

Л.Д. Варбанец¹, Н.А. Ниद्याлкова¹, И.И. Сейфуллина²,
А.В. Пуля², Л.С. Скороход²

¹ Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Акад. Заболотного, 154, 03143, Киев, Украина

² Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, 65082, Одесса, Украина

МОДИФИКАЦИЯ АКТИВНОСТИ ПЕПТИДАЗ *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *ISRAELENSIS* ИМВ В-7465 ГИДРАЗИД/ГИДРАЗОННЫМИ КОМПЛЕКСАМИ 3D-МЕТАЛЛОВ

Цель. Изучить влияние на активность пептидазы 1 и пептидазы 2 *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* ИМВ В-7465 15 биоконплексов ионов 3d-металлов (Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) с “гидазепамом” – 2-(7-бром-2-оксо-5-фенил-2,3-дигидро-1H-1,4-бенздиазепин-1-ил) ацетогидразидом (Hydr) и продуктами его конденсации с пировиноградной кислотой (HPv) и салициловым альдегидом (HSal). По типу их можно разделить на три группы: разнолигандные молекулярные, разнолигандные внутрикомплексные, однороднолигандные внутрикомплексные. **Методы.** Использовали методы определения эластазной, коллагеназной и фибринолитической активности. **Результаты.** Анализ полученных данных показал, что значительное число из исследуемых комплексов, независимо от используемой концентрации, практически не оказывают влияния на эластазную и коллагеназную активность пептидазы 1 *B. thuringiensis* var. *israelensis* ИМВ В-7465. Некоторые из них инертны по отношению к ферменту и субстрату, то есть не мешают им стерически приспособиться друг к другу, в то время как другие соединения незначительно ингибируют активность. И только два соединения, содержащие ионы меди, но различные лиганды – гидазепам (соединение 3) и продукт его конденсации с пировиноградной кислотой (соединение 7) – проявляли значительный стимулирующий эффект (почти в 3,5 раза). В случае пептидазы 2 общая картина и степень влияния исследуемых эфффекторов на эластазную и коллагеназную активность существенно отличаются: соединения 3 и 7 в значительно меньшей степени (в 1,3-1,4 раза) стимулируют их активность. Анализ данных по влиянию исследуемых координационных соединений на фибринолитическую активность пептидазы 2 *B. thuringiensis* var. *israelensis* ИМВ В-7465 показал, что при использовании комплексов 3 и 7 в концентрации 0,001% наблюдалось увеличение активности энзима до 145% и 138% соответственно. **Выводы.** Показано, что природа энзима вносит свой вклад в изменение механизма его взаимодействия с субстратом и эфффектором.

Ключевые слова: пептидаза 1 и пептидаза 2 *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* ИМВ В-7465, биоконплексы ионов 3d-металлов (Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) с “гидазепамом” и продуктами его конденсации с пировиноградной кислотой (HPv) и салициловым альдегидом (HSal).

Значительные успехи в фундаментальных исследованиях в области биохимии, молекулярной генетики и молекулярной биологии, достигнутые во второй половине 20 ст., создали реальные предпосылки управления различными механизмами жизнедеятельности клетки, в том числе синте-

зом и активностью ферментов. Для этого могут быть использованы как изменение условий и продолжительности культивирования продуцентов для максимального синтеза фермента, так и различные соединения-эффекторы, способные модифицировать исследуемую ферментативную активность. Изучение влияния различных эффекторов является одним из приоритетных направлений современных исследований в биохимии, биокоординационной химии, биотехнологии. В этом плане хорошо зарекомендовали себя ионы биофильных d-металлов, что было отмечено нами в предыдущих работах [8, 10, 16, 17]. Наиболее перспективным, на наш взгляд, является создание активаторов ферментов на основе хелатов биометаллов с биолигандами. Такая система более эффективна, так как она способна обеспечить полное конформационное соответствие субстрата и функциональных групп активного центра фермента на всех стадиях процесса [3].

В связи с этим целью данной работы было изучить влияние на активность внеклеточных пептидаз *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* ИМВ В-7465 различных комплексов биофильных ионов 3d-металлов (Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) с известным дневным транквилизатором “гидазепамом” [1] и продуктами его конденсации с пировиноградной кислотой и салициловым альдегидом.

Материалы и методы. Объектом исследования были внеклеточные пептидазы *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* ИМВ В-7465 с коллагеназной, эластолитической и фибринолитической активностью. *B. thuringiensis* var. *israelensis* ИМВ В-7465 выделен из акватории о. Змеиный (Черное море) и находится в коллекции живых культур кафедры микробиологии, вирусологии и биотехнологии Одесского национального университета им. И.И. Мечникова.

Для синтеза пептидаз *B. thuringiensis* var. *israelensis* ИМВ В-7465 культивировали на жидкой питательной среде следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 1,6; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,75; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5; мальтоза – 1,0; желатин – 10,0; дрожжевой автолизат – 0,15; pH – 6,5-6,7 [4]. Культуру выращивали в течение 24 часов в колбах на качалках (200 мл среды, 28°C, 250 об/мин). Инокулом получали при культивировании штамма на соответствующей среде в течение 24 часов и засеивали в колбы в количестве 10^5 - 10^6 КОЕ/мл.

