

Биохимическая активность силикатных частиц, модифицированных аминогруппами, по отношению к системе индуцируемая протеиназа *Candida albicans* - гемоглобин

Галаутдинова Диана, г.Казань

Направление конкурса: Использование наноматериалов для борьбы с болезнетворными (вредными) грибами, бактериями, вирусами и т.д.

По данным медицинской статистики 95% кандидозов вызвано культурой *Candida albicans*. Высокая патогенная активность *C.alb.* связана с функционированием каскада из десяти секреторных аспарагиновых протеиназ (SAP *C.alb.*), определяющих локализацию и тяжесть кандидиинфекции.

Проблема управления функционирования всей системы SAP *C.alb.*, изучение механизмов подавления ферментативной активности непосредственно связана с улучшением качества жизни человека и является **актуальной и практически значимой**.

Силикатные структуры привлекают внимание исследователей отсутствием токсичности и высокой химической и физической стабильностью. Химическое

модифицирование поверхности данных соединений позволяет получить широкий круг гибридных материалов. В результате, наноразмерные гибридные коллоидные частицы могут найти применение в наномедицине в качестве диагностических систем, лекарственных препаратов нового поколения и их транспортных средств.

Целью настоящей работы является создание активного вещества для антикандидозного препарата нового поколения на основе силикатных наночастиц

Модификация поверхности силикатных частиц аминопропилтриметоксисиланом позволяет получить наноразмерные координационно активные наночастицы $\{SiO_2\}OSi(OCH_3)-(CH_2)_3NH_2$, способные к эффективному образованию системы водородных связей и осуществлять высокоспецифичное распознавание субстрата.

Количество органических фрагментов $-(CH_2)_3NH_2$ на поверхности силикатных частиц оценено с помощью метода совмещенной термогравиметрии (ТГ) и дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) в динамической атмосфере аргона и составило 1.89×10^{-3} моль/мл. Методом УФ- спектрофотометрии оценено взаимодействие $\{SiO_2\}OSi(OCH_3)-(CH_2)_3NH_2$ с индуцируемой протеиназой *C.alb.* и ее специфическим субстратом- гемоглобином. По данным электронных спектров поглощения выявлено, что в диапазоне концентраций органического фрагмента 2.21×10^{-12} – 2.21×10^{-11} моль/мл, 1.1×10^{-7} моль/мл и выше наблюдается эффект активации фермента в 3-9 раз. Эффект ингибирования сильный (100%), но носит точечный характер и наблюдается при содержании $-(CH_2)_3NH_2$ 2.21×10^{-8} моль/мл.

Таким образом, силикатные наночастицы проявляют активность по отношению к системе индуцируемая протеиназа *C.alb.* – гемоглобин и могут быть использованы для разработки новых лекарственных препаратов.

МИШЕНЬ: микозы *Candida albicans*

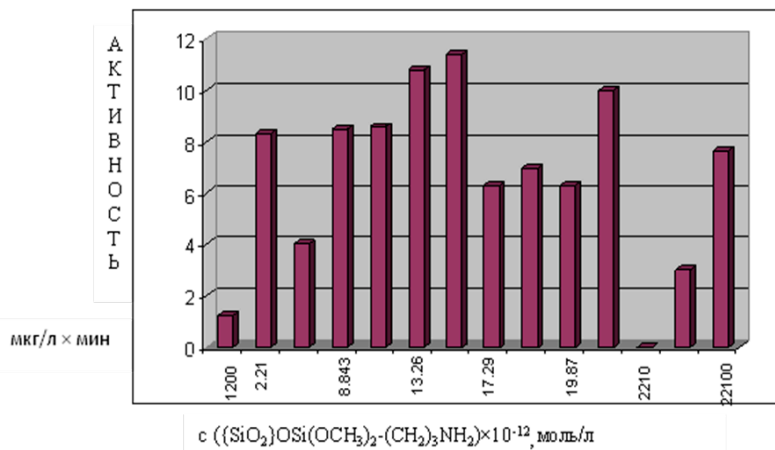


Диаграмма зависимости протеолитической активности SAP *C.alb.* от концентрации $\{SiO_2\}OSi(OCH_3)_2-(CH_2)_3NH_2$

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1. Постановка задачи	4
1.1. Аппаратура, объекты исследования и условия эксперимента	5
1.2. Обработка данных	7
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	8
2. Биохимическая активность силикатных частиц, модифицированных аминокетонами, по отношению к системе индуцируемая протеиназа <i>Candida albicans</i> - гемоглобин	8
2.1. Оптимальные условия и параметры каталитической активности индуцируемой протеиназы <i>Candida albicans</i> по отношению к гемоглобину	8
2.2. Биохимическая активность силикатных частиц, модифицированных аминокетонами, по отношению к индуцируемой протеиназе <i>Candida albicans</i> и гемоглобину	10
2.3. Влияние аминомодифицированных силикатных наночастиц на каталитическую активность индуцируемой протеиназы <i>Candida albicans</i>	11
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	13
Список литературы	14

ВВЕДЕНИЕ

Система аспарагиновых протеиназ *Candida albicans*, неразрывно связана с уровнем иммунитета и, в настоящее время, включает в себя десять изоферментов, обладающих различными функциями и определяющих локализацию и тяжесть микозов. Управление ферментативной активностью с использованием модуляторов – одно из основных направлений исследований биоспецифических реакций в современной биомедицинской химии. Следует отметить, что использование в качестве модуляторов каталитической активности протеиназы *Candida albicans* модифицированных наноразмерных частиц открывает перспективы в разработке лекарственных препаратов нового поколения и позволит оптимизировать существующие к настоящему времени методики лечения микозов *Candida*.

