 \text{ }^\circ\text{C}$  с использованием термостатирующей системы, включающей термостатируемый держатель кювет, проточный термостат Julabo MB-5A и термостаты Пельтье РТР-1. Для измерения использовали кварцевые кюветы, толщина которых равна 1 см. Точность измерения оптической плотности ( $A$ ) составляла  $\pm 1\%$ .

Распределение по размерам силикатных частиц и индекс полидисперсности в разбавленных дисперсиях при 20 °С были определены на анализаторе размеров частиц Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). Инструмент оснащен 4 мВ He-Ne-лазером, работающим на длине волны 633 нм. Измерения были проведены при угле детектирования 173°, позиция измерения внутри кварцевых и полистирольных кювет была определена автоматически.

Термограммы разложения частиц были получены с помощью метода совмещенной термогравиметрии (ТГ) и дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) на термоанализаторе STA 449 C Jupiter (Netzsch Co, Германия). Скорость нагрева 10 К/мин в атмосфере аргона с общим потоком 20 мл/мин. Для этого 10–20 мг образцов синтезированных силикатных частиц нагревали в диапазоне температур 303–1173 К.

**Модификация поверхности силикатных частиц 3-аминопропилтриметоксисиланом.** К 19 мл коллоидного раствора частиц SiO<sub>2</sub> в течение 30 мин добавляли по каплям 12.5 мл 1%-ного раствора 3-аминопропилтриметоксисилана (64.5 ммоль) в воде первой степени очистки. Затем реакционная смесь перемешивалась со скоростью 1200 об/мин при комнатной температуре в течение 72 ч.

**Качественное определение наличия аминогрупп в силикатных частицах.** Реакцию проводили по методике [11]. Раствор 5 мл 0.1%-ного салицилового альдегида в метаноле перемешивали со 100 мкл коллоидного раствора SiO<sub>2</sub>(NH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> частиц. Наличие первичных аминогрупп подтверждено с помощью УФ-спектроскопии (полоса поглощения в области 404 нм).

ИК-спектр (KBr,  $\nu/\text{см}^{-1}$ ): 471, 719, 786, 1105, 1177 (Si–O–Si), 960 (CH<sub>2</sub>), 1490 (Si–O<sup>-</sup>–H–NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 1629 (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>).

Количество органических фрагментов  $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$  на поверхности частиц SiO<sub>2</sub>(NH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> определяли с помощью ТГ-ДСК-анализа и УФ-спектрофотометрии при  $\lambda$  404 нм, оно составило  $1.89 \cdot 10^{-3}$  моль/мл.

В работе использовали индуцируемую SAP<sub>2</sub> *C. alb* в растворе и конститутивную SAP<sub>4</sub> *C. alb.*, закрепленную на поверхности нитратцеллюлозной мембраны, выделенные согласно литературной методике [12–14]. Исходные концентрации SAP<sub>2</sub> *C. alb.* и SAP<sub>4</sub> *C. alb.* в разведении 1 : 10 определены методом иммуноферментного анализа [15] и составили  $6.79 \cdot 10^{-7}$  и  $2.71 \cdot 10^{-6}$  моль/л соответственно.

**Изготовление нитратцеллюлозных мембран с иммобилизованной конститутивной SAP *Candida albicans*.** Нитратцеллюлоза (0.06 г) растворялась в смеси органических растворителей – этилацетата (1.75 мл) и толуола (0.25 мл). При изготовлении матриц с включенным ферментом добавляли 0.16 мл конститутивной SAP<sub>4</sub> *C. alb.* ( $c_{\text{SAP}}$  в матрице  $2.22 \cdot 10^{-7}$  моль/см<sup>2</sup>). 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) получалась пленка, которая высушивалась в потоке воздуха. Готовые пленки хранились в холодильнике при температуре 4 °С. Площадь рабочей поверхности матрицы составляла 6 см<sup>2</sup>.

**Определение протеолитической активности протеиназ *Candida albicans*.**

Активность фермента определялась в стандартных условиях по увеличению скорости каталитической реакции по сравнению с некаталитической. Скорость реакции указывалась как изменение концентрации субстрата (мг/л) за единицу времени (мин).

При определении каталитической активности SAP<sub>2</sub> *C. alb.* в 5 мл буферного раствора (рН 4.26), содержащего гемоглобин Hb ( $c_{\text{Hb}} = 126$  мг/л), добавляли 0.1 мл SAP<sub>2</sub> *C. alb.*, перемешивали и переносили в кварцевую спектрофотометрическую кювету, инкубировали в течение 15 мин при температуре 36 °С, регистрировали интенсивность поглощения полученного раствора при  $\lambda$  407 нм.

При определении протеолитической активности SAP<sub>4</sub> *C. alb.*, иммобилизованной на полимерной нитратцеллюлозной мембране, в раствор субстрата вносили нитратцеллюлозную мембрану площадью 6 см<sup>2</sup> с иммобилизованной SAP<sub>4</sub> *C. alb.* (концентрация фермента на поверхности  $c_{\text{SAP}} = 2.22 \cdot 10^{-7}$  моль/см<sup>2</sup>).