Препараты пептидаз получены из супернатанта культуральной жидкости *B. thuringiensis* var. *israelensis* ИМВ В-7465, очищены до гомогенного состояния на колонках с нейтральными и заряженными TSK-гелями DEAE-650(M) и Toyopearl HW-55 («Toyosoda», Япония), как описано нами ранее [6, 10, 14]. В результате очистки комплексного энзимного препарата *B. thuringiensis* var. *israelensis* было получено пептидазу 1 со специфичностью к эластину и коллагену и пептидазу 2 – со специфичностью к эластину, коллагену и фибрину.

Содержание белка оценивали методом Лоури [6], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

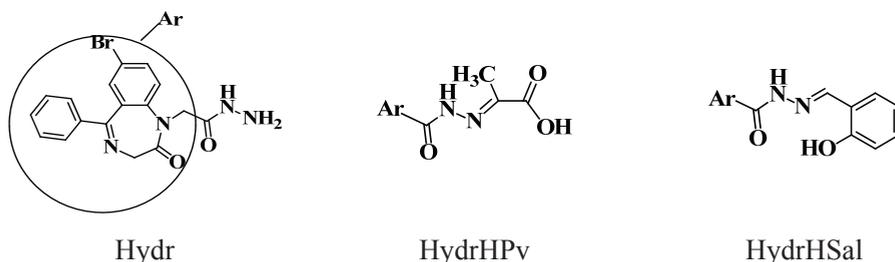
Эластазную активность определяли колориметрически по интенсивности окраски раствора при энзиматическом гидролизе эластина, окрашенного конго-рот с помощью метода Trombridg G. O. et al. [15] в моди-

фикации Бондарчук [2]. Инкубационная смесь содержала 5 мг эластина, 2,0 мл 0,01 М Tris-HCl буфера (pH 7,5) при добавлении 0,005 М CaCl₂ и 1 мл раствора исследуемого препарата. Смесь инкубировали в течение 5 час при 37°C. Негидролизованый эластин отделяли центрифугированием при 8000g, 10 мин. Интенсивность окраски измеряли на спектрофотометре СФ-26 при 515 нм. Активность рассчитывали по стандартной кривой, которая была получена при измерении окраски супернатанта при полном энзиматическом гидролизе известных количеств эластина, окрашенного конго-рот. За единицу активности принимали такое количество энзима, которое катализирует гидролиз 1 мг субстрата за 1 мин в стандартных условиях.

Фибринолитическую активность измеряли методом Masada [7], в качестве субстрата использовали фибрин, полученный из плазмы крови человека. Реакционная смесь содержала 1 мг фибрина, 1,8 мл 0,01 М Tris-HCl буфера (pH 7,5) при добавлении 0,005 М CaCl₂ и 0,2 мл раствора исследуемого препарата. Инкубационную смесь выдерживали 30 мин при 37°C. Образование продуктов расщепления определяли на спектрофотометре СФ-26 при 275 нм. За единицу фибринолитической активности принимали такое количество энзима, которое повышает оптическую плотность реакционной смеси на 0,01 за 1 мин в условиях опыта.

Специфическая активность пептидазы 1 составляла 442 ед/мг протеина (для эластазной активности) и 212,7 ед/мг протеина (для коллагеназной активности), а для пептидазы 2 - 289,5 ед/мг протеина (для эластазной активности), 345,8 ед/мг протеина (для коллагеназной активности) и 250,5 ед/мг протеина (для фибринолитической активности). Содержание протеина – 0,1 мг/мл.

В качестве эфффекторов пептидаз были выбраны различного типа комплексы биофильных ионов 3d-металлов (Co²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺) с известным дневным транквилизатором “гидазепамом” – 2-(7-бром-2-оксо-5-фенил-2,3-дигидро-1H-1,4-бенздиазепин-1-ил) ацетогидразидом (Hydr) [1] и продуктами его конденсации с пировиноградной кислотой (HPv) и салициловым альдегидом (HSal):



Методики синтеза 15 новых комплексов разработаны на кафедре общей химии и полимеров ОНУ им. И.И. Мечникова. Они всесторонне охарактеризованы совокупностью современных физических и химических методов исследования: элементного анализа, термогравиметрии, измерения электропроводности, магнитной восприимчивости, ИК-, ЭПР-спектроскопии, рентгеновской спектроскопии поглощения (EXAFS). Установлены их состав и строение [11-14]. Основные фраг-

менты молекул координационных соединений 1 – 15 и их формулы приведены в таблице.

Таблица

Схемы строения основных фрагментов молекул комплексов (1 – 15) и их формулы

[Co(Hydr)Cl ₂]:H ₂ O (1)	[M(Hydr) ₂ Cl ₂] M = Ni (2), Mn (4)	[Cu(Hydr)(H ₂ O)Cl ₂] (3)
[Co(HydrHPv)Cl ₂]:2H ₂ O (5)	[Ni(HydrPv) ₂] (6)	[Cu(HydrHPv)(H ₂ O)Cl ₂] (7)
[Mn(HydrHPv) ₂ Cl ₂] (8)	[M(HydrSal) ₂] M = Co (9), Ni (10), Mn (12)	[Cu(HydrSal) ₂] (11)
[Mn(HydrSal)(Ac)(C ₂ H ₅ OH) ₂] (13)*	[Zn(HydrHSal)Cl ₂] (14)	[Zn(HydrSal)(Ac)(H ₂ O)] (15)*