1. Постановка задачи

По данным медицинской статистики до 50 % грибковых заболеваний связано с патогенной активностью дрожжеподобных грибов рода *Candida*, причем 95% кандидозов вызвано культурой *Candida albicans*. Высокая патогенная активность грибкового аллергена *Candida albicans* (*C.alb.*) непосредственно связана с количеством и многообразием функций вырабатываемых им секреторных аспарагиновых протеиназ (SAP *C.alb.*) [1]. Система аспарагиновых протеиназ *C.alb.* неразрывно связана с уровнем иммунитета и в настоящее время включает в себя десять изоферментов, обладающих различными функциями и определяющих локализацию и тяжесть кандидиинфекции [1-3]. 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 являющиеся необходимыми для последующей секреции и функционирования протеиназ первой группы. Однако вся система протеиназ *C.alb.* в современных источниках представлена только клиническими и биологическими показателями. Определено, что в их функции помимо усвоения азота, входит разрушение или деформация клеточных мембран, деградация поверхностных молекул, усиление адгезии клеток *C.alb.*, разрушение клеток и молекул иммунной системы и белков крови [1]. Установлено, что действие каскада протеиназ *Candida* неразрывно связано с работой аналогичной системы протеиназ ВИЧ [4,5]. Возможность мутации ДНК ферментов с последующим приспособлением к меняющемуся окружению и индивидуальным особенностям организма обозначают систему протеиназ *C.alb.* как одну из наиболее опасных и патогенно активных субстанций. Установлено, что патогенная флора *C.alb.* успешно существует как в биологических субстанциях, так и на неорганических, полимерных и металлических материалах. Таким образом, проблема управления функционирования всей системы SAP *C.alb.*, изучение возможных путей и механизмов подавления ферментативной активности непосредственно связана с улучшением качества жизни человека и является **актуальной и практически значимой**.

Эволюция антикандидозных препаратов представлена несколькими семействами фармацевтических средств: производными амидов и аллиламинов («Нитрофунгин»), имидазольными препаратами («Оксиконазол», «Миконазол», «Клотримазол») [6, 7] и наиболее широко распространенными на сегодняшний день производными триазола («Дифлюкан», «Флюкостат», «Флуконазол») [8]. Механизм действия этих препаратов состоит в угнетении только компонентов клеточной стенки патогенных грибов рода *C.albicans* и никаким образом не затрагивает обширную ферментативную систему гриба. К сожалению, все эти препараты обладают высокой токсичностью. А эффективность их действия зависит от индивидуальной чувствительности организма к активным компонентам и иммунного статуса человека. Последние исследования показывают, что только один из десяти современных препаратов активен по отношению к SAP *C.alb.* Таким образом, создание новых и эффективных антикандидозных препаратов необходимо и, несомненно, будет **востребовано** на фармацевтическом рынке как компаниями - производителями антимикотических препаратов и их дистрибьюторами, а так же потребителями розничной сети, в том числе стационарными больничными учреждениями, в которых должен быть обеспечен контроль за внутривенными инфекциями.

Научная новизна состоит в том, что в качестве неотъемлемой части действующих веществ разрабатываемых препаратов должны присутствовать соединения, подавляющие каталитическую активность протеиназ *Candida* индуцируемого и конститутивного типа. В настоящее время в качестве ингибиторов аспарагиновой протеиназы *C.albicans* известны природные соединения ацетилпепстатин и пепстатин А и некоторые их синтетические

аналоги IC50 и A70 450 - амин 2-[3-бензил-4-п-(4-метилпиперазин-1-ил-карбонил)2-кетопиперазин-1-ил]-гексановой кислоты [9]. Существенным недостатком этих соединений является то, что они угнетают активность всех протеолитических ферментов, в том числе и жизненно необходимых. Весьма отрывочная информация, без упоминания количественных характеристик указывает на ингибирующее действие цистеина и мочевины или классических ингибиторов протеиназ ВИЧ [4,5].

Поэтому выявление новых соединений - модуляторов каталитической активности именно протеиназ *C.alb.* позволит управлять первопричиной патогенности культуры *Candida* и приведет к разработке антикандидозного лекарственного препарата на основе наномодуляторов с принципиально новой и более эффективной схемой действия.

В этом плане весьма полезными могут казаться сверхразветвленные макромолекулярные соединения, в частности модифицированные силикатные частицы.

