

©Коллектив авторов

## ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ПРОТЕАЗЫ МИКРОМИЦЕТА *ASPERGILLUS OCHRACEUS* ВКМ F-4104D ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ПРОТЕИНА С В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

А.А. Осмоловский<sup>1\*</sup>, А.В. Орехова<sup>1,2</sup>, В.Г. Крейер<sup>1</sup>, Н.А. Баранова<sup>1</sup>, Н.С. Егоров<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119234, Москва, ул. Ленинские горы д. 1, стр. 12; эл. почта: aosmol@mail.ru

<sup>2</sup>Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

<sup>3</sup>Международный биотехнологический центр Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Показано, что активаторная активность протеина С, определенная в нормальной плазме с использованием протеазы *Aspergillus ochraceus*, сравнима с активностью коммерческого аналога – протеазы из яда южно-американского щитомордника (препарат Protac®). Выявлено, что аналогично препарату Protac® протеаза *A. ochraceus* может быть использована для определения содержания протеина С в плазме с его пониженным содержанием. Сравнение активаторной к протеину С активности протеазы *A. ochraceus* и коммерческого аналога из яда змеи показало некоторое превышение активаторной активности “грибного” препарата, что может сделать его перспективным заменителем змеиного активатора в диагностикмах для определения содержания протеина С в клинических лабораториях.

**Ключевые слова:** протеиназы микромицетов, активаторы протеина С, диагностика протеина С

**DOI:** 10.18097/PBMC20186401115

### ВВЕДЕНИЕ

Недостаточность содержания антикоагулянтного белка плазменного гемостаза – протеина С – является серьезным фактором риска венозных тромбозов и ведет к высокому риску возникновения тромботических осложнений вплоть до летальных исходов. Уменьшение его содержания ассоциировано с глубоким тромбозом вен, лёгочным эмболизмом, тромбофлебитами и диссеминированным внутрисосудистым свертыванием. Содержание этого белка в плазме менее 20% практически несовместимо с жизнью [1, 2]. В настоящее время для определения его содержания в плазме крови используются протеолитические ферменты, получаемые из яда южно-американского щитомордника *Agkistrodon contortrix contortrix*, на основе которых был разработан диагностический препарат Protac® (“Pentapharm”, Швейцария) [3]. Инкубация протеина С с активатором из *Agk. contortrix contortrix* приводит в результате ограниченного протеолиза к превращению протеина С в его активную форму – активированный протеин С, который расщепляет специфический хромогенный пептидный субстрат pGlu-Pro-Arg-pNA (S-2366) с высвобождением свободного pNA, концентрация которого прямо пропорциональна концентрации протеина С в образце [4].

В последнее время была обнаружена и исследована внеклеточная протеаза – активатор протеина С, продуцируемая микроскопическим грибом *Aspergillus ochraceus* ВКМ F-4104D [5, 6]. Изучение свойств этой протеазы показало, что фермент обладает узкой субстратной специфичностью, не гидролизует большинство хромогенных субстратов протеаз. Сравнение свойств протеазы, образуемой *A. ochraceus*, и фермента из яда

змеи *Agk. contortrix contortrix* показало, что они близки по свойствам, однако протеаза из культуральной жидкости микромицета не гликозилирована и способна гидролизовать хромогенный субстрат плазмина [7]. В связи с этим большой интерес представляет выявление возможности её применения для определения содержания протеина С в плазме крови в сравнении с протеазой препарата Protac®.

### МЕТОДИКА

Для проведения исследования были использованы протеазы – активаторы протеина С из культуральной жидкости микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D и яда южно-американского щитомордника Protac® (“Pentapharm”) и лиофилизированные плазмы крови человека с различными характеристиками (НПО “Ренам”, Россия): плазма с параметрами системы гемостаза в пределах нормы, плазма крови человека с искусственно сниженными параметрами системы гемостаза и плазма крови человека со сниженным уровнем протеина С.

Протеаза *A. ochraceus* ВКМ F-4104D была получена путём осаждения белков культуральной жидкости [8] сульфатом аммония до 80%-ной степени насыщения на холоду (4°C, 24 ч), с последующим их отделением центрифугированием (15000 g, 4°C, 25 мин), перерастворением в минимальном объёме 0,005 М Трис-НСl буфера, рН 8,2 и диализа против этого же буфера (4°C, 12 ч). Отдиализованный от ионов сульфата аммония раствор белков центрифугировали при тех же условиях для удаления нерастворимой части осадка, и затем белки супернатанта разделяли методом изоэлектрофокусирования в колонке объёмом 110 мл (“LKB”, Швеция) в градиенте плотности сахарозы 0-40% по методу Вестерберга

\* - адресат для переписки

## ПРИМЕНЕНИЕ ПРОТЕАЗЫ *A. OCHRACEUS* ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОТЕИНА С

(800 В, 4°C, 36 ч) [9], используя амфолины фирмы “ЛКВ” с рН 4-9, после чего содержимое колонки собирали по фракциям объёмом 1,5 мл с помощью коллектора фракций (“ЛКВ”). Для работы отбирали фракции с рI 5,7-6,2, содержащие искомую протеазу [2]. Гомогенность выделенного белка была подтверждена денатурирующим электрофорезом в полиакриламидном геле (метод Лэммли). Для очистки фермента от амфолинов и одновременного концентрирования 500 мкл фракции переносили в мембранные концентраторы Microcon Ultracel 30 для эппендорфов (“Millipore”, США) и центрифугировали (12400 g, 10 мин). Далее супернатант сливали, а ретентат собирали в новый эппендорф и повторно центрифугировали (1000 g, 1 мин) в соответствии с инструкцией производителя. В ретентате определяли белок и активаторную к протеину С активность.

Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по поглощению при 280 нм. Раствор белка, имеющий поглощение при данной длине волны в кювете с длиной пути 1 см равное 1,00, содержал в 1 мл одну оптическую единицу (о.е.,  $A_{280}$ ) [10].

Активность активатора протеина С определяли по модифицированному методу В.Г. Крейер, прединкубируя 200 мкл пробы белка *A. ochraceus* или Protac® с 50 мкл разведённой в два раза 0,05 М Трис-НСI буфером, рН 8,2 соответствующей плазмы крови в течение 5 мин на термошейкере BioSan TS-100 (Латвия) при температуре  $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . По истечении 5 мин в смесь вносили 100 мкл хромогенного субстрата S-2366 (pGlu-Pro-Arg-pNA, 0,5 мг/мл) и продолжали инкубацию ещё в течение 5 мин. Реакцию останавливали добавлением 200 мкл 50% уксусной кислоты. Количество высвободившегося *n*-нитроанилина измеряли на спектрофотометре Hitachi 200-20 (Япония) при длине волны 405 нм [5].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Протеаза *A. ochraceus* представляет значительный интерес как возможный активный компонент диагностикумов для определения содержания протеина С. В связи с этим сравнивали активность этого фермента по отношению к протеину С с активностью протеазы из яда змей, входящей в состав препарата Protac® (рис. 1). Из рисунка 1 видно, что удельная активность протеазы *A. ochraceus* сопоставима с активностью змеиного активатора и даже несколько её превышает.

Возможность применения протеазы *A. ochraceus* для диагностики протеина С в плазме была показана с использованием необходимых по существующим протоколам реагентов. Для этого были построены калибровочные графики с использованием лиофилизированной плазмы крови человека с параметрами системы гемостаза в пределах нормы в различных разведениях. На рисунке 2А представлена стандартная кривая, полученная при использовании в качестве активного компонента диагностического набора препарат Protac®, по которой проводят в клиниках определение

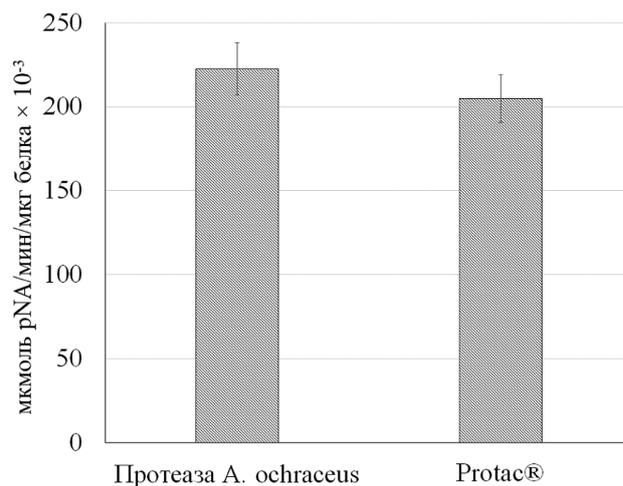


Рисунок 1. Активаторная к протеину С активность протеаз *Aspergillus ochraceus* и препарата Protac®.