*Ac – CH₃COO

Результаты и их обсуждение. Известно, что наиболее часто используемыми в различных сферах промышленности и медицины являются протеазы (45%) и карбогидразы (более 35%). В Украине на сегодня ферментные препараты выпускаются в очень ограниченных количествах и степень очистки, субстратная специфичность, физико-химические свойства не позволяют им конкурировать с препаратами, которые выпускаются зарубежными фирмами. В связи с этим актуальными являются работы, которые направлены на создание промышленных технологий получения отечественных ферментных препаратов, которые не уступали бы по качеству мировым аналогам. Перспективными представляются

ферменты протеолитического действия, которые синтезируются практически всеми живыми организмами: животными, растениями и микроорганизмами. Однако природное сырье может содержать инфекционные агенты, проонкогены, нуклеиновые кислоты, прионы. Поэтому значительная часть современных научных исследований посвящена изучению разнообразных ферментативных систем именно микроорганизмов, которые лишены указанных недостатков. Они способны быстро размножаться и осуществлять синтез биологически активных соединений в условиях, которые контролируются. Кроме того, микроорганизмы продуцируют значительные количества ферментов в окружающую среду, что значительно облегчает их выделение и очистку. Поскольку микробную клетку, в зависимости от условий существования, окружают различные белковые субстраты, то и синтезируются разные по специфичности ферменты – широкой специфичности, которые гидролизуют несколько субстратов, или высокоспецифичные, которые действуют исключительно на определенный субстрат, например, эластин и фибрин. Такие ферменты представляют значительный медицинский интерес. Их используют в медицинской практике для профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний, причиной которых являются тромбозы, вызванные образованием фибриновых сгустков внутри сосудов и в пустотах сердца. В современной медицине используется ряд фибринолитических агентов как эндогенного, так и экзогенного происхождения: урокиназа, фибринолизин, гепарин, стрептокиназа, стафилокиназа, террилитин и др. Несмотря на широкое использование, они характеризуются недостатками, к которым относится короткое время полураспада, высокая стоимость, риск возникновения аллергических реакций и сложности, связанные с кровотечениями. Известно, что наиболее активными продуцентами фибринолитических ферментов являются представители рода *Bacillus*. Ранее [8] в результате скрининга нами был отобран штамм *B. thuringiensis* ИМВ В-7465, который проявлял фибринолитическую активность. После очистки на колонках с нейтральными и заряженными TSK-гелями DEAE-650(M) и Toyopearl HW-55 («Toyosoda», Япония) [10] нами были получены в гомогенном состоянии препараты внеклеточных пептидаз *B. thuringiensis* var. *israelensis* ИМВ В-7465: пептидазы 1 со специфичностью к эластину и коллагену и пептидазы 2 со специфичностью к эластину, коллагену и фибрину. Известно, что, изменяя условия и продолжительность культивирования, а также используя различные соединения как модификаторы, можно получать протеолитические ферменты с повышенной активностью.

Однотипные по структуре координационные соединения германия (IV) и олова (IV) на основе хелатирующего лиганда – биологически активной лимонной кислоты – были использованы нами ранее [18] в качестве модификаторов пептидазной активности. Было установлено, что соединение, которое представляет собой бисцитратостаннатный комплекс, содержащий в качестве катиона ион магния, можно использовать для стимуляции на 20-25% коллагеназной активности пептидазы 1 и пептидазы 2 *B. thuringiensis* var. *israelensis* ИМВ В-7465. Бисцитратогерманатный и бисцитратостаннатный комплексы, содержащие в качестве катионов ионы магния и кобальта (II) соответственно способны на 55-58% увеличивать

эластолитическую активность пептидазы 1. Однако наибольшее активирующее действие проявил бисцитратостаннатный комплекс, содержащий ион кобальта (II), который на 100-140% (в обеих исследованных концентрациях) повышал эластолитическую активность пептидазы 2. Это свидетельствует о том, что этот комплекс может в дальнейшем быть использован как эффектор эластолитической активности пептидазы 2. Эти результаты свидетельствуют о том, что способность координационных соединений оказывать как ингибирующее, так и активирующее действие на активность энзимов, определяется совокупностью факторов: выбором иона металла, биолганда, составом, особенностями строения образующегося комплекса.

Научный и практический интерес представляет изучение влияния на активность пептидазы 1 и пептидазы 2 *B. thuringiensis* var. *israelensis* ИМВ В-7465 биокомплексов ионов 3d-металлов (Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) с “гидазепамом” – 2-(7-бром-2-оксо-5-фенил-2,3-дигидро-1H-1,4-бенздиазепин-1-ил)ацетогидразином (Hydr) [1] и продуктами его конденсации с пировиноградной кислотой (HPv) и салициловым альдегидом (HSal). По типу их можно разделить на три группы: разнолигандные молекулярные (1 – 5, 7, 8, 14), разнолигандные внутрикомплексные (13, 15), однороднолигандные внутрикомплексные (6, 9 – 12) (табл.).

Комплексы (1 – 15) образованы ионами различных металлов: Co^{2+} (1, 5, 9), Ni^{2+} (2, 6, 10), Mn^{2+} (4, 8, 12, 13), Cu^{2+} (3, 7, 11), Zn^{2+} (14, 15) и лигандов: 1 – 4 с Hydr, 5 – 8 с HydrHPv и 9 – 15 с HydrHSal (табл.), имеют разные мольные соотношения металл:лиганд и координационные числа.

Анализ полученных данных (рис. 1) показал, что значительное число из исследуемых комплексов (1, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13) (табл.), независимо от используемой концентрации, практически не оказывают влияния на эластазную активность пептидазы 1 *B. thuringiensis* var. *israelensis* ИМВ

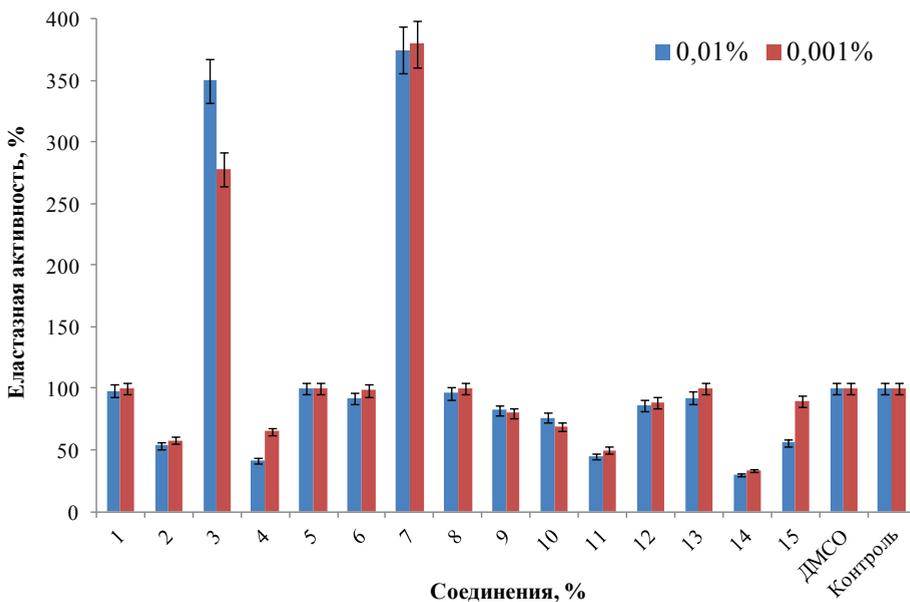


Рис. 1. Влияние координационных соединений на эластазную активность пептидазы 1 *B. thuringiensis* var. *israelensis* ИМВ В-7465

В-7465. Обращает на себя внимание то, что, как указано выше, они относятся к разным типам и, к тому же, существенно отличаются по составу, строению координационных узлов ионов-комплексобразователей, лигандных систем и характеру связей с ними (табл.). Из этого следует, что, несмотря на их присутствие, пептидаза 1 связывается с эластином, в результате чего возникает каталитически активная конформация, по отношению к которой структурные фрагменты молекул перечисленных разнообразных комплексов не проявляют комплементарности. Главную роль, по-видимому, играет выбор иона металла, поскольку на примере комплексов меди (II) было зафиксировано обратное действие. Оказалось, что комплексы 3 и 7 увеличивают эластазную активность фермента ~ в 3,5 раза (рис. 1). Состав координационного узла у них одинаковый, Cu (II) – пятикоординированная, несколько отличаются лигандные системы – Hydr (3) HydrHrv (7) (табл.). Немного более высокая активность последнего – 380% (независимо от концентрации), по-видимому, объясняется наличием вакантной карбоксильной группы Hrv, которая дополнительно за счет межмолекулярных водородных связей стабилизирует формирующуюся под действием эффектора каталитически активную конформацию пептидазы 1. Важно отметить, что при этом медный комплекс 11 (табл.), в отличие от 3 и 7, ~ на 50% уменьшает эластазную активность пептидазы 1 (рис. 1). Это указывает на то, что не только ион-комплексобразователь, но и молекулы комплексов в целом участвуют в процессе активирования, либо ингибирования фермента. Соединение 11 относится к внутрикислотным (3 и 7 – молекулярные хелаты, разнолигандные), его координационный узел формируют два бидентатно связанных лиганда (HydrSal), реализуется координационное число Cu(II), равное четырем. Вследствие возможной координации к ней функциональных групп фермента затрудняется его связывание с эластином и, как итог, подавляется ферментативная активность [3]. Дополнительное подтверждение тонкого влияния на эластазную активность пептидазы 1 любых изменений в составе комплексов было получено сравнением соединений Mn^{2+} (4, 8, 12, 13) с мольным соотношением Mn^{2+} :лиганд = 1:2, октаэдрическим полиэдром, но разных по типу и лигандному окружению. Из них только комплекс 4 проявил себя как ингибитор (59% при концентрации 0,01%), а остальные не оказывали влияния, как указано выше. Ингибирующую активность в пределах 70% – 30% проявили также комплексы Zn^{2+} (14 и 15) (рис. 1, табл.), отличающиеся составом и строением. Видимо, основная роль в этом случае принадлежит Zn^{2+} как комплексобразователю.

Закономерности влияния исследуемых комплексов на коллагеназную активность пептидазы 1 *B. thuringiensis* var. *israelensis* ИМВ В-7465 сохраняется такими же, как и на эластазную (рис. 2): соединения 1, 5, 6, 8, 9 инертны по отношению к ферменту и коллагену, то есть не мешают им стерически приспособляться друг к другу, соединения 10 – 15 незначительно ингибируют активность. По ингибирующей способности комплекс 4 > 2 (55% и 40% при концентрации 0,01% соответственно). Эти соединения по составу и строению одинаковые. Замена иона комплексобразователя Ni^{2+} (2) на Mn^{2+} (4) незначительно сказывается только на степени их влияния.

Аналогия просматривается и в поведении комплексов 3, 7 и 11: первые

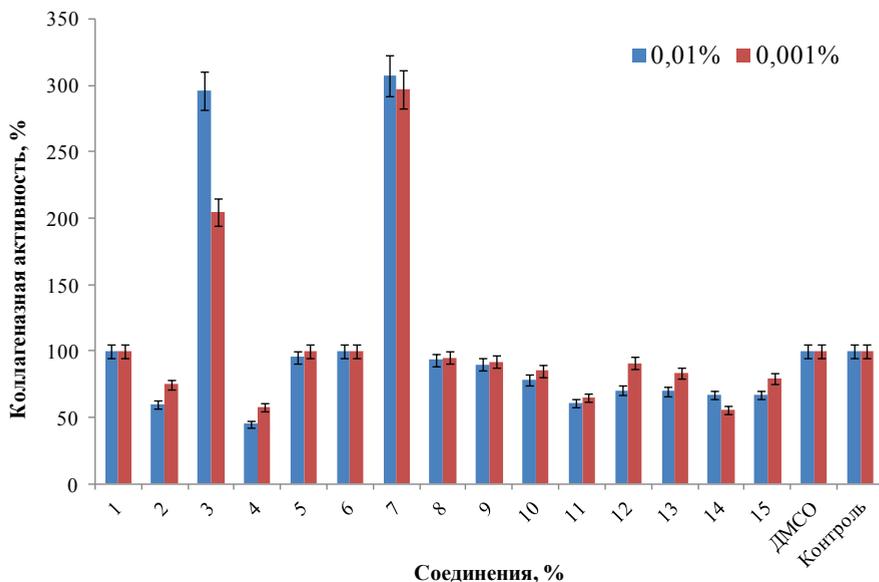


Рис. 2. Влияние координационных соединений на коллагеназную активность пептидазы 1 *B. thuringiensis* var. *israelensis* ИМВ В-7465

два увеличивают коллагеназную активность ~ в 3 раза, в то время как соединение 11, как и в случае эластазной активности, ингибирует коллагеназную активность ~ на 40%.

В случае пептидазы 2 общая картина и степень влияния исследуемых эффекторов (1 – 15) на эластазную активность существенно отличаются (рис. 3), что согласуется с ранее сделанным нами выводом [8, 9, 15, 16] о том, что природа энзима вносит свой вклад в изменение механизма его взаимодействия с субстратом и эффектором. Комплекс 3 повышает

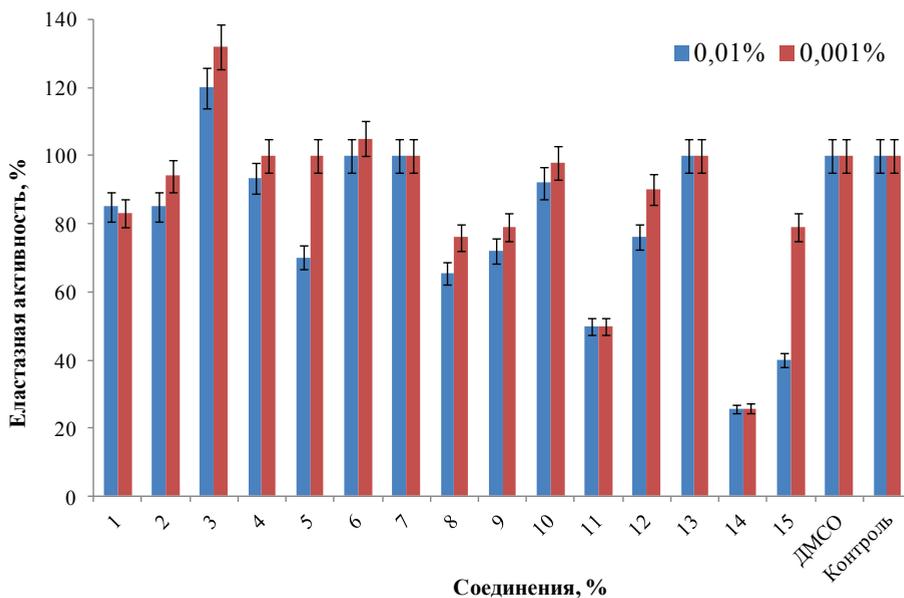


Рис. 3. Влияние координационных соединений на эластазную активность пептидазы 2 *B. thuringiensis* var. *israelensis* ИМВ В-7465

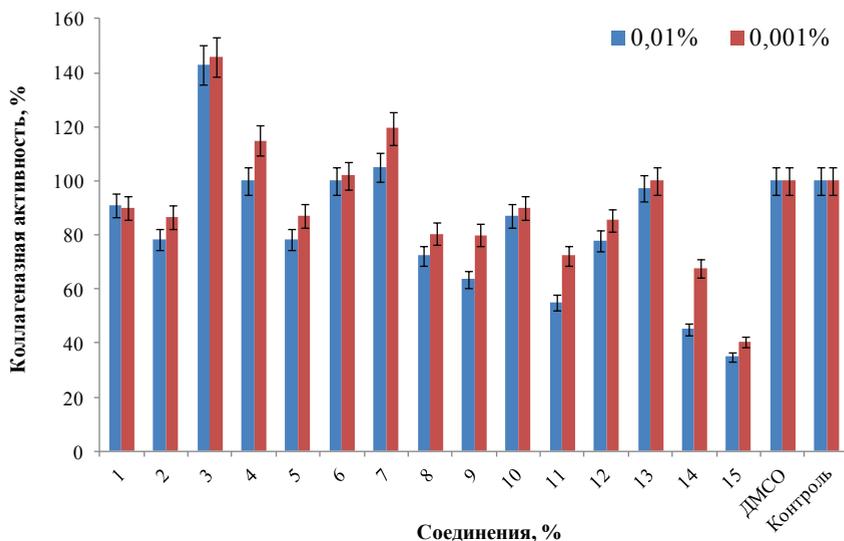


Рис. 4. Влияние координационных соединений на коллагеназную активность пептидазы 2 *B. thuringiensis* var. *israelensis* ИМВ В-7465

эластазную активность пептидазы 2, но в гораздо меньшей степени, чем пептидазы 1 (132%), соединение 7 практически не влияет, а 11 ингибирует активность на 50%. По ингибирующей способности комплексы формируют ряд: 14 > 15 > 11 > 8 > 5 = 9 > 12 > 1 = 2, т.е. наиболее эффективными ингибиторами эластазной активности пептидазы 2 оказались комплексы Zn^{2+} : уменьшение активности на 70% для 14 независимо от концентрации и на 60% (0,01%) и на 21% (0,001%) для соединения 15.

Характер влияния комплексов на коллагеназную активность пептидазы 2 (рис. 4) в общих чертах сохраняется таким же, как и на эластазную (рис. 3). Тем не менее, следует отметить, что по сравнению с пептидазой 1 (рис. 2), он существенно изменился. Увеличение активности для комплексов 3 и 7 значительно уменьшилось, при этом ингибирование 11 оказалось на том же уровне ~ 40%. Отмечено некоторое увеличение коллагеназной активности при использовании комплекса 4, что свидетельствует о различном механизме взаимодействия этого комплекса с пептидазой 1 и 2. Максимальную ингибирующую способность также проявили комплексы Zn^{2+} (14 и 15).

Сравнительный анализ данных (рис. 5) по влиянию исследуемых координационных соединений на фибринолитическую активность пептидазы 2 *B. thuringiensis* var. *israelensis* ИМВ В-7465 выявил особенности их влияния, которые заключались в том, что при использовании комплексов 3, 7, 10 в концентрации 0,001% наблюдалось увеличение активности энзима до 145%, 138%, 112% соответственно. По-видимому, в этом случае создаются оптимальные условия для образования тройного комплекса: фермент-эффектор-субстрат и формирования каталитически активной конформации энзима [18].

Таким образом, на основании анализа полученных данных можно заключить, что значительное число из исследуемых комплексов независимо от используемой концентрации практически не оказывают влияния на

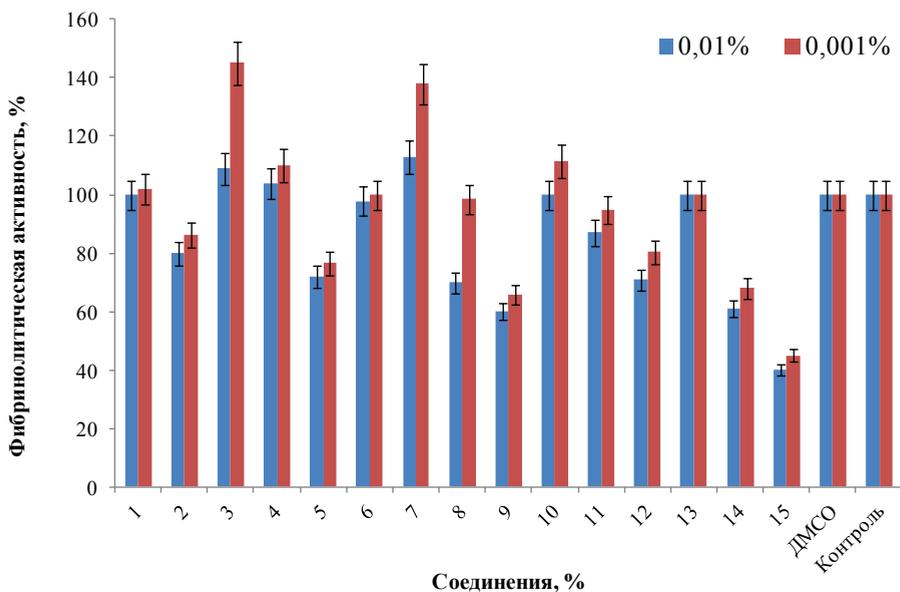


Рис. 5. Влияние координационных соединений на фибринолитическую активность пептидазы 2 *B. thuringiensis* var. *israelensis* ИМВ В-7465

эластазную и коллагеназную активность пептидазы 1 *B. thuringiensis* var. *israelensis* ИМВ В-7465. Некоторые из них инертны по отношению к ферменту и субстрату, то есть не мешают им стерически приспособляться друг к другу, в то время как другие соединения незначительно ингибируют активность. И только два соединения, содержащие ионы меди, но различные лиганды: гизадепам (соединение 3) и продукт его конденсации с пировиноградной кислотой (соединение 7) проявляли значительный стимулирующий эффект (почти в 3,5 раза). В случае пептидазы 2 общая картина и степень влияния исследуемых эффекторов на эластазную и коллагеназную активность существенно отличаются: соединения 3 и 7 в значительно меньшей степени (лишь в 1,3-1,4 раза) стимулируют их активность. Что касается влияния исследуемых координационных соединений на фибринолитическую активность пептидазы 2 *B. thuringiensis* var. *israelensis* ИМВ В-7465, то результаты свидетельствуют о том, что при использовании комплексов 3 и 7 в концентрации 0,001% наблюдалось увеличение активности энзима до 145% и 138% соответственно.