Силикатные структуры привлекают внимание исследователей отсутствием токсичности и высокой химической и физической стабильностью [10]. Кроме того, для них показана возможность распознавания биологически важных субстратов [11]. Частицы, модифицированные функциональными группами, способными к образованию водородных связей с биологически важными молекулами. Наноразмерные гибридные коллоидные частицы могут найти практическое применение в наномедицине в качестве диагностических систем, лекарственных препаратов нового поколения и их транспортных средств [10]. Для применения данных систем *in vivo* важными показателями являются гено- и цитотоксичность, которые в случае силикатных коллоидных частиц имеют низкие значения.

Целью настоящей работы является создание активного вещества для антикандидозного препарата нового поколения на основе силикатных наночастиц

В работе были поставлены следующие **задачи**:

- Методом УФ – спектрофотометрии изучить взаимодействие индуцируемой протеиназы *C.alb.* с гемоглобином.
- Оценить афинность взаимодействия аминомодифицированных силикатных наночастиц с индуцируемой протеиназой *C.alb.* и с гемоглобином.
- Изучить влияние аминомодифицированных силикатных частиц на каталитическую активность протеиназы *C.alb.* по отношению к гемоглобину, рассчитать значения ферментативной активности.

1.1. Аппаратура, объекты исследования и условия эксперимента

В работе использовали индуцируемую секреторную аспарагиновую протеиназу *C.alb.* (*SAP C.alb.*), выделенную из надосадочной жидкости при выращивании патогенной дрожжеподобной грибковой культуры *Candida albicans*, с последующим центрифугированием биомассы и пересадкой этанолом по оригинальной методике, разработанной в лаборатории по разработке грибковых аллергенов Казанского НИИ эпидемиологии и микробиологии. Исходный антиген *C.alb.* получен центрифугированием биомассы гриба *C.alb.*, выращенного в течение 48 часов 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 *SAR C. alb.* в разведении 1:10 составила 6.79×10^{-7} моль/л.

Модифицированные силикатные частицы на основе коммерчески доступного прекурсора (LUDOX TM40) - коллоидной суспензии частиц с размерами порядка 10 нм предоставлены д.х.н., профессором кафедры органической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета Стойковым И.И. Модификация поверхности частиц аминопропилтриметоксисиланом позволяет получить наноразмерные активные наночастицы $\{\text{SiO}_2\}\text{OSi}(\text{OCH}_3)_2-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, способные к эффективному образованию системы водородных связей и осуществлять высокоспецифичное распознавание субстрата. Количество органических фрагментов - $(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ на поверхности силикатных частиц было оценено с помощью метода совмещенной термогравиметрии (ТГ) и дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) в динамической атмосфере аргона и составило 1.89×10^{-3} моль/мл.

В качестве субстрата использовали бычий гемоглобин (Hb) марки «АГАТ-МЕД». Растворы Hb получали методом последовательного разбавления и хранили при температуре $+5^{\circ}\text{C}$ не более суток. Исходная концентрация Hb составила 3.83×10^{-5} моль/л. В работе использовали буферные растворы с pH=1.08 – 8.00, приготовленные из фиксанальных растворов или по стандартным методикам из реактивов марки ч.д.а.

Электронные спектры поглощения снимали на спектрофотометре Lambda 35 (Perkin Elmer, UK) в области длин волн 190-900 нм, при $T=36 \pm 0.01^{\circ}\text{C}$ с использованием термостатирующей системы, включающей термостатируемый держатель кювет, проточный термостат Julabo MB-5A и термостаты Пельте RTP-1. Для измерения использовали кварцевые кюветы, толщина которых равна 1см. Точность измерения оптической плотности (A) составляла $\pm 1\%$. Молярные коэффициенты экстинкции растворов (ϵ) при нескольких длинах волн (λ) рассчитывались по соотношению

$$\epsilon_i = (A - A_0) / (c_L l) \quad (1),$$

где A и A_0 – оптические плотности раствора растворителя в присутствии и в отсутствие реагентов, соответственно, а c_L – концентрация изучаемого реагента.



УФ - спектрофотометр Lambda 35

Измерения pH проводились при $T=25 \pm 0.05^{\circ}\text{C}$ на pH метре - pH 150 M, точность определения pH составила 0,01 логарифмической единицы.

1.2. Обработка данных

Определение протеолитической активности

Активность фермента (A) определяли в стандартных условиях по увеличению скорости каталитической реакции по сравнению с некаталитической. Скорость реакции указывали как изменение концентрации субстрата (мкг/л) за единицу времени (мин).

При определении каталитической активности протеиназы *SAP C.alb.* в растворе, в мерную колбу на 3 мл вводили 0.16 мл раствора гемоглобина (Hb) ($M_r=63000$ Да) с концентрацией 3.83×10^{-5} моль/л (c_{Hb} в рабочем растворе – 2.16×10^{-6} моль/л или 126×10^3 мкг/л); 0.1 мл *SAP C.alb.* с концентрацией в исследуемом растворе 6.79×10^{-7} моль/л. Доводили до метки буферным раствором с $pH=4.26$. Раствор перемешивали и переносили в кварцевую спектрофотометрическую кювету. После инкубирования в течение 5 минут при $T=36^\circ C$ регистрировали электронный спектр поглощения полученного раствора в области длин волн 190-900 нм и измеряли интенсивность полосы поглощения при длине волны $\lambda=407$ нм.

Оставшуюся после взаимодействия с протеазой *SAP C.alb.* в растворе, концентрацию Hb, определяли по градуировочному графику зависимости величины поглощения от концентрации гемоглобина описываемого уравнением 2, в качестве растворов сравнения использовали растворы без Hb.

$$Y = (0.11 \pm 0.07) + (421940.81 \pm 21356.27) \times c_{Hb} \quad R=0.99366 \quad (2)$$

Активность фермента определяли по формуле 2.

$$A = \frac{\Delta C_{Hb}}{t}, \quad (3)$$

где A – активность, t – время,

$$\Delta \tilde{N}_{Hb} = \tilde{N}_{\epsilon \tilde{n} \delta}(Hb) - \tilde{N}_{i \tilde{n} \delta}(Hb)$$

Определение констант связывания (метод Скэтчарда)

Оценка величин констант связывания (K_A) и количества участков специфического взаимодействия модулятора ($\{SiO_2\}OSi(OCH_3)_2-(CH_2)_3NH_2$) с *SAP C.alb.* или с субстратом (Hb) в растворе проводилась с представлением данных в координатах Скэтчарда [12,13]. K_A можно представить в следующем виде:

$$K_A = \frac{X}{(A_0 - X)(B_0 - X)} \quad \text{или} \quad \frac{X}{(A - X)} = K_A B_0 - K_A X \quad (4)$$

где X – равновесная концентрация комплекса фермент – модулятор,

A_0 – общая концентрация модулятора в системе,

B_0 – рабочая концентрация модулятора в системе,

$X/(A_0 - X)$ – отношение концентраций связанного и свободного модулятора.

Для построения зависимости $X/(A_0 - X)$ от X , известную как график Скэтчарда, оценивали равновесную концентрацию комплекса модулятор– фермент (или модулятор– субстрат), при постоянной концентрации фермента (субстрата). Концентрацию связавшегося в комплекс модулятора находили по разности между их исходными и оставшимися в растворе концентрациями. Рабочая область концентраций ($\{SiO_2\}OSi(OCH_3)_2-(CH_2)_3NH_2$) из расчета на органический фрагмент $-(CH_2)_3NH_2$ составила 2.21×10^{-12} – 2.21×10^{-6} моль/л.

Полученные данные использованы для построения графиков в координатах Скэтчарда.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

2. Биохимическая активность силикатных частиц, модифицированных аминокетонами, по отношению к системе индуцируемая протеиназа *Candida albicans* – гемоглобин

2.1. Оптимальные условия и параметры каталитической активности индуцируемой протеиназы *Candida albicans* по отношению к гемоглобину

Патогенность грибкового аллергена *C.alb.* в наибольшей степени обусловлена каталитической активностью индуцируемой секреторной аспарагиновой протеиназы *C.alb.* (*SAP C.alb.*). В структуре *SAP C.alb.* присутствует 3 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) [1,72].
2. *Центр связывания с d-металлами* - Asp 57, отвечающего за связывание фермента с металлом [9];
3. *Конформационный центр фермента*, сформированный Tyr 84 и Asp 85.

Жестко зафиксированные в каждом из десяти изоферментов остатки цистеина Cys 45 и Cys 56 вовлечены в поддержание третичной структуры фермента.

Определены параметры каталитической активности *SAP C.alb.* в растворе. Каталитическую активность *SAP C. alb.* оценивали по уменьшению концентрации субстрата - гемоглобина (Hb), в присутствии фермента. Для этого измеряли оптическую плотность растворов Hb в присутствии *SAP C. alb.* при $\lambda = 407$ нм. В контрольном опыте измеряли оптическую плотность растворов Hb в той же концентрации, но без фермента. Величина собственного поглощения *SAP C.alb.* в растворе учитывалась в базовой линии. Введение в раствор Hb протеазы *SAP C.alb.* приводит к уменьшению величины оптической плотности при $\lambda = 407$ нм, соответствующей поглощению Hb (Рис. 1).