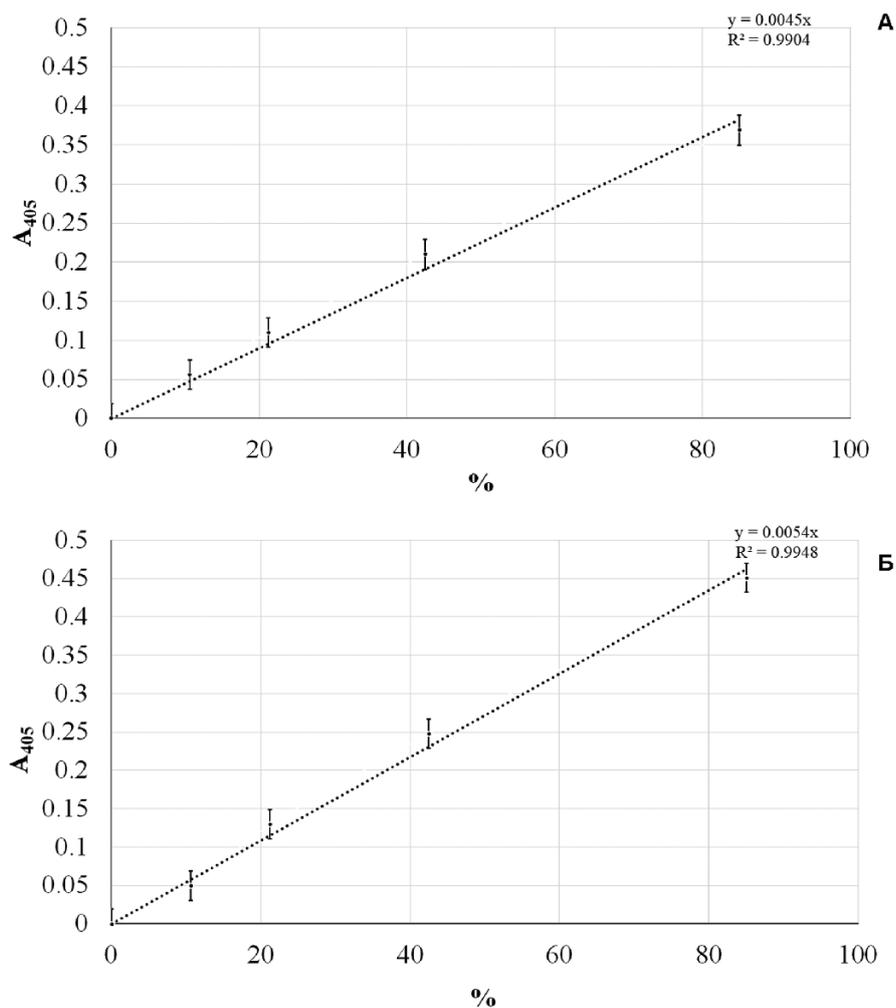
содержания протеина С в плазме крови. Аналогичный калибровочный график был получен с использованием в качестве активного компонента протеазы *A. ochraceus* (рис. 2Б). Видно, что он также линеен, но отличается по своему уравнению от калибровочного графика с использованием Protac®: значения активности от концентрации протеина С оказались несколько большими. Таким образом, зависимость активаторной к протеину С активности протеазы *A. ochraceus* от концентрации плазмы (содержания протеина С) имеет концентрационнозависимый характер.

Проверка применимости построенных калибровочных графиков для выявления содержания протеина С возможна путём проведения соответствующих реакций с плазмами с искусственно сниженным содержанием этого компонента или дефицитным по нему.

В таблице представлены данные по определению активаторной к протеину С активности протеазы *A. ochraceus* с плазмами крови с разным содержанием протеина С в сравнении с препаратом Protac®. Как видно из таблицы, активаторная активность протеазы *A. ochraceus* сопоставима с активностью к протеину С, определяемой с помощью препарата Protac®. При сравнении с паспортами плазм, использованных в работе, уровень содержания протеина С в использованных плазмах крови достоверно определяется как с помощью протеазы из яда змеи, так и протеазы *A. ochraceus*. Полученные данные свидетельствуют о том, что протеаза микроциста может быть применима в составе диагностического набора для определения содержания протеина С в плазме крови пациентов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Таким образом, показано, что активаторная активность протеина С, определенная в нормальной плазме по стандартной методике с использованием протеазы *A. ochraceus*, сравнима с активностью



**Рисунок 2.** А) Калибровочная кривая с лиофилизированной плазмой крови человека с параметрами системы гемостаза в пределах нормы (препарат Protac®, хромогенный субстрат S-2366). Б) Калибровочная кривая с лиофилизированной плазмой крови человека с параметрами системы гемостаза в пределах нормы (протеаза *Aspergillus ochraceus*, хромогенный субстрат S-2366).

**Таблица.** Активаторная активность коммерческого диагностикума и протеазы *Aspergillus ochraceus*, определяемая с плазмами со сниженными параметрами системы гемостаза

Параметр	Содержание протеина С, %		
	В соответствии с паспортом	Определённое с активатором протеина С (препарат Protac®)	Определённое с протеазой <i>Aspergillus ochraceus</i>
Нормальная плазма	85±9	85±3	85±2
Плазма патологическая (с искусственно сниженными параметрами системы гемостаза)	34±5	32,7±5	31,5±5
Плазма со сниженным уровнем протеина С	57±10	51±10	53,3±10

коммерческого аналога – препарата Protac®. Выявлено, что протеаза *A. ochraceus* может быть использована для определения протеина С в плазмах с его пониженным содержанием аналогично препаратам Protac®. Сравнение активаторной к протеину С активности протеаз *A