В заключение следует отметить, что изучение процессов взаимодействия эффектор-фермент-субстрат имеет важное как теоретическое, так и прикладное значение, с учетом специфики соединений 1 – 15, которые представляют собой химически модифицированные формы лекарственных средств.

**Л.Д. Варбанець¹, Н.А. Нідялкова¹, І.І. Сейфулліна²,
А.В. Пуля², Л.С. Скороход²**

¹ Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Акад. Заболотного, 154, 03143, Київ, Україна

² Одеський національний університет ім. І.І. Мечнікова,
вул. Дворянська, 2, 65082, Одеса, Україна

**МОДИФІКАЦІЯ АКТИВНОСТІ ПЕПТИДАЗ *BACILLUS*
THURINGIENSIS VAR. *ISRAELENSIS* IMB B-7465
ГІДРАЗИД/ГІДРАЗОННИМИ КОМПЛЕКСАМИ 3d-МЕТАЛІВ**

Мета. Дослідити вплив на активність пептидази 1 і пептидази 2 *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMB B-7465 15-ма біокомплексами іонів 3d-металів (Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) з “гідазепамом” – 2-(7-бром-2-оксо-5-феніл-2,3-дигідро-1H-1,4-бенздіазепин-1-ил) ацетогідразидом (Hydr) та продуктами його конденсації з пірвіноградною кислотою (HPv) і саліциловим альдегідом (HSal). По типу їх можна розділити на три групи: різнолігандні молекулярні, різнолігандні внутрішньокомплексні, одноріднолігандні внутрішньокомплексні. **Методи.** Використовували методи ідентифікації еластазної, колагеназної і фібринолітичної активності. **Результати.** Аналіз одержаних даних показав, що значна кількість із досліджуваних комплексів незалежно від використаних концентрацій практично не впливають на еластазну і колагеназну активність пептидази 1 *B. thuringiensis* var. *israelensis* IMB B-7465. Деякі з них інертні по відношенню до ферменту і субстрату, тобто не перешкоджають їм стерично пристосовуватися один до одного, в той час як інші сполуки в незначній мірі інгібують активність. І тільки дві сполуки, які містять іон міді, але різні ліганди – гідазепам (сполука 3) і продукт його конденсації з пірвіноградною кислотою (сполука 7) – проявляли значний стимулюючий ефект (майже в 3,5 рази). У випадку пептидази 2 загальна картина і ступінь впливу досліджуваних ефекторів на еластазну і колагеназну активність суттєво відрізняються: сполуки 3 і 7 в значно меншій ступені стимулюють їх активність (лише в 1,3-1,4 рази). Аналіз даних щодо впливу досліджуваних координаційних сполук на фібринолітичну активність пептидази 2 *B. thuringiensis* var. *israelensis* IMB B-7465 показав, що при використанні комплексів 3 і 7 в концентрації 0,001% спостерігалось підвищення активності ензиму до 145% і 138% відповідно. **Висновки.** Показано, що природа ензиму вносить свій вклад у зміну механізму його взаємодії з субстратом і ефектором.

Ключові слова: пептидаза 1 і пептидаза 2 *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMB B-7465, біокомплекси іонів 3d-металів (Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) з “гідазепамом” і продуктами його конденсації з пірвіноградною кислотою (HPv) і саліциловим альдегідом (HSal).

**L.D. Varbanets¹, N.A. Nidialkova, I.I. Seifullina²,
A.V. Pulia², L.S. Skorokhod²**

¹ Institute of Microbiology and Virology. DK Zabolotny NASU,
Str. Academician Zabolotny, 154, Kyiv 03143, Ukraine

² Odessa National Mechnykov University, Dvoryanska str. 2, Odessa, 65082, Ukraine

**MODIFICATION *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *ISRAELENIS*
IMV B-7465 PEPTIDASE ACTIVITY BY HYDRAZIDE/HYDROZONE
COMPLEXES OF 3d-METALS**

Goal. To study the influence on the activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465 peptidase 1 and 2 peptidase of 15 biocomplexes ions 3d-metal (Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) with “gidazepam” - 2-(7-Bromo-2-oxo-5-phenyl-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-1-yl)acetohydrazide (Hydr) and condensation products thereof with pyruvic acid (HPv) and salicylic aldehyde (HSal). According to the type its can be divided into three groups: mixed-ligand molecular, mixed-ligand inner complexes, ligand identical inner complexes. **Methods.** We used methods of determining elastase, collagenase and fibrinolytic activity. **Results.** Analysis of the data showed that a significant number of the investigated complexes regardless of the concentration of virtually no effect on elastase and collagenase activity *B. thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465 of peptidase 1. Some of them are inert to the enzyme and the substrate, that is, they do not interfere sterically adapt to each other, while the other compounds significantly inhibit activity. Only two compounds containing copper ions but different ligands: hidazepam (compound 3) and its condensation product with pyruvic acid (compound 7) showed a significant stimulatory effect (about 3.5 times). In the case of peptidase 2 overall picture and the degree of influence on the study of effector elastase and collagenase activity significantly different: the compounds 3 and 7 to a lesser extent stimulate their activity (1.3-1.4-fold). Analysis of data on the effect of the test compounds on fibrinolytic activity of *B. thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465 peptidase 2 has shown that by using complexes 3 and 7 at a concentration of 0.001% the enzyme activity increased to 145% and 138% respectively. **Conclusions.** It is shown that the nature of the enzyme contributes to the change in the mechanism of interaction with the substrate and effector.