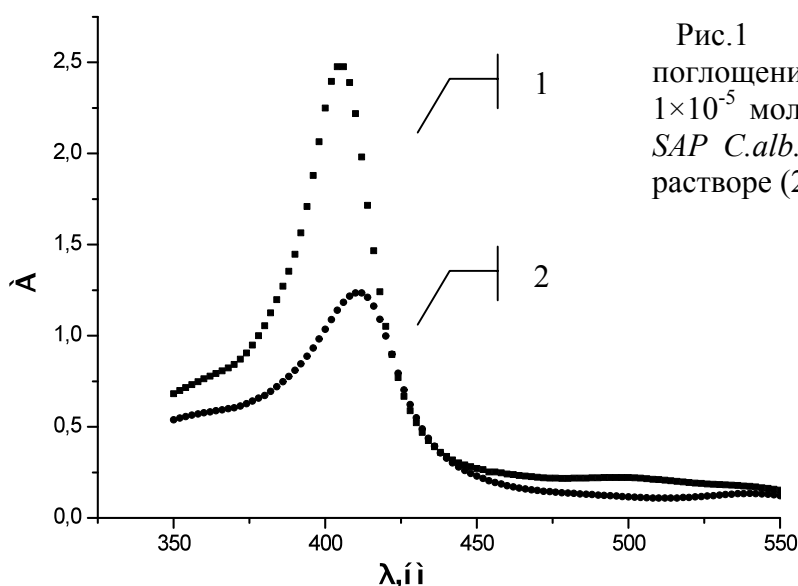


Рис.1 Электронные спектры поглощения Hb в концентрации 1×10^{-5} моль/л (1), Hb в присутствии *SAP C.alb.* $C_{SAP} = 1.83 \times 10^{-6}$ моль/л, в растворе (2), (pH=4.26)

В результате ферментативного протеолиза Нв подвергается ферментативному гидролизу и разрушается до аминокислот или пептидов. Уменьшение общей концентрации Нв приводит к снижению величины оптической плотности при 407 нм. Оставшуюся после ферментативного гидролиза концентрацию субстрата рассчитывали по градуировочному графику 2.

Выбор оптимальных условий (концентрации реагентов, рН, времени ферментативного гидролиза) проявления ферментативной активности для каждого из полученных ферментов является необходимым этапом данного исследования.

Графики зависимости скорости ферментативной реакции гидролиза Нв в присутствии *SAP* от рН представлены на рис.2 и имеют колоколообразную форму, обусловленную наличием двух ионогенных группировок в активном центре фермента. На кривых зависимости ферментативной активности протеиназы от рН наблюдается один максимум в области рН = 3.9-4.3, что соответствует области значения рК аспарагиновой кислоты (3.95) [14].

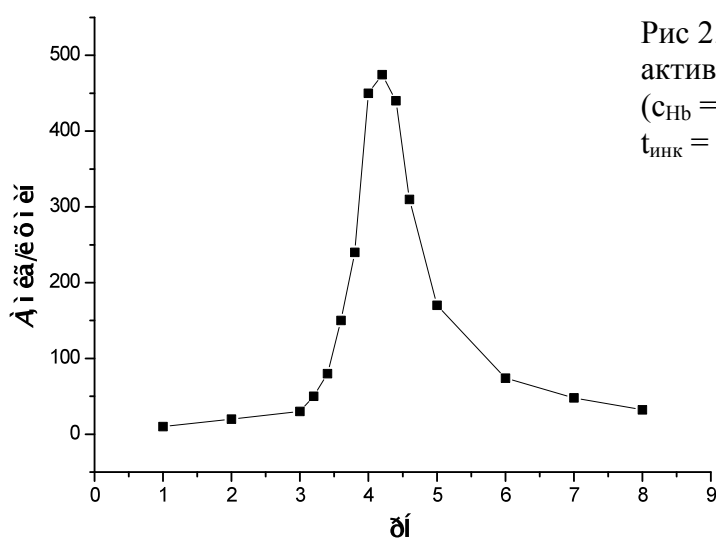


Рис 2. Зависимость каталитической активности *SAP* от рН раствора ($c_{\text{Нв}} = 126 \times 10^3$ мкг/л, $c_{\text{SAP}} = 3.7 \times 10^7$ моль/л, $t_{\text{инк}} = 15$ мин).

Зависимость каталитической активности фермента от времени представлена на рис.3

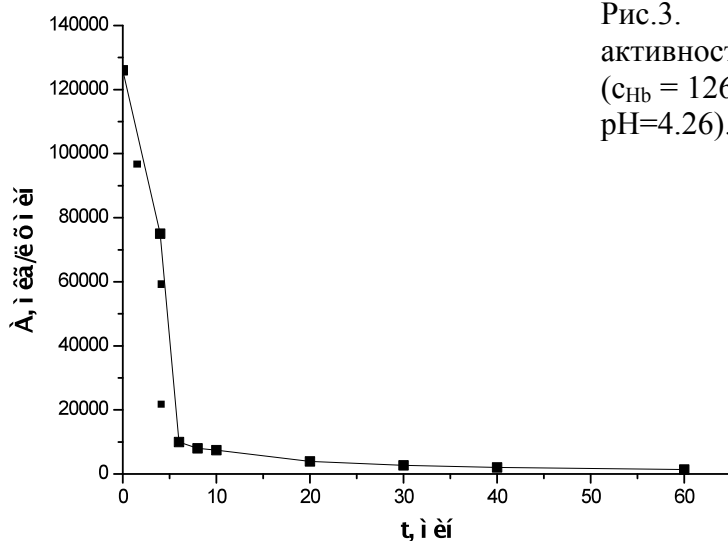


Рис.3. Зависимость каталитической активности *SAP* от времени инкубации ($c_{\text{Нв}} = 126 \times 10^3$ мкг/л, $c_{\text{SAP}} = 3.7 \times 10^7$ моль/л, рН=4.26).

Оптимальные условия, в которых фермент *SAP* проявляет максимальную протеолитическую активность по отношению к субстрату Нв представлены в табл. 1.

Оптимальные условия протеолитического действия *SAP* по отношению к гемоглобину

Фермент	c_{SAP}	C_S , моль/л	pH	$t_{инк}$, мин	Активность, моль/л×мин
SAP <i>C.alb.</i>	6.79×10^{-7} моль/л	2.16×10^{-6}	4.26	5	1.2×10^{-8}

2.2. Биохимическая активность силикатных частиц, модифицированных аминогруппами, по отношению к индуцируемой протеиназе *Candida albicans* и гемоглобину

Отсутствие токсичности и лёгкость получения коллоидных силикатных частиц 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 [10]. Одна из важнейших стадий при создании потенциальных комплексообразователей – изучение их комплексообразующих свойств, в частности с различными субстратами- биомолекулами.

В данной работе в качестве модулятора активности SAP *C.alb.* предлагаются силикатные частицы на основе коммерчески доступного прекурсора (LUDOX TM40) - коллоидной суспензии частиц с размерами порядка 10 нм. Модификация поверхности частиц аминопропилтриметоксисиланом позволяет получить наноразмерные координационно активные наночастицы $\{SiO_2\}OSi(OCH_3)-(CH_2)_3NH_2$, способные к эффективному образованию системы водородных связей и осуществлять высокоспецифичное распознавание субстрата.

Методом УФ- спектрофотометрии оценено взаимодействие аминомодифицированных силикатных частиц с индуцируемой протеиназой *C.alb.* и специфическим субстратом- гемоглобином. По данным электронных спектров поглощения установлено, что и индуцируемая протеиназа *C.alb.* и гемоглобин связываются с аминомодифицированными силикатными частицами. На данный факт указывает уменьшение интенсивности поглощения характеристических полос Hb (407нм) и SAP *C.alb.* (278 нм) (см. рис. 4 а, б)

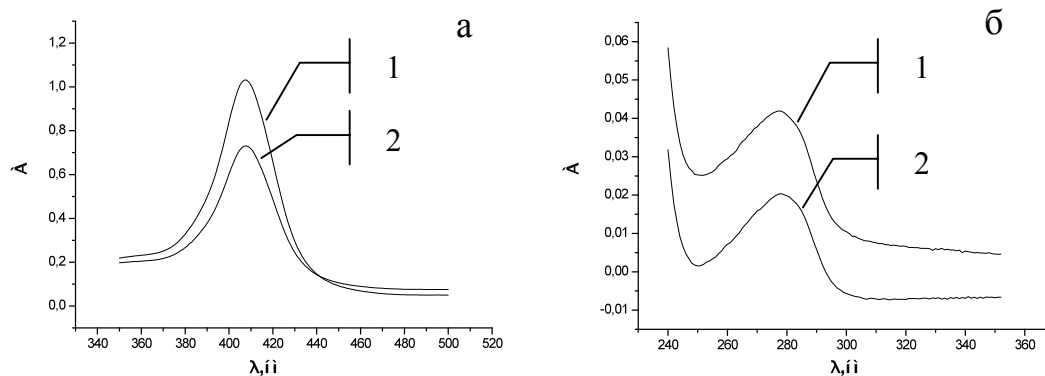


Рис.4 (а) Электронные спектры поглощения Hb (1), Hb в присутствии $\{SiO_2\}OSi(OCH_3)-(CH_2)_3NH_2$ (2); (б) Электронные спектры поглощения SAP *C.alb.*(1), SAP *C.alb.* в присутствии $\{SiO_2\}OSi(OCH_3)-(CH_2)_3NH_2$ (2)

Взаимодействие наночастиц $\{\text{SiO}_2\}\text{OSi}(\text{OCH}_3)_2-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, возможно осуществляется за счёт электростатических взаимодействий и посредством образования системы водородных связей.

Данные электронных спектров поглощения использованы для построения графика в координатах Скэтчарда (рис 5) и расчета константы аффинности специфических взаимодействий.

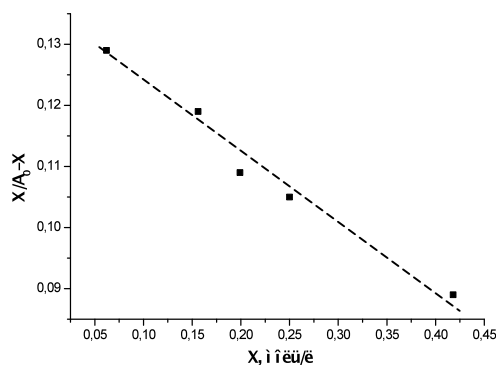


Рис.5. Графики Скэтчарда для нахождения констант связывания субстрат – модулятор в системе $[\text{Hb} - \{\text{SiO}_2\}\text{OSi}(\text{OCH}_3)_2-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2]$

Установлено, что в молекуле гемоглобина взаимодействие с силикатными наночастицами происходит по одному участку биомолекулы, $K_A = 8.9 \times 10^6 (\text{моль/л})^{-1}$

Следует отметить, что наночастицы $\{\text{SiO}_2\}\text{OSi}(\text{OCH}_3)_2-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ связываются с гемоглобином только при концентрации $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ фрагмента $1.00 \times 10^{-8} - 2.21 \times 10^{-7}$ моль/мл. При понижении концентрации аминомодифицированных силикатных частиц связывание с гемоглобином отсутствует. Связывание $\{\text{SiO}_2\}\text{OSi}(\text{OCH}_3)_2-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ с протеиназой происходит в узком диапазоне исследуемых концентраций модулятора.

2.3. Влияние аминомодифицированных силикатных наночастиц на каталитическую активность индуцируемой протеиназы *Candida albicans*

Установлено, что присутствие аминомодифицированных силикатных частиц в различных концентрациях фрагмента $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ оказывает влияние на протеолитическую активность *SAP C.alb.* по отношению к Hb. В диаграмме (рис.6) представлена каталитическая активность индуцируемой *SAP C.alb.* в растворе в присутствии $\{\text{SiO}_2\}\text{OSi}(\text{OCH}_3)_2-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, в диапазоне концентраций органического фрагмента $2.21 \times 10^{-12} - 2.21 \times 10^{-7}$ моль/мл в оптимальных условиях ферментативного гидролиза, определенных ранее.

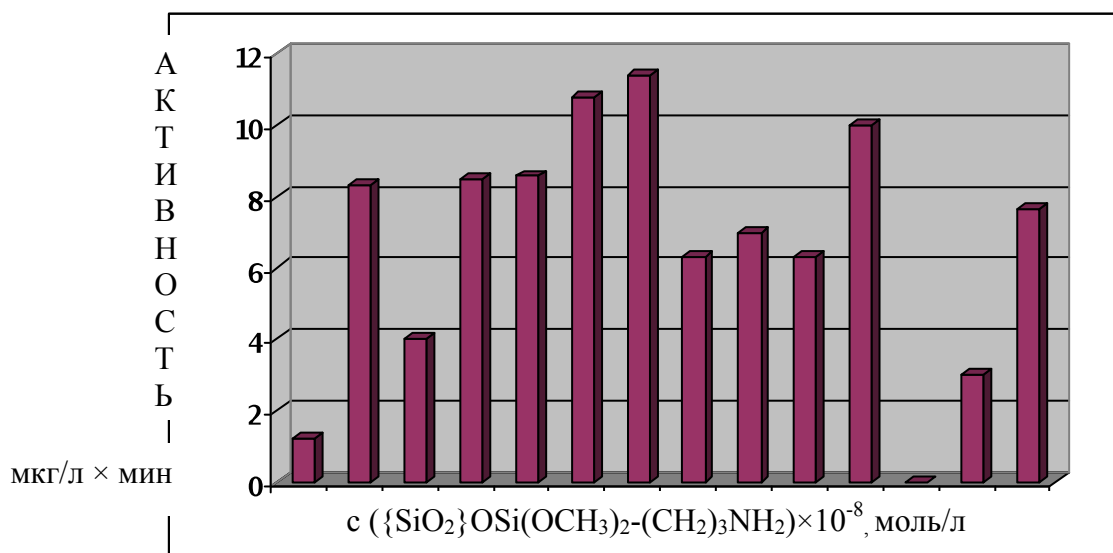


Рис.6. Диаграмма зависимости протеолитической активности *SAP C.alb.* от концентрации $\{\text{SiO}_2\}\text{OSi}(\text{OCH}_3)_2-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$,

Установлено (табл.2), что для индуцируемой протеиназы *Candida albicans* в присутствии модулятора преимущественно наблюдается эффект увеличения каталитической активности в 3-9 раз. Очень интересным является то, что ингибирование активности протеиназы происходит в узком диапазоне концентраций модулятора, т.е. носит точечный характер. При концентрации органического фрагмента 2.21×10^{-8} моль/мл достигается 100% ингибирование каталитической активности фермента.

Таблица 2

Действие $\{\text{SiO}_2\}\text{OSi}(\text{OCH}_3)_2-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, на протеолитическую активность *SAP C.alb*
($c_{\text{SAP}}=6.79 \times 10^{-7}$ моль/л, pH=4.26)

С, моль/л	Эффект
<i>SAP</i> ($A_0 = 1.2 \times 10^{-8}$ моль/л×мин)	
2.21×10^{-8}	Ингибирование (100 %)
$2.21 \times 10^{-12} - 2.21 \times 10^{-11}$ $1.1 \times 10^{-7} - 2.21 \times 10^{-7}$	Активация (max в 9 раз)

Наблюдаемые эффекты могут быть связаны с образованием молекулярных комплексов или многослойной адсорбцией белков на силикатных частицах за счет электростатического взаимодействия, что приводит к структурным и функциональным изменениям белков системы *SAP C. alb.*- Нб.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные экспериментальные данные позволяют охарактеризовать аминомодифицированные силикатные наночастицы $\{\text{SiO}_2\}\text{OSi}(\text{OCH}_3)_2-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ как соединение, обладающее биохимической активностью, по отношению к системе индуцируемая протеиназа *Candida albicans* –гемоглобин. Влияние на каталитическую активность фермента обусловлено взаимодействием наночастиц с обоими компонентами фермент-субстратной пары. Таким образом, наночастицы $\{\text{SiO}_2\}\text{OSi}(\text{OCH}_3)_2-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ могут быть использованы при разработке нового нанолекарственного препарата, внося дополнительный вклад в антикандидозное действие.

Список литературы

1. Naglik J.R., Challacombe S.J., Hube B. Candida albicans Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* - 2003. - V. 67. - P. 400-428.
2. Calderone RA, Fonzi W.A. Virulence factors of *Candida albicans* // *Trends in Microbiology.* - 2001. - V.9, No.7. - P.327-335.
3. Hube B., Naglik J.R. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of gene family // *Microbiology.* - 2002. - V. 147. - P. 1997-2005.
4. Kaminishi H., Hagihara Y., Hayashi S., Cho T. Isolation and characteristics of collagenolytic enzyme produced by *Candida albicans* // *Infection and Immunity.* - 1986. - V. 53, N.2. - P. 312-316.
5. Cassone A., Bernardis De F., Torosantucci A., Tacconelli E., Tumbarello M., Cauda R. In vitro and in vivo anticandidal activity of human immunodeficiency virus proteinase inhibitors // *J. Infect. Disease.* - 1999. - V. 180. - P. 68-71.
6. Mixich G., Thiele K. A contribution to the stereospecific synthesis of antimycotic imidazolyloxime ethers // *Drug. Res.* - 1979. - V. 29, I. 2. - P. 1510-1513.
7. Hiratani T., Uchida K., Yamaguchi H. Oxiconazole nitrate, a new imidazole – antimycotic: evaluation of antifungal activity in vitro // *Chemotherapy.* - 1984. - V. 32, I. 9. - P. 68-584.
8. Mikato H., Kawaroe K., Sato Y. Comparative study on the effectiveness of antifungal agents in different rigimens against vaginal candidiasis // *Chemotherapy.* - 1998. - V. 44, I. 5. - P. 364-368.
9. Abad - Zapatero C., Goldman R., Muchmore S.W., Hutchins C., Stewar J., Payne C.D., Ray T.L. Structure of a secreted aspartic protease from *Candida albicans* with a potent inhibitor: implications for the design of antifungus agents // *Protein Sci.* - 1996. - V.5. - P. 640-652.
10. Wang, Y. Production of carbonate and silica nano-particles in stirred bead milling / Y. Wang, E. Forssberg // *Int. J. of Miner. Process.* – 2006. – V.81. - P.1-14.
11. Smith, J.E. Bioconjugated silica-coated nanoparticles for bioseparation and bioanalysis / J.E. Smith, L. Wang, W. Tan // *Trends in Anal. Chem.* – 2006. – V.25. – P.848-855.
12. Варфоломеев С.Д. Практический курс. Биокинетика. / С.Д. Варфоломеев, К.Г. Гуревич. // М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. – 720 с.
13. Кашкин А.П. Иммуноферментный анализ биологически активных веществ / А.П. Кашкин. // М.: Медицинская промышленность. 1985. – 43с.
14. Константы устойчивости комплексов с биолигандами. Справочник / отв. ред. К. Б. Яцимирский. – Киев: «Наукова думка», 1979. – 894с.

Награды за доклад «Биохимическая активность силикатных частиц, модифицированных аминокетонами, по отношению к системе индуцируемая протеиназа *Candida albicans* - гемоглобин»

- Диплом 1 степени в 14 научно-практической конференции «Ломоносовские чтения», г.Казань, секция «химия», 2010г.
- Диплом 1 степени в 11 Поволжской научной конференции имени Н.И.Лобачевского, секция «химия», 2010г.
- Диплом победителя (1 место) в конкурсе молодежных инновационных команд РОСТ Intel, г.Нижний Новгород , 2010г.
- Финалист международного конкурса Intel ISEF 2011

Сведения об авторе

Галаутдинова Диана – ученица 11 класса, участник многих научно-практических конференций. Неоднократно выступала на научно-практической конференции имени Н.И.Лобачевского в секциях «экология», «химия», занимая призовые места.

Научные исследования по теме работы проводились в рамках научного направления коллектива лаборатории КГУ. Диана работала в группе, включающей студентов, аспирантов. При обсуждении результатов выдвигала гипотезы, делала выводы.

(из форм для конкурса Intel ISEF)