УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ КАЗАНСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА
Том 148, кн. 4 Естественные науки *2006*

УДК 577.15.024.025.535.243

КООРДИНАЦИОННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ИНДУЦИРУЕМОЙ ПРОТЕИНАЗЫ *CANDIDA ALBICANS* С КАТИОНАМИ d-МЕТАЛЛОВ КАК РЕГУЛЯТОРЫ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

Р.Р. Галимзанова, М.П. Кутырева, Н.А. Улахович, Н.И. Глушко, А.А. Иванова, Р.А. Черкасов, Н.Г. Забиров

Аннотация

Оценено влияние соединений $ZnCI_2$, $MnCI_2$ и $Zn[t\text{-BuNHC(S)NP(S)(OPr-}i)_2]_2$ (Zn^*L_2) на каталитическую активность индуцируемой протеиназы *Candida albicans* (SAP *C. albicans)*. По данным электронной спектроскопии рассчитаны логарифмы значений констант устойчивости, которые составили для комплекса [Zn-SAP *C. albicans*] – 4.73 ± 0.20, [Mn – SAP *C. albicans*] – 7.02 ± 0.02, [Zn* – SAP *C. albicans*] – 22.40 ± 0.02, состав и максимальные доли накопления для координационных форм [модулятор – SAP *C. albicans*]. Прочность и стехиометрический состав образующихся комплексных соединений SAP *C. albicans* с модуляторами также оценена с использованием метода Скэтчарда и Дюрантона. Константы аффинности взаимодействия в системах [$ZnCI_2$ – SAP *C. albicans*] составили $1.78 \pm 0.02 \cdot 10^7$ моль$^{-1}$, [$MnCI_2$ – SAP *C. albicans*] – $(7.95 \pm 0.02) \cdot 10^7$ моль$^{-1}$ и [Zn^*L_2 – SAP *C. albicans*] – $(3.24 \pm 0.1) \cdot 10^8$ моль$^{-1}$. Оценена каталитическая активность SAP *C. albicans* в присутствии соединений – модуляторов. В диапазоне концентраций $0.2 \cdot 10^{-8} – 1 \cdot 10^{-4}$ моль/л соединение $Zn[t\text{-BuNHC(S)NHP(S)(OPr-}i)_2]_2$ оказывает ингибирующее действие на SAP *C. albicans*. Ингибирующее действие $ZnCI_2$ в том же концентрационном диапазоне меньше в два раза, и при концентрации соли $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л переходит в эффект активации. В диапазоне концентраций $0.2 \cdot 10^{-8} – 1 \cdot 10^{-2}$ моль/л $MnCI_2$ оказывает ингибирующее действие.

Введение

Патогенный для человека вид грибкового аллергена рода *Candida* поражает наружные покровы и внутренние органы, вызывая глубокие микозы – кандидозы, болезни слизистых и сепсис. Чаще всего именно *C. albicans* являются возбудителями 70–80% системных микозов и 12–15% микозов кожных покровов [1, 2]. Это связано как с суперантигенными способностями данного гриба, так и с количеством и многообразием функций вырабатываемых им секреторных аспарагиновых протеиназ (SAP *C. albicans*) [3, 4].

С 1992 по 2000 гг. выделены десять изоферментов аллергена *C. albicans*, которые составили систему внеклеточных секреторных аспарагиновых протеиназ *C. albicans.* На рис. 1 изображена модель клеточной секреции системы протеиназ *C. albicans* и аминокислотная последовательность индуцируемой протеиназы *C. albicans* [5–7].

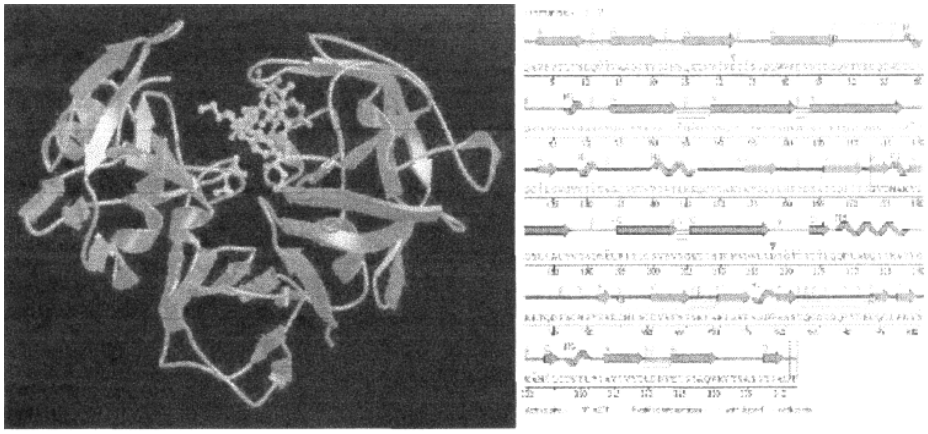

Рис. 1. Структура и аминокислотная последовательность секреторной аспарагиновой протеиназы. (Для наглядности α-спиральные участки представлены в виде цилиндров. β-складки – в виде лент со стрелкой, указывающей направление цепи в складке от N-конца к С-концу)

В активном центре каждого фермента неизменно на расстоянии водородной связи друг от друга находятся два депротонированных остатка аспарагиновой кислоты (Asp32-Asp218), действующих совместно по отношению к входящим молекулам субстрата, осуществляя разрыв пептидной связи. Жестко зафиксированные остатки цистеина удерживают третичную структуру протеиназы [5]. Кроме активного центра в ферменте, существуют еще два координационно-активных участка. Это – Asp57, отвечающий за связывание металлов с ферментом, и Tyr84 – Asp85, формирующие конформационный центр фермента [6]. Тем не менее, вопрос о регуляции каталитической активности системы SAP *C. albicans* остается открытым и является актуальным и интересным для химических исследований.

Объектом исследований является индуцируемая SAP *C. albicans,* обладающая антигенными свойствами. Ее высокая каталитическая активность и широкая субстратная специфичность приводят к многофункциональности данного фермента и его активному влиянию на жизнедеятельность организма [4, 8, 9].

Целью настоящего исследования является определение параметров каталитического действия индуцируемой SAP *C. albicans* в системе [фермент – субстрат – модулятор]. В качестве модуляторов каталитической активности фермента выбраны соединения d-металлов – цинка и марганца. Регуляция каталитической активности ферментов является одним из актуальных вопросов, касающихся изучения биоспецифических реакций. В настоящее время соединения Zn (II) входят в состав ряда антимикотических препаратов [10, 11]. Это связано с его окислительно-восстановительной стабильностью в биологических средах, потенциал которых постоянно изменяется. Однако действие данных препаратов описано только для грибковых культур и с позиций медицинской диагностики и клинических испытаний [12]. Химические аспекты координационных взаимодействий соединений Zn (II) с SAP *C. albicans* как первопричиной инфекции изучены недостаточно.

1. Методика

В работе использовали SAP *C. albicans*, выделенную из надосадочной жидкости при выращивании патогенных грибковых микроорганизмов *C. albicans*, с последующим центрифугированием биомассы и переосаждением 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 ч при 30ºС. Молекулярную массу SAP *C. albicans* определяли методом электрофореза. Гель–электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия (Ds-Na) в денатурирующих условиях при 100ºС 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 20ºС 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 выделяемого фермента составила 53.68 кДа.

Концентрацию лиофилизированной формы фермента ($7.26\cdot10^{-6}$ 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* [13].

Растворы $ZnCI_2$ и $MnCI_2$ с концентрацией $1\cdot10^{-9}$ – $1\cdot10^{-1}$ моль/л готовили из соответствующих хлоридов марки «ч.д.а.» методом последовательного разбавления. Водные растворы лиганда *t*-BuNHC(S)NP(S)(OPr-*i*)$_2$ и его комплекса Zn[*t*-BuNHC(S)NP(S)(OPr-*i*)$_2$]$_2$ готовили путем их растворения в малом количестве изопропанола и бидистиллированной воде. Методика синтеза, спектральные и количественные характеристики данных соединений описаны в работах [14, 15].

В качестве субстрата использовали сывороточный альбумин человека (САЧ) (95%, Mm = 65 кДа), приготовленный из препарата марки “Reanal” (Венгрия). Растворы САЧ получали растворением точной навески в бидистиллированной воде. Исходная концентрация САЧ составила $1.54\cdot10^{-3}$ моль/л. В работе использовали цитратные (pH = 1.08–4.8) и фосфатные (pH = 5.4–8.0) буферные растворы, приготовленные по стандартным методикам из реактивов марки ч.д.а.

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 точность измерения оптической плотности (A) ± 1%. Молярные коэффициенты экстинкции растворов (ε_λ) при нескольких длинах волн (λ) рассчитывали по соотношению:

$$\varepsilon_\lambda = (A - A_0)/c_L l, \qquad (1)$$

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

pH измеряли прибором – pH 150 M с точностью 0.01 логарифмической единицы.

Каждый эксперимент повторяли не менее чем в трех отдельных опытах. При построении графиков использовали усредненные величины, определенные из трех – пяти измерений.

2. Обработка данных

2.1. Обработка результатов спектрофотометрических исследований. Обработка результатов спектрофотометрических исследований для расчета состава и констант равновесия и образования комплексов проводилась в соответствии с программой CPESSP [16]. Использовали зависимости оптической плотности растворов от концентрации металла при постоянной концентрации комплексообразующего реагента. На основе рассчитанных степеней накопления комплексов (α) из электронных спектров поглощения различного состава с помощью программы Excel 2000 были построены графики накопления всех значимых форм изучаемых комплексов. Работа программы основана на минимизации целевой функции F при выбранной стехиометрии равновесия:

$$F = \sum_{j=1}^{N} \frac{\left(A_{\text{эксп},\,j} - A_{\text{расч},\,j}\right)^2}{\sigma^2 A_{\text{расч},\,j}^2}, \qquad (2)$$

где $A_{\text{эксп},\,j}$ и $A_{\text{расч},\,j}$ – экспериментально измеренная и рассчитанная величины оптической плотности раствора соответственно; j и N – номер и количество экспериментов; σ – относительная погрешность измерения A. С помощью программы CPESSP оценка достоверности полученных результатов проводится по критерию Фишера, исходя из величин σ и найденного значения $F_{\min}$.

2.2. Определение протеолитической активности. Активность фермента определяли в стандартных условиях по увеличению скорости каталитической реакции по сравнению с некаталитической. Скорость реакции указывали как изменение концентрации субстрата за единицу времени [17, с. 77].

2.3. Определение констант связывания (метод Скэтчарда). Для определения прочности связывания фермента с субстратом необходимо знать эффективные значения констант связывания (K_A), характеризующих свойства используемых ферментов. K_A можно представить в следующем виде:

$$K_A = X/\left(A_O - X\right)\left(B_O - X\right) \qquad (3)$$

или

$$X/\left(A_O - X\right) = K_A B_O - K_A X, \qquad (4)$$

где X – равновесная концентрация фермент-субстратного комплекса, A_O – общая концентрация субстрата в системе, B_O – рабочая концентрация субстрата в системе, $X/\left(A_O - X\right)$ – отношение концентраций связанного и свободного субстрата.

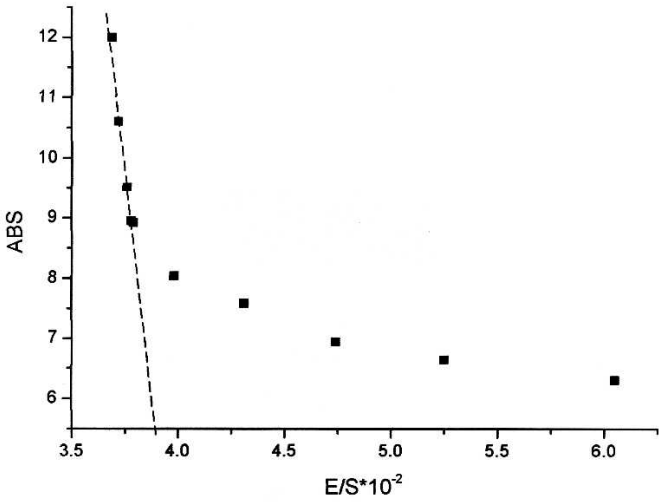

Рис. 2. Определение стехиометрического состава для реакции SAP *C. albicans* – САЧ (pH = 4.5, $C_{SAP} = 1.91 \cdot 10^{-9}$ моль/л, $t_{инк}$ = 20 мин., $\lambda_{САЧ}$ = 278 нм)

K_A определяли, используя зависимость $X/(A_O - X)$ от X, известную как график Скэтчарда и представляющую собой прямую линию с тангенсом угла наклона, равным K_A, и пересекающую горизонтальную ось координат в точке соответствующей B_0 [18, с. 351; 19].

2.4. Определение стехиометрического состава взаимодействий. Стехиометрический состав взаимодействий модулятора с SAP *C. albicans* определяли методом, предложенным Дюрантоном, измеряя остаточную ферментативную активность при разных концентрациях модулятора и постоянной концентрации фермента [20]. Строили зависимость ферментативной активности от соотношения концентраций C_{SAP} / $C_{САЧ}$. Затем экстраполяцией линейного участка определяли точку эквивалентности и по ней оценивали стехиометрический состав процесса взаимодействия фермент – модулятор (рис. 2).

3. Результаты и их обсуждения

Оценка параметров каталитического действия индуцируемой SAP в системе [протеиназа SAP *C. albicans* – субстрат – модулятор] представляет собой сложную комплексную задачу. Первым этапом данной работы являлось рассмотрение взаимодействий протеиназы SAP *C. albicans* с субстратом. Для оценки константы связывания в системе [протеиназа (SAP *C. albicans*) – альбумин (САЧ)] использовано представление данных в координатах Скэтчарда. График Скэтчарда (рис. 3) свидетельствует о наличии в ферменте одного участка связывания с субстратом.

Константа связывания, стехиометрический состав взаимодействий и оптимальные условия ферментативного протеолиза САЧ с участием SAP *C. albicans* представлены в табл. 1.

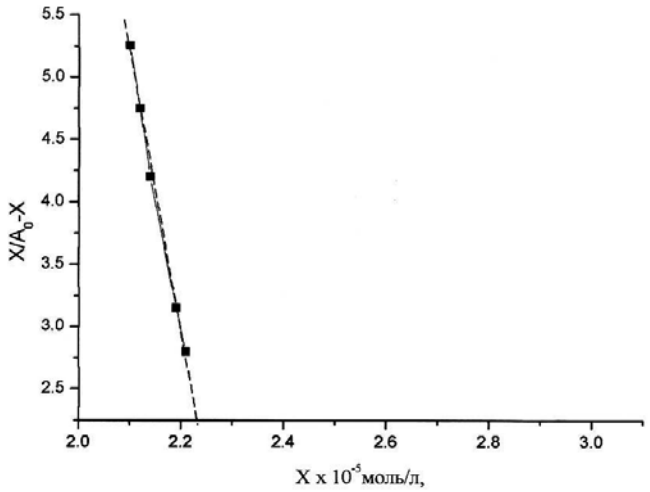

Рис. 3. График Скэтчарда для нахождения констант связывания фермент – субстратного комплекса (C_{SAP} = 1.91·10^{-9} моль/л, pH = 4.5)

Табл. 1

Параметры взаимодействия в системе [SAP *C. albicans* – САЧ]

K_A, моль$^{-1}$	Стехиометр. состав	C_S, г/мл	C_{SAP}, моль/л	pH	*t*, мин.	Активность, мг/мл·ч
(3.43 ± 0.02)·10^5	1 : 25	0.003	2.33·10^{-6}	4.5	25	6.86

На втором этапе работы оценено взаимодействие SAP *C. albicans* с модуляторами ($ZnCl_2$, $MnCl_2$ и Zn^*L_2). Для определения устойчивости и максимальных долей накопления значимых комплексных форм в растворах протеиназа – модулятор использовали метод сдвига равновесий с обработкой данных спектрофотометрических исследований методом математического моделирования. В электронных спектрах поглощения растворов SAP *C. albicans*, наблюдаются полосы поглощения при 210 и 278 нм. Введение в раствор, содержащий SAP *C. albicans*, $ZnCI_2$, $MnCI_2$ или хелатного комплекса Zn^*L_2 приводит к изменению спектральной картины исходных соединений и появлению новых полос поглощения, интенсивность которых зависит от концентрации вводимых в раствор SAP *C. albicans* эффекторов (рис. 4, 5).

Следует отметить, что полоса поглощения соединения Zn^*L_2 полностью исчезает при pH = 4.01, что соответствует pK аспарагиновой кислоты, входящей в активный центр фермента (рис. 6).

По данным электронной спектроскопии рассчитаны логарифмы значений констант устойчивости, состав и максимальные доли накопления, количество участков специфического связывания (*n*), константы аффинности (K_A) и стехиометрический состав взаимодействий в образующихся системах [протеиназа SAP *C. albicans* – модулятор] координационных форм (табл. 2).

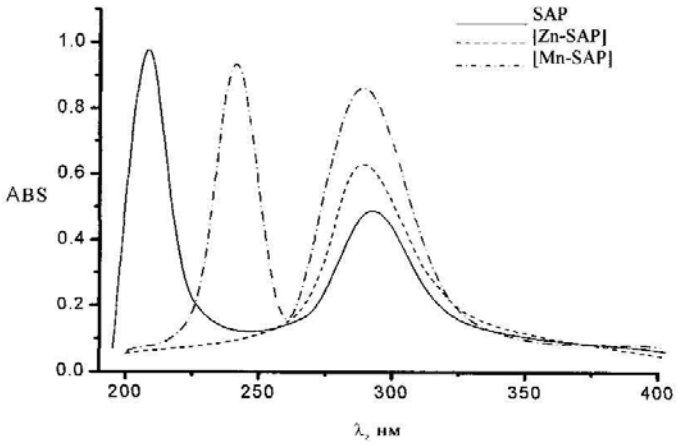

Рис. 4. Электронные спектры поглощения SAP *C. albicans* в концентрации $1.91 \cdot 10^{-9}$ моль/л, SAP *C. albicans* и растворов $ZnCl_2$ в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л и MnC_{l2} в концентрации $3 \cdot 10^{-7}$ моль/л в цитратном буферном растворе pH = 4.5

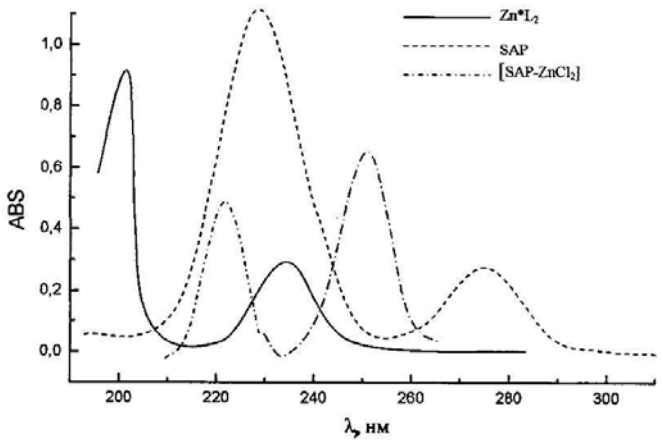

Рис. 5. Электронные спектры поглощения SAP *C. albicans* в концентрации $1.91 \cdot 10^{-9}$ моль/л (1), SAP *C. albicans* и растворов Zn^*L_2 в концентрации $1 \cdot 10^{-8}$ моль/л (2) и в концентрации $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л (3) в цитратном буферном растворе pH = 4.5

Табл. 2

Характеристические параметры координационных систем [$ZnCI_2$ – SAP], [$MnCI_2$ – SAP] и [Zn^*L_2 – SAP] в растворе

Соединение	lg β	Состав	Максимальные доли накопления (α), %	K_A, моль$^{-1}$	*n*	Стехиометр. состав
[Zn – SAP]	4.73 ± 0.02	1 : 1	96.4 ± 0.1	$(1.78 \pm 0.02) \cdot 10^7$	1	1 : 1
[Mn – SAP]	7.02 ± 0.20	1 : 1	39.4 ± 0.1	$(7.95 \pm 0.02) \cdot 10^7$	1	1 : 1
[Zn* – SAP]	17.59 ± 0.02 22.42 ± 0.02	3 : 1 4 : 1	73.6 ± 0.1 58.2 ± 0.1	$(1.12 \pm 0.04) \cdot 10^7$ $(3.24 \pm 0.01) \cdot 10^8$ $(7.04 \pm 0.03) \cdot 10^6$	3	3.5 : 1

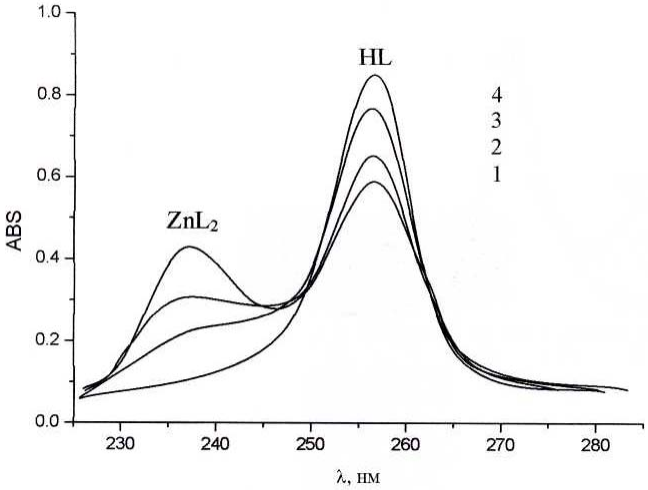

Рис. 6. Электронные спектры поглощения SAP *C. albicans* в присутствии Zn^*L_2: 1 – pH = 4.12, 2 – pH = 3.9, 3 – pH = 3.75, 4 – pH=3.56

При взаимодействии индуцируемой SAP *C. albicans* с хлоридами цинка или марганца происходит координация иона металла с кислородом депротонированного при pH 4.5 Asp57 с образованием комплекса 1 : 1. Вид графиков Скэтчарда, описывающих взаимодействия хлоридов цинка или марганца с протеиназой, также указывает на наличие только одного участка в составе молекулы фермента, специфично взаимодействующего с катионами металлов (рис. 7, *а*, *б*).

При взаимодействии SAP *C. albicans* с хелатом ZnL_2 при pH = 4.5 наряду с депротонированием аспарагиновой кислоты протекает процесс протонирования лиганда, на что указывает появление полосы поглощения свободного *t*-BuNHC(S)NHP(S)(OPr-*i*)$_2$ при λ = 257.5 нм (рис. 6).

Данные математического моделирования свидетельствуют о существовании двух комплексных форм состава 3 : 1 в результате координации модулятора с кислородом Asp57 (центр связывания с металлами) и Asp32 и 218 (активный центр фермента) и 4 : 1 при высоких концентрациях хелата с участием во взаимодействии конформационного центра. Данные, полученные в координатах Скэтчарда, подтверждают, что взаимодействие с хелатным комплексом идет по трем специфическим участкам фермента с различными константами аффинности. Лиганд в данном случае может служить транспортом ионов цинка к ферменту. И общую схему координационных взаимодействий с участием Zn^*L_2 можно представить в следующем виде:

$$ZnL_2 + \text{SAP } C.\ albicans \rightarrow [\text{SAP } C.\ albicans - Zn^*(II)] + 2HL.$$

Оценена ферментативная активность индуцируемой SAP *C. albicans* в присутствии соединений – модуляторов в различных концентрациях в оптимальных условиях ферментативного гидролиза. Установлено, что в присутствии хлорида цинка наблюдается эффект ингибирования в диапазоне концентраций $1\cdot10^{-4} – 1\cdot10^{-6}$ и $1\cdot10^{-7} – 1\cdot10^{-8}$ моль/л и эффект активации при концентрации $5\cdot10^{-7}$ моль/л. В присутствии хелатного комплекса цинка наблюдается эффект ингибирования в диапазоне концентраций $1\cdot10^{-4} – 5\cdot10^{-8}$ моль/л. В присутствии

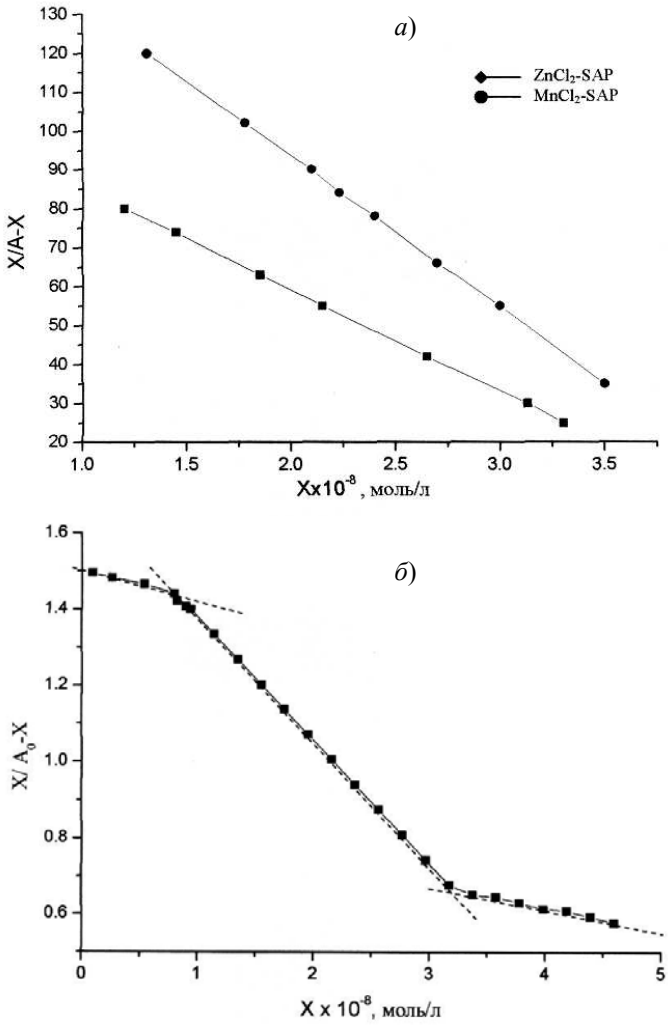

Рис. 7. Зависимость Скэтчарда, описывающая связывание: *а* – [$ZnCl_2$ – SAP *C. albicans*] ($C_{ZnCl2} = 4\cdot10^{-8}$ моль/л) и [$MnCl_2$ – SAP *C. albicans*] ($C_{MnCl2} = 1\cdot10^{-8}$ моль/л); *б* – [ZnL_2 – SAP *C. albicans*] ($C_{Zn*L2} = 1\cdot10^{-5}$ моль/л)

хлорида марганца наблюдается эффект ингибирования во всем диапазоне исследованных концентраций (рис. 8).

Следует отметить, что образование координационных соединений в системе [SAP *C. albicans* – $Zn*L_2$] с более высокими значениями констант устойчивости, констант связывания и стехиометрией взаимодействия по сравнению с системой [SAP *C. albicans* – $ZnCl_2$] сказывается на силе и характере эффектов, проявляемых данными модуляторами. Если в присутствии $ZnCl_2$ эффект ингибирования чередуется с эффектом активации, то в присутствии комплекса цинка с тиофосфорилтиомочевиной наблюдается только эффект ингибирования. Значительный эффект ингибирования в присутствии хлорида марганца обусловлен большей поляризуемостью и токсичностью данного металла для фермента. Кроме того, возможно образование прочных координационных соединений фермента с Mn (III).

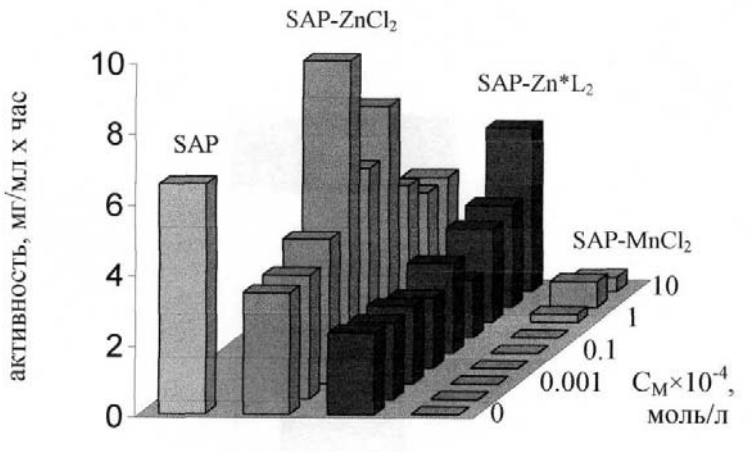

Рис. 8. Зависимость ферментативной активности SAP *C. albicans* по отношению к САЧ в присутствии модуляторов $ZnCl_2$, $MnCl_2$ и Zn^*L_2 ($C_{САЧ} = 0.003$ г/мл, $C_{SAP\ C.\ alb.} = 1.91 \cdot 10^{-9}$ моль/л, pH = 4.5)

Полученные в ходе экспериментальной работы данные значимы для разработки путей регуляции каталитической активности индуцируемых протеиназ *C. albicans*, а также для разработки методов комплексной терапии микозов *Candida*.

Summary

R.R. Galimzanova, M.P. Kutyreva, N.A. Ulahovich, N.I. Glushko, A.A. Ivanova, R.A. Cherkasov, N.G. Zabirov. Coordination compounds of induction proteinase of *Candida albicans* with iones of d-metalls as regulators of enzymatic activity.

Influence of compounds $ZnCl_2$, $MnCl_2$ and $Zn[t\text{-BuNHC(S)NP(S)(OPr-i)}_2]_2$ (Zn^*L_2) on catalytic activity induction proteinase of *Candida albicans* (SAP *C. albicans*) were estimates. Logarithms of stability constant from the data of electronic spectroscopy were calculated: $\lg \beta = 4.73 \pm 0.20$ for the complex [Zn – SAP *C. albicans*], $\lg \beta = 7.02 \pm 0.02$ – [Mn – SAP *C. albicans*] and $\lg \beta = 22.40 \pm 0.02$ – [Zn* – SAP *C. albicans*]. The composition and maximum accumulation of complexes [modulator – SAP *C. albicans*] were calculated. Strength and stechiometry of complexes SAP *C. albicans* with modulators was estimated with the use of methods Skatchard and Duranton. The constants affinity of interaction in system [$ZnCl_2$ – SAP *C. albicans*] – $(1.78 \pm 0.02) \cdot 10^7$, [$MnCl_2$ – SAP *C. albicans*] – $(7.95 \pm 0.02) \cdot 10^7$ and [Zn^*L_2 – SAP *C. albicans*] – $(3.24 \pm 0.1) \cdot 10^8$ was formed. The activity SAP *C. albicans* in the presence of compounds – modulators was estimated. The experimental dates were shows the inhibiting action of ZnL_2 in concentration range $0.2 \cdot 10^{-8} – 1 \cdot 10^{-4}$ M on SAP *C. albicans*. Inhibiting action $ZnCl_2$ in the same range of investigated concentrations less for two times. The activating action $ZnCl_2$ in concentrations $5 \cdot 10^{-7}$ M was observed. The $MnCl_2$ was inhibiting action in concentration range $0.2 \cdot 10^{-8} – 1 \cdot 10^{-2}$ M.

Литература

1. *Лещенко В.М.* Грибковые заболевания: современное состояние проблемы // Междунар. мед. журн. – Харьков, 1999. – Т. 3. – С. 5–51.
2. *Hube B., Naglik J. Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family // Microbiology. – 2001. – V. 147. – P. 80–87.

3. *Calderone R.A., Fonzi W.A.* Virulence factors of *Candida albicans* // Trends in Microbiology. – 2001. – V. 9, No 7. – P. 327–335.
4. *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.
5. *Cutfield S.M., Dodson E.J., Anderson B.F., Marshall C.J., Sullivan P.A., Cutfield J.F.* The crystal structure of a major secreted aspartic proteinase from *Candida albicans* in complexes with two inhibitors // Current Biology. – 1995. – V. 3. – P. 1261–1271.
6. *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 antiful agents // Protein Sci. – 1996. – V. 5. – P. 640–652.
7. *Smolenski G., Sullivan P.A., Cutfield S.M., Cutfield J.F.* Analysis of secreted aspartic proteinases from *Candida albicans*: purification and characterization of individual Sap1, Sap2 and Sap3 isoenzymes // Microbiology. – 1997. – V. 143, No 2. – P. 349–356.
8. *Schaller M., Bein M., Korting H.C., Baur S., Hamm G., Monod M., Beinhauer S., Hube B.* The secreted aspartyl proteinases SAP1 and SAP2 cause tissue damage in an in vitro model of vaginal candidiasis based on reconstituted human vaginal epithelium // Infection and immunity. – 2003. – V. 71, No 6. – P. 3227–3234.
9. *Koelsch G., Tang J., Loy J.A., Monod M., Jackson K., Foundling S.I., Lin X.* Enzymic characteristics of secreted aspartic proteases of *Candida albicans* // Biochim. et Biophysica Acta. – 2000. – V. 1480. – P. 117–131.
10. *Magyar J.S., Godwin H. A.* Spectropotentiometric analysis of metal binding to structural zinc-binding sites: accounting quantitatively for pH and metal ion buffering effects // Analytical biochemistry. – 2003. – V. 320. – P. 39–54.
11. *McCall K.A., Huang C., Fierke C.A.* Function and mechanism of zinc metalloenzymes // Zinc and Health: current status and future directions. – 2000. – V. 130. – P. 1437–1446.
12. *Schaller M., Krnjaic N., Niewerth M., Hamm G., Hube B., Korting H.C.* Effect of antimycotic agents on the activity of aspartyl proteinases secreted by *Candida albicans* // J. Med. Microbiol. – 2003. – V. 52. – P. 247–249.
13. *Кутырева М.П., Медянцева Э.П., Халдеева Е.В., Будников Г.К., Глушко Н.И.* Определение антигена *Candida albicans* с помощью амперометрического иммуноферментного сенсора // Вопросы биомед. хим. – 1998. – Т. 44, № 2. – С. 172-178.
14. *Кутырева М.П., Улахович Н.А., Сальников Ю.И., Брусько В.В., Соколов Ф.Д., Забиров Н.Г.* Комплексообразующие свойства N-(тио)фосфорилированных тиомочевин по отношению к ионам двухзарядным ионам d-металлов // Журн. неорг. химии. – 2004. – С. 1643–1651.
15. *Брусько В.В., Рахматуллин А.И., Забиров Н.Г.* Комплексы N-диизопропокситиофосфорил-N'-фенилтиомочевины с рядом тиофильных металлов // Журн. общ. химии. – 2000. – Т. 70, № 10. – С. 1705–1711.
16. *Сальников Ю.И., Глебов А.Н., Девятов Ф.В.* Полиядерные комплексы в растворах. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 1989. – 632 с.
17. *Березин И.В., Клесов А.А.* Практический курс химической и ферментативной кинетики. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1976. – 320 с.
18. *Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г.* Биокинетика: Практический курс. – М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. – 720 с.
19. *Кашкин А.П.* Иммуноферментный анализ биологически активных веществ. – М.: Мед. пром-сть, 1985. – 43 с.

20. *Duranton 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. – P. 11239–11245.

Поступила в редакцию
23.05.06

Галимзанова Рамиля Рустимовна – младший научный сотрудник отдела неорганической и координационной химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

Кутырева Марианна Петровна – кандидат химических наук, доцент кафедры неорганической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

Улахович Николай Алексеевич – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой неорганической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

Глушко Надежда Ивановна – старший научный сотрудник Казанского НИИ эпидемиологии и микробиологии.

Иванова Ангелина Александровна – студентка Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

Черкасов Рафаэль Асхатович – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой химии высокомолекулярных и элементорганических соединений Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

Забиров Наиль Галиевич – доктор химических наук, профессор Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.