Keywords: peptidase 1 and 2 peptidase of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465, biocomplexes ions of 3d-metals (Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) with “gidazepam”

1. Andronati S.A., Voronina T.A., Golovenko N.Ya. et al. Hydazepam. Kiev. Naukova dumka, 1992. 200 p. Russian.
2. Bondarchyuk A.A., Azhitskii G.Yu. [Characteristics of enzyme complex from *Bacillus mesentericus*]. Mikrobiol. Z. 1981; 43(6):687-690. Russian
3. Hugh J. Inorganic chemistry. The structure of compounds and reaction ability. M.: Chemistry. 1987. 696 p. Russian
4. Koltukova N. V, Vaskivniuk V. T. [Selection of methods for the isolation of the proteolytic complex from *Bacillus mesentericus* 316m at deep cultivation]. Mikrobiol. Z. 1980; 42(2): 245 – 248. Russian.
5. Lipscomb W. N., Hartsuck J.A, Rieke G.N., Quijcho F.A., Noda L.P., Cleland W.W. Brookhaven.Symp.Biol., 21, 24 (1968).

6. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193(2): 265 – 275.
7. Masada M. Determination of the thrombolytic activity of Natto extract. *Food style.* – 2004; 8(1): 92 – 95.
8. Matselyukh O.V., Nidialkova N.A., Varbanets L.D. [Purification and physic-chemical properties of *Bacillus thuringiensis* IMV B-7324 peptidase with elastolytic and fibrinolytic activity]. *Ukr. Biokhim. Z.* 2012; 84(6): 25-36. Ukrainian.
9. Mediantseva E.P., Vertlyb M.G., Budnikova G.K. *Metal ions as enzymes effectors.* *Uspechi khimii.* 1998; 67(3): 252-260. Russian
10. Nidialkova N. A., Varbanets L. D., Chernyshenko V. O. Isolation and purification of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* IMV B-7465 peptidase with specificity toward elastin and collagen. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2016; 88(3) 18 – 28.
11. Pulya A.V., Seifullina I.I., Skorokhod L.S., Efimov N.N., Ugolkova E.A., Minin V.V. [Synthesis and Characterization of Mn(II) Coordination Compounds with 2-(7-Bromo-2-oxo-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-1-yl)acetohydrazide and Its Condensation Product with Pyruvic Acid]. *Russ. J. Inorg. Chem.* 2015; 60. (1): 51-54. Russian
12. Pulya A.V., Seifullina I.I., Skorokhod L.S., Vlasenko V.G., Levchenkov S.I., Pavlovskii V.I. [Characterization of the Coordination Compounds of Co(II) and Ni(II) with 2-(7-Bromo-2-oxo-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-1-yl)acetohydrazide and Condensation Product with Pyruvic Acid]. *Russ. J. General. Chem.* 2015; 85(1): 105 – 111. Russian
13. Pulya A.V., Seifullina I.I., Skorokhod L.S., Vlasenko V.G., Zubavichus Y.V. Levchenkov S.I. [Self-assembly in the MnX₂ – 2-(7-Bromo-2-oxo-5-phenyl-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-1-yl)acetohydrazide – Salicylic Aldehyde systems: composition, structure, and properties of the products]. *Russ. J. General. Chem.* 2015; 85(5): 831 – 837. Russian
14. Pulya A.V., Seifullina I.I., Skorokhod L.S., Efimov N.N., Ugolkova E.A., Minin V.V. [Copper(II) Coordination Compounds with 2-(7-Bromo-2-oxo-5-phenyl-3H-1,4-benzodiazepin-1-yl)acetohydrazide and Products of Its Condensation with Pyruvic Acid]. *Russ. J. General. Chem.* 2016; 61(1): 41 – 45. Russian
15. Trombridg G. O., Moon H. D. Purification of human elastase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1972; 141(3): 928-931.
16. Varbanets L.D., Matselyukh O.V., Nidialkova N.A., Avdiyuk K.V., Gudzenko O.V., Seifullina I.I., Masanovets G.N., Khitrich N.V. [The coordination compounds of cobalt (II, III) with dithiocarbamic acid derivatives – modifiers of hydrolytic enzyme activity]. *Biotechnologia Acta.* 2013; 6(1): 73-80. Ukrainian.
17. Varbanets L.D., Matselyukh O.V., Seifullina I.I., Khitrich N. V., Nidialkova N.A., Gudzenko O.V. [Complexes of cobalt (II, III) with dithiocarbamic acid derivatives – effectors of *Bacillus thuringiensis* peptidase and *Eupenicillium erubescens* and *Cryptococcus albidus* α -L-rhamnosidases]. *Ukr. Biokhim. Z.* 2014; 86(3): 49–60. Ukrainian.
18. Varbanets L. D., Nidialkova N. A., Borzova N. V., Seifullina I. I., Martsinko E. E., Chebanenko E. A. Complexes of biscitratogermanates and biscitratostanates with metals are modifiers of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* peptidases and *Penicillium canescens*, *Cladosporium cladosporioides* and *Aspergillus niger* α -galactosidases activities. *Biotechnologia acta.* 2016; 9(3): 52-60.

Отримано 19.09.2016