Концентрацию Hb в растворе после взаимодействия с протеиназой *C. alb.* определяли по градуировочному графику зависимости величины поглощения от концентрации гемоглобина, описываемому следующим уравнением:

$$Abs = (-0.1 \pm 0.09) + (534483.3 \pm 34537.5) \cdot C_{\text{Hb}}, \quad R = 0.99379. \quad (1)$$

Активность фермента определялась по формуле

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

где  $A$  – активность,  $t$  – время,  $\Delta C_{\text{Hb}}$  – изменение концентрации Hb:

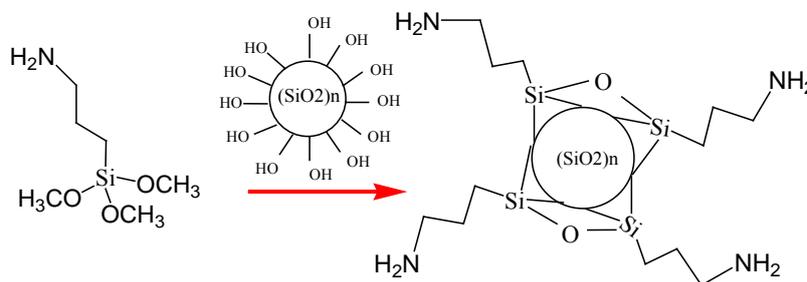
$$\Delta C_{\text{Hb}} = C_{\text{исх(Hb)}} - C_{\text{ост(Hb)}}.$$

В качестве растворов сравнения использовали растворы без Hb.

**2. Обсуждение результатов**

Так как современные методы синтеза частиц  $\text{SiO}_2(\text{NH}_2)_n$  позволяют получать частицы с заданными размерами в очень широком интервале [16], мы выбрали коммерчески доступный прекурсор (LUDOX TM40) – коллоидную суспензию частиц с размерами порядка 10 нм.

Модификация поверхности наночастиц  $\text{SiO}_2$  проведена 3-аминопропилтриметоксисиланом согласно литературной методике [11] по схеме:



Сохранив объемные соотношения приливаемого водного раствора 3-аминопропилтриметоксисилана и коллоидного раствора частиц  $\text{SiO}_2$ , повысили концентрацию модифицируемых коллоидных частиц до 40% вместо 10% по весу.

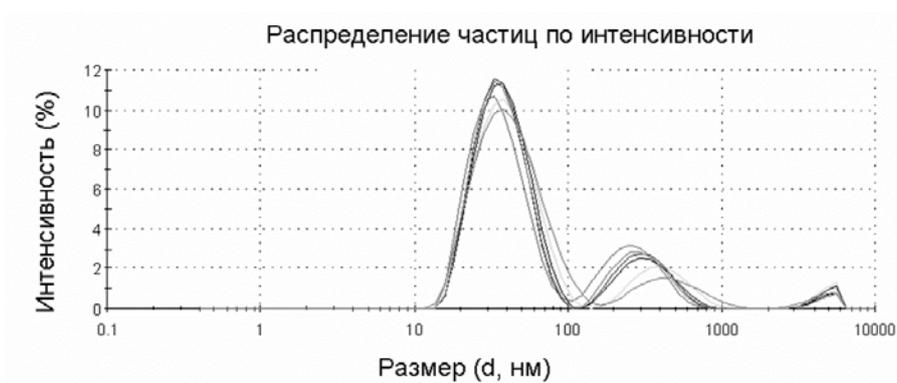


Рис. 1. Распределение по интенсивности частиц, модифицированных 3-аминопропильными фрагментами, диспергированных в воде

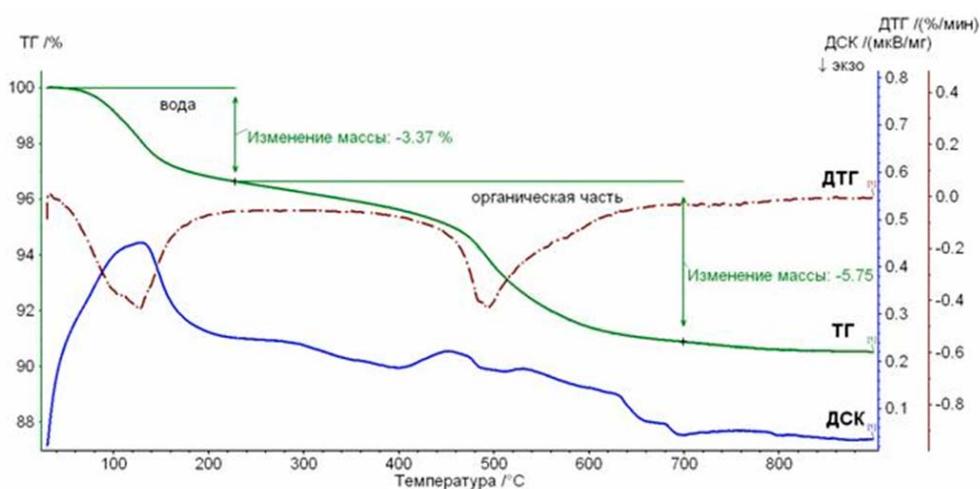


Рис. 2. Данные измерений методом ТГ-ДСК, проведенных для частиц модифицированных 3-аминопропильными группами

Получена коллоидная суспензия модифицированных наночастиц на основе диоксида кремния ( $\text{SiO}_2(\text{NH}_2)_n$ ) и охарактеризована методом динамического светорассеяния. По результатам 6 измерений разбавленной в 10 раз суспензии были построены зависимости распределения размера частиц от интенсивности рассеивания света (рис. 1), объема и количества частиц. Средний размер частиц по интенсивности светорассеяния равен 43.6 нм. Индекс полидисперсности PDI, определенный на основании построенной модели, составил 0.25.

По данным ТГ-ДСК-анализа (рис. 2) разложение частиц происходит в две ступени, первая из которых соответствует удалению молекул растворителя – воды (3.37% по массе) [17], а вторая ступень – разложение органической части, химически привитой к поверхности силикатной частицы (5.75% по массе).

В ИК-спектре  $\text{SiO}_2(\text{NH}_2)_n$  узкая полоса поглощения  $1105 \text{ см}^{-1}$  с плечом  $1177 \text{ см}^{-1}$ , полосы  $786$ ,  $719$  и  $471 \text{ см}^{-1}$  соответствуют деформационным колебаниям Si–O–Si-групп, полоса в области  $1629 \text{ см}^{-1}$  соответствует суперпозиции асимметрических деформационных колебаний  $\text{NH}_3^+$ -группы. Сигнал в области  $1670 \text{ см}^{-1}$

относится к колебаниям адсорбированных молекул воды. Симметрические деформационные колебания  $\text{NH}_3^+$  группы, связанной в виде  $\text{SiO} \cdots \text{H} \cdots \text{NH}_2^+$  проявляются при  $1490 \text{ см}^{-1}$ . Полоса  $960 \text{ см}^{-1}$  соответствует деформационным вращательным колебаниям  $\text{CH}_2$ -группы. Группа сигналов, соответствующих колебаниям  $\text{OH}$ -групп, находится в области  $3000\text{--}3500 \text{ см}^{-1}$ .

**Активность системы протеиназ *Candida albicans* в присутствии аминоксидифицированных силикатных наночастиц.** Биохимическая активность  $\text{SiO}_2(\text{NH}_2)_n$  оценена по отношению к секреторным аспарагиновым протеиназам (SAP) гриба *Candida albicans*: SAP<sub>2</sub> (Protein Date Bank: doi: 10.2210/pdb 1zap/pdb) и SAP<sub>4</sub> (Protein Date Bank: doi: 10.2210/pdb 2qzx/pdb), определяющим высокую патогенную активность грибкового аллергена *Candida albicans* [18].

Система аспарагиновых протеиназ *C. alb.* неразрывно связана с уровнем иммунитета и в настоящее время включает в себя 10 изоферментов, обладающих различными функциями и определяющих локализацию и тяжесть кандидозной инфекции [19, 20]. Основным интересом 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 являющиеся необходимыми для последующей секреции и функционирования протеиназ первой группы. Установлено, что действие каскада протеиназ *Candida* неразрывно связано с работой аналогичной системы протеиназ ВИЧ [21, 22]. По данным УФ-спектрофотометрии определены параметры каталитической активности индуцируемой SAP<sub>2</sub> *C. alb.* в растворе и конститутивной SAP<sub>4</sub>, ковалентно закрепленной на поверхности нитратцеллюлозной мембраны. Субстратом является гемоглобин (табл. 1).

Табл. 1

Оптимальные условия протеолитического действия SAP<sub>2</sub> и SAP<sub>4</sub> по отношению к гемоглобину

Фермент	$c_{\text{SAP}}$	$C_{\text{Hb}}$ , мг/л	pH	$t_{\text{инк}}$ , мин	Активность, мг/л·мин
SAP <sub>2</sub>	$2.26 \cdot 10^{-7}$ моль/л	126	4.26	15	$4.83 \pm 0.20$
SAP <sub>4</sub>	$2.22 \cdot 10^{-7}$ моль/см <sup>2</sup>	126	4.35	25	$0.88 \pm 0.40$

Введение  $\text{SiO}_2(\text{NH}_2)_n$  как в гомогенную систему индуцируемой протеиназы SAP<sub>2</sub>, так и в гетерогенную систему конститутивного фермента SAP<sub>4</sub> приводит к изменению протеолитической активности (табл. 2).

Влияние наноразмерного модулятора зависит от типа фермента и системы:

- на индуцируемую SAP<sub>2</sub> в растворе  $\text{SiO}_2(\text{NH}_2)_n$  модулятор оказывает сильное активирующее действие;
- на иммобилизованную конститутивную SAP<sub>4</sub>  $\text{SiO}_2(\text{NH}_2)_n$  оказывает сильный ингибирующий эффект.

Методом динамического светорассеяния установлены степень полидисперсности (рис. 3) и размеры  $\text{SiO}_2(\text{NH}_2)_n$  (рис. 4) в зависимости от концентрации аминного фрагмента  $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ .

Табл. 2

Каталитическая активность SAP<sub>2</sub> и SAP<sub>4</sub> по отношению к гемоглобину в присутствии и в отсутствие SiO<sub>2</sub>(NH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> в зависимости от концентрации аминного фрагмента -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>

C-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NH <sub>2</sub>	SAP <sub>2</sub>		SAP <sub>4</sub>	
	Активность, мг/л·мин	Эффект	Активность, мг/л·мин	Эффект
0	4.83 ± 0.04		0.88 ± 0.03	
2·10 <sup>-12</sup>	25.00 ± 0.37	A	0	I
5·10 <sup>-12</sup>	26.00 ± 0.52	A	0.27 ± 0.01	I
2·10 <sup>-11</sup>	24.15 ± 0.36	A	0.18 ± 0.01	I
5·10 <sup>-11</sup>	38.27 ± 0.95	A	0	I
1·10 <sup>-10</sup>	20.13 ± 0.30	A	0	I
5·10 <sup>-10</sup>	32.20 ± 0.80	A	0	I
1·10 <sup>-9</sup>	25.36 ± 0.51	A	0	I
5·10 <sup>-9</sup>	36.23 ± 0.91	A	0	I
1·10 <sup>-8</sup>	24.15 ± 0.36	A	0	I
5·10 <sup>-8</sup>	28.18 ± 0.56	A	0	I
1·10 <sup>-7</sup>	25.36 ± 0.51	A	0	I
5·10 <sup>-7</sup>	21.34 ± 0.32	A	0	I
1·10 <sup>-6</sup>	88.55 ± 2.66	A	0	I
5·10 <sup>-6</sup>	24.15 ± 0.36	A	0	I
5·10 <sup>-5</sup>	28.18 ± 0.56	A	0	I

I – ингибирование ферментативной активности, A – активация ферментативной активности.

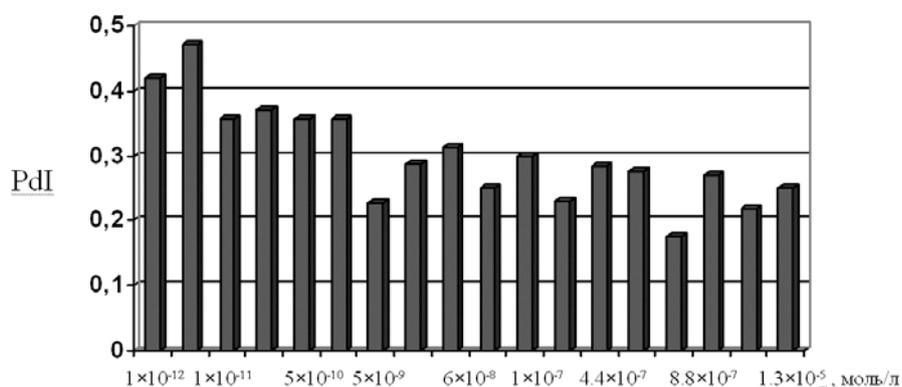


Рис. 3. Диаграмма зависимости коэффициента полидисперсности SiO<sub>2</sub>(NH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> от концентрации аминного фрагмента -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>

Увеличение концентрации наночастиц на основе диоксида кремния в растворе приводит к снижению степени полидисперсности и к уменьшению диаметра наночастиц. Выявлено, что увеличение степени полидисперсности и изменение размера наночастиц не оказывают значительного влияния на силу активирующего эффекта (табл. 3). Однако при концентрации -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>-фрагмента 1·10<sup>-6</sup> моль/л с монодисперсностью системы (PdI 0.18) и размерах наночастиц 102 нм наблюдается значительное усиление активирующего эффекта.

Возможно, это связано с пространственной комплементарностью модулятора к аллостерическому или активному центрам фермента в данных условиях, что и позволяет наблюдать скачкообразный активирующий эффект.



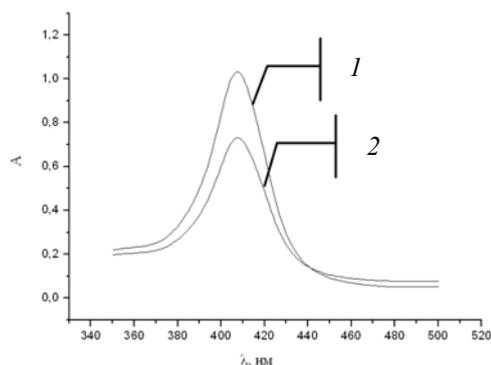


Рис. 5. Электронные спектры поглощения Hb (1), Hb в присутствии  $\text{SiO}_2(\text{NH}_2)_n$  (2)

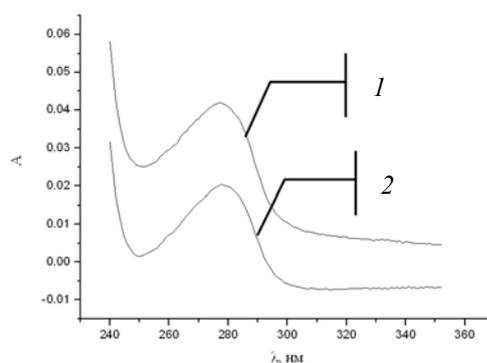


Рис. 6. Электронные спектры поглощения SAP *C. alb.* (1), SAP *C. alb.* в присутствии  $\text{SiO}_2(\text{NH}_2)_n$  (2)

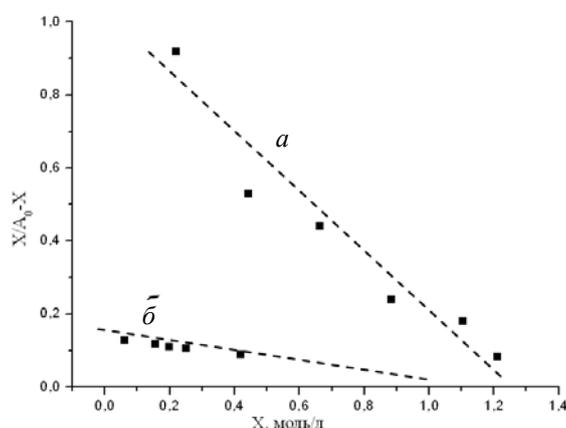


Рис. 7. График Скэтчарда для нахождения констант связывания субстрат – модулятор в системе  $[\text{SAP}_2 - \text{SiO}_2(\text{NH}_2)_n]$  (а) и в системе  $[\text{Hb} - \text{SiO}_2(\text{NH}_2)_n]$  (б)

частицами, имеющими положительный поверхностный заряд  $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_3^+$ , и отрицательно заряженными ионизированными карбоксильными группами аспарагиновой кислоты активного центра или многослойной адсорбцией с участием силикатных наночастиц на поверхности белка за счет электростатического взаимодействия, что приводит к структурным и функциональным изменениям белков системы SAP *C. alb.* – Hb.

#### Активность системы протеиназ *Candida albicans* в присутствии $\text{ZnCl}_2$ .

Введение в раствор, содержащий SAP *C. alb.*, хлорида цинка  $\text{ZnCl}_2$  приводит к гиперхромному эффекту при одинаковых исходных концентрациях  $\text{SAP}_2$  или  $\text{SAP}_4$ . Гиперхромный эффект возрастает при увеличении концентрации  $\text{ZnCl}_2$ .

Рассчитанные на основании данных электронной спектроскопии по методу сдвига равновесий логарифмы значения констант устойчивости и максимальные доли накопления для координационных форм  $[\text{Zn}(\text{II}) - \text{SAP } C. alb.]$  представлены в табл. 4.

Табл. 4

Характеристические параметры координационных систем  $[\text{Zn}(\text{II}) - \text{SAP } C. \text{alb.}]$  в растворе

Комплекс	$\lg \beta$	Состав комплекса	Доля накопления ( $\alpha$ , %)
$[\text{Zn}(\text{II}) - \text{SAP}_2]$	$4.73 \pm 0.20$	1 : 1	$96.4 \pm 0.1$
$[\text{Zn}(\text{II}) - \text{SAP}_4]$	$5.25 \pm 0.04$	1 : 1	$94.1 \pm 0.1$

Табл. 5

Константы аффинности и стехиометрия взаимодействия в системах  $[\text{Zn}(\text{II}) - \text{SAP } C. \text{alb.}]$

Система	Стехиометрия	$K_A$ , моль <sup>-1</sup>
$[\text{Zn}(\text{II}) - \text{SAP}_2]$	1 : 1	$(3.10 \pm 0.2) \cdot 10^6$
$[\text{Zn}(\text{II}) - \text{SAP}_4]$	1 : 1	$(1.10 \pm 0.01) \cdot 10^9$

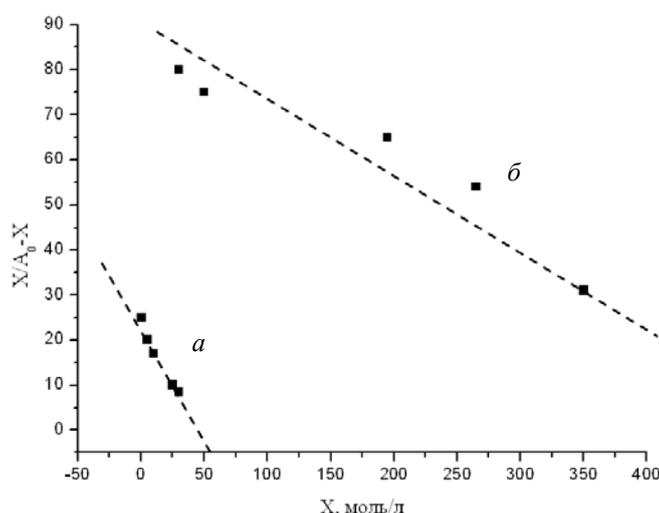
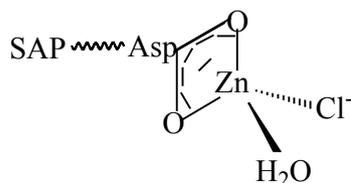


Рис. 8. Графики Скэтчарда для нахождения связывания комплекса  $[\text{Zn}(\text{II}) - \text{SAP}_2 C. \text{alb.}]$ , рабочая концентрация  $\text{ZnCl}_2 \cdot 4 \cdot 10^{-8}$  моль/л (а) и  $[\text{Zn}(\text{II}) - \text{SAP}_4 C. \text{alb.}]$  (б)

Для оценки аффинности связывания  $\text{ZnCl}_2$  с  $\text{SAP } C. \text{alb.}$  использовали экспериментальные данные, представленные в координатах Скэтчарда (рис. 8). Методом Дюрантона [23] определена стехиометрия связывания в системах  $[\text{Zn}(\text{II}) - \text{SAP } C. \text{alb.}]$ . Константы аффинности и стехиометрия взаимодействия в системах  $[\text{Zn}(\text{II}) - \text{SAP } C. \text{alb.}]$  представлены в табл. 5.

Суммируя данные экспериментов по определению констант устойчивости классическим методом сдвига равновесий и данные по константам аффинности и стехиометрии взаимодействия в системах  $[\text{Zn}(\text{II}) - \text{SAP } C. \text{alb.}]$ , полученные с помощью классических биохимических подходов, можно отметить, что  $\text{Zn}(\text{II})$  несомненно образует координационное соединение с  $\text{SAP } C. \text{alb.}$  Отметим, что  $\text{SAP } C. \text{alb.}$  состоит из двух доменов, в центре каждого из которых существуют две последовательности Asp-Thr-Gly (DTG) / Asp-Ser-Gly (DSG), формирующие 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 вторгающимся молекулам субстрата, осуществляя разрыв пептидной связи [18]. При взаимодействии SAP с  $ZnCl_2$  происходит координация иона  $Zn(II)$  с депротонированным при pH 4.5 остатком аспарагиновой кислоты Asp 57, отвечающим за связывание металлов с ферментом, с образованием комплекса 1 : 1. Оставшиеся два места заняты противоионом  $Cl^-$  и растворителем ( $H_2O$ ). Координированный ион  $Zn(II)$  имеет тетраэдрическое окружение:



Оценена активность  $SAP_2$  и  $SAP_4$  *C. alb.* в присутствии  $ZnCl_2$  при различных концентрациях в условиях ферментативного гидролиза (табл. 6).

Табл. 6

Каталитическая активность  $SAP_2$  и  $SAP_4$  по отношению к гемоглобину в присутствии  $ZnCl_2$  ( $c_{Hb} = 2 \cdot 10^{-6}$  моль/л,  $c_{SAP} = 1.91 \cdot 10^{-9}$  моль/л, pH 4.5)

$c_{ZnCl_2}$	$SAP_2$		$SAP_4$	
	Активность, мг/л·мин	Эффект	Активность, мг/л·мин	Эффект
0	$4.83 \pm 0.04$		$0.88 \pm 0.03$	
$1 \cdot 10^{-8}$	$2.54 \pm 0.03$	I	$0.19 \pm 0.01$	I
$5 \cdot 10^{-8}$	$2.9 \pm 0.04$	I	$0.22 \pm 0.02$	I
$1 \cdot 10^{-7}$	$3.02 \pm 0.04$	I	$0.13 \pm 0.01$	I
$5 \cdot 10^{-7}$	$6.44 \pm 0.13$	I	$0.28 \pm 0.02$	I
$1 \cdot 10^{-6}$	$3.86 \pm 0.06$	I	$0.3 \pm 0.02$	I
$5 \cdot 10^{-5}$	$2.5 \pm 0.05$	I	$0.25 \pm 0.02$	I
$1 \cdot 10^{-4}$	$2.37 \pm 0.04$	I	$0.31 \pm 0.02$	I
$5 \cdot 10^{-4}$	$2.4 \pm 0.03$	I	$0.28 \pm 0.02$	I
$1 \cdot 10^{-3}$	$2.84 \pm 0.04$	I	$0.25 \pm 0.01$	I
$5 \cdot 10^{-3}$	$2.52 \pm 0.03$	I	$0.25 \pm 0.01$	I

В диапазоне концентраций  $1 \cdot 10^{-8} \div 1 \cdot 10^{-6}$  и  $1 \cdot 10^{-5} \div 1 \cdot 10^{-2}$  моль/л  $Zn(II)$  проявляет ингибирующее действие с максимальным эффектом при концентрации  $1 \cdot 10^{-7}$  и  $1 \cdot 10^{-2}$  моль/л и активирующее действие при концентрации  $5 \cdot 10^{-7}$  моль/л по отношению к протеиназе  $SAP$  *C. alb.*

Полученные данные свидетельствуют о необратимом характере действия эффекторов на каталитическую активность  $SAP$  *C. alb.*

**Влияние композиции  $ZnCl_2$  и наночастиц на основе диоксида кремния на активность *Candida albicans*.** В табл. 7 представлена каталитическая активность  $SAP_2$  *C. alb.*, находящейся в растворе, и иммобилизованной  $SAP_4$  в присутствии  $SiO_2(NH_2)_n$  с концентрацией  $-(CH_2)_3NH_2$ -фрагмента  $1 \cdot 10^{-7}$  моль/л при различных концентрациях  $ZnCl_2$ . Для ферментов  $SAP_2$ ,  $SAP_4$  в зависимости от концентрации эффектора наблюдаются как эффект ингибирования, так и эффект активации ферментативной активности.

Табл. 7

Протеолитическая активность SAP<sub>2</sub> и SAP<sub>4</sub> *C. alb.* в присутствии SiO<sub>2</sub>(NH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> ( $c_{-(CH_2)_3NH_2} = 1 \cdot 10^{-7}$  моль/л) и ионов Zn(II)

$c_{Zn^{2+}}$	SAP <sub>2</sub>		SAP <sub>4</sub>	
	Активность, мг/л·мин	Эффект	Активность, мг/л·мин	Эффект
0	4.83 ± 0.04		0.88 ± 0.03	
5·10 <sup>-12</sup>	2.39 ± 0.03	I	0.25 ± 0.01	I
5·10 <sup>-11</sup>	1.13 ± 0.01	I	0.76 ± 0.02	I
5·10 <sup>-10</sup>	0.85 ± 0.01	I	0	I
1·10 <sup>-9</sup>	0.88 ± 0.01	I	0.76 ± 0.02	I
5·10 <sup>-9</sup>	0	I	0	I
1·10 <sup>-8</sup>	1.10 ± 0.02	I	0	I
5·10 <sup>-8</sup>	0.98 ± 0.01	I	0	I
1·10 <sup>-7</sup>	0.35 ± 0.01	I	0	I
5·10 <sup>-7</sup>	1.17 ± 0.02	I	0	I
1·10 <sup>-6</sup>	1.48 ± 0.02	I	0	I
5·10 <sup>-6</sup>	0.57 ± 0.01	I	0.25 ± 0.01	I
1·10 <sup>-5</sup>	0	I	0	I
5·10 <sup>-5</sup>	0	I	0	I
1·10 <sup>-4</sup>	0	I	0.25 ± 0.01	I
5·10 <sup>-4</sup>	0	I	0.25 ± 0.01	I
1·10 <sup>-3</sup>	0	I	0.25 ± 0.01	I

Одновременное введение в систему SAP<sub>2</sub> *C. alb.* – Нв ионов Zn(II) и SiO<sub>2</sub>(NH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> приводит к ярко выраженному эффекту ингибирования протеолиза субстрата. Причем действие композиции значительно эффективнее, чем действие отдельных компонентов, и даже позволяет зафиксировать кардинальную смену эффекта активации в присутствии SiO<sub>2</sub>(NH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> или ионов Zn(II) при концентрации 1·10<sup>-7</sup> моль/л на значительный эффект ингибирования.

Действие композиции на систему SAP<sub>4</sub> *C. alb.* – Нв приводит к эффекту полной инактивации иммобилизованного фермента в диапазоне концентраций Zn(II) 5·10<sup>-9</sup> ÷ 1·10<sup>-6</sup> моль/л и к ослаблению эффекта ингибирования в диапазоне концентраций 1·10<sup>-4</sup> ÷ 1·10<sup>-3</sup> моль/л.

Полученный массив и сопоставление данных позволяют утверждать, что эффект подавления каталитической активности присутствует, как правило, при использовании композиции: SiO<sub>2</sub>(NH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> – ZnCl<sub>2</sub>. Несомненно, подобные эффекты связаны с образованием в данной системе полядерного комплекса Zn(II) с наночастицами, с координацией ионов Zn(II) по азоту аминогрупп, закрепленных на поверхности наноразмерной силикатной платформы.

### 3. Выводы

Продемонстрирована потенциальная возможность управления каталитической активностью протеиназ *Candida albicans* различных групп с использованием в качестве модуляторов неорганических наноразмерных частиц и низкомолекулярных соединений металлов. Кооперативное действие двух компонентов системы обусловлено образованием супрамолекулярных комплексов наночастиц на основе диоксида кремния и хлорида цинка с протеиназой *Candida albicans*. Вероятно, образование молекулярного комплекса осуществляется за счет электростатического взаимодействия между отрицательно заряженными группами наночастицы и положительно заряженными группами протеиназы.

тростатического притяжения между отрицательно заряженными остатками аспарагиновой кислоты в активном центре фермента и положительно заряженной поверхностью  $\text{SiO}_2(\text{NH}_2)_n$ , а ионы цинка связываются по специальному центру связывания для ионов металлов (Asp 57). Таким образом, осуществляется кооперативное влияние обоих эффекторов на конформацию фермента, что существенным образом сказывается на изменении каталитической активности ферментов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 09-03-92669-ННФ), программы грантов Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (МК-6390.2010.3) и Министерства образования и науки РФ (№ 16.552.11.7008).

### Summary

*A.R. Mukhametzyanova, M.P. Kutyreva, O.I. Medvedeva, V.I.V. Gorbachuk, L.S. Yakimova, I.I. Stoikov, N.A. Ulakhovich.* Composition Based on Silica Nanoparticles and Zn(II) as a Modulator of Proteinases Activity.

Superficial modification of silica-based nanoparticles ( $\text{SiO}_2(\text{NH}_2)_n$ ) with 3-aminopropyltrimethoxysilane was made. The average size of the particles was 43.6 nm. The index of polydispersity (PDI) was 0.25. Biochemical activity of the system of proteinases *Candida albicans* in the presence of  $\text{SiO}_2(\text{NH}_2)_n$  was estimated. It was established that the introduction of  $\text{SiO}_2(\text{NH}_2)_n$  both in a homogeneous system of inducible proteinase ( $\text{SAP}_2$ ) and a heterogeneous system of constitutive enzyme ( $\text{SAP}_4$ ) leads to a change in the proteolytic activity. The increase in the concentration of  $\text{SiO}_2(\text{NH}_2)_n$  in a solution led to the decrease in the polydispersity and the diameter of nanoparticles. The Scatchard method was used to determine the affinity constants in the systems [ $\text{SAP}_2 - \text{SiO}_2(\text{NH}_2)_n$ ] and [hemoglobin –  $\text{SiO}_2(\text{NH}_2)_n$ ]. Both hemoglobin and  $\text{SAP}_2$  interacted with nanoparticles by one site of the biomolecule:  $K_A$   $8.9 \cdot 10^6 \text{ mol}^{-1}$  and  $7.65 \cdot 10^7 \text{ mol}^{-1}$ , respectively. The logarithms of stability constants were  $4.73 \pm 0.20$  and  $5.25 \pm 0.04$  for coordination forms [ $\text{Zn(II)} - \text{SAP}_2$  *C. alb.*] and [ $\text{Zn(II)} - \text{SAP}_4$  *C. alb.*], respectively. Simultaneous introduction of Zn(II) ions and silica-based nanoparticles in  $\text{SAP}_2$  *C. alb.* – Hb system led to a pronounced effect of inhibition of the substrate proteolysis. The effect of the composition was much stronger than that of its separate components.

**Key words:** amine-modified nanoparticles, secretory aspartic proteinase *Candida albicans*, affinity constants, stability constants.

### Литература

1. *Borg-von Zepelin M., Meyer I., Thomssen R., Würzner R., Sanglard D., Telenti A., Monod M.* HIV-Protease inhibitors reduce cell adherence of *Candida albicans* strains by inhibition of yeast secreted aspartic proteases // *J. Invest. Dermatol.* – 1999. – V. 113, No 5. – P. 747–751.
2. *Медянцева Э.П., Вертлиб М.Г., Будников Г.К.* Ионы металлов как эффекторы ферментов // *Усп. химии.* – 1998. – Т. 67, № 3. – С. 252–260.
3. *Баскова И.П., Завалова Л.Л.* Ингибиторы протеолитических ферментов медицинской пиявки (*Hirudo medicinalis*) // *Биохимия.* – 2001. – Т. 66, Вып. 7. – С. 869–883.
4. *Крупяно В.И.* Распределение ингибирующей активности среди катионов двухвалентных металлов // *Биохимия.* – 1988. – Т. 53, Вып. 6. – С. 905–911.

5. Williams R.J.P. My past and a future role for inorganic biochemistry // J. Inorgan. Biochem. – 2006. – V. 100, No 12. – P. 1908–1924.
6. Shaller M., Januschke E., Schackert C., Woerle B., Korting H.C. Different isoforms of secreted aspartyl proteinases (Sap) are expressed by *Candida albicans* during oral and cutaneous candidosis *in vivo* // J. Med. Microbiol. – 2001. – V. 50, No 8. – P. 743–747.
7. Gao G., Yan D. Hyperbranched polymers: from synthesis to applications // Prog. Polym. Sci. – 2004. – V. 29, No 3. – P. 183–275.
8. Smith J.E., Wang L., Tan W. Bioconjugated silica-coated nanoparticles for bioseparation and bioanalysis // Trends Anal. Chem. – 2006. – V. 25, No 9. – P. 848–855.
9. Vertegel A.A., Siegel R.W., Dordick J.S. Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme // Langmuir. – 2004. – V. 20, No 16. – P. 6800–6807.
10. Reul R., Nguen J., Kissel T. Amine-modified hyperbranched polyesters as non-toxic, biodegradable gene delivery systems // Biomaterials. – 2009. – V. 30, No 29. – P. 5815–5824.
11. Pham K.N., Fullston D., Sagoe-Crengs K. Surface modification for stability of nano-sized silica colloids // J. Colloid Interface Sci. – 2007. – V. 315, No 1. – P. 123–127.
12. White T.C., Miyasaki S.H., Agabian N. Three distinct secreted aspartyl proteinases in *Candida albicans* // J. Bacteriol. – 1993. – V. 175, No 19. – P. 6126–6133.
13. Borg-von Zepelin M., Beggah S., Boggian K., Sanglard D., Monod M. The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages // Mol. Microbiol. – 1998. – V. 28, No 3. – P. 543–554.
14. Методы экспериментальной микологии: Справ. – Киев: Наукова думка, 1982. – 340 с.
15. Кутырева М.П., Медянцева Э.П., Халдеева Е.В., Глушко Н.И., Будников Г.К. Определение антигена *Candida albicans* с помощью амперометрического иммуноферментного сенсора // Вопр. мед. химии. – 1998. – Т. 44, Вып. 2. – С. 172–178.
16. Davies G.-L., Barry A., Gun'ko Yu.K. Preparation and size optimisation of silica nanoparticles using statistical analyses // Chem. Phys. Lett. – 2009. – V. 468. – P. 239–244.
17. Gellermann C., Storch W., Wolter H. Synthesis and characterization of the organic surface modifications of monodisperse colloidal silica // J. Sol-Gel Sci. Technol. – 1997. – V. 8, No 1–3. – P. 173–176.
18. Abad-Zapatero C., Goldman R., Muchmore S.W., Hutchins C., Stewart J., Navaza J., Payne C.D., Ray T.L. Structure of a secreted aspartic protease from *C. albicans* with a potent inhibitor: Implications for the design of antifungal agents // Protein Sci. – 1996. – V. 5, No 4. – P. 640–652.
19. Лисовская С.А., Глушко Н.И., Халдеева Е.В., Кутырева М.П., Фассахов Р.С. Сопоставление некоторых факторов вирулентности клинических штаммов *Candida albicans* // Микол. фитопат. – 2008. – Т. 42, № 5. – С. 475–480.
20. Галимзанова Р.Р., Кутырева М.П. Соединения на основе цинка и марганца, как модуляторы патогенной активности грибкового аллергена *Candida albicans* // Усп. мед. микологии. – 2006. – Т. 7. – С. 6–7.
21. Кутырева М.П., Галимзанова Р.Р., Улахович Н.А., Глушко Н.И. Влияние ионов Zn(II) и Mn(II) на каталитическую активность индуцируемой протеиназы *Candida albicans* // Биомед. химия. – 2007. – Т. 53, Вып. 1. – С. 72–85.
22. Галимзанова Р.Р., Кутырева М.П., Улахович Н.А., Глушко Н.И., Иванова А.А., Черкасов Р.А., Забиров Н.Г. Координационные соединения индуцируемой протеиназы *Candida albicans* с катионами d-металлов как регуляторы ферментативной активности // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2006. – Т. 148, кн. 4. – С. 56–67.

23. *Durantou J., Adam C., Bieth J.G.* Kinetic mechanism of the inhibition of cathepsin G by alpha 1-antichymotrypsin and alpha 1-proteinase inhibitor // *Biochemistry.* – 1998. – V. 37, No 32. – P. 11239–11245.

Поступила в редакцию  
10.06.11

---

**Мухаметзянова Алсу Ринатовна** – аспирант кафедры неорганической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: [alsumuhametz@mail.ru](mailto:alsumuhametz@mail.ru)

**Кутырева Марианна Петровна** – кандидат химических наук, доцент кафедры неорганической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: [mkutyreva@mail.ru](mailto:mkutyreva@mail.ru)

**Медведева Ольга Игоревна** – студент Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета.

**Горбачук Владимир Валерьевич** – младший научный сотрудник, аспирант кафедры неорганической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета.

**Якимова Людмила Сергеевна** – кандидат химических наук, старший научный сотрудник кафедры органической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета.

**Стойков Иван Иванович** – доктор химических наук, профессор кафедры органической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета.

**Улахович Николай Алексеевич** – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой неорганической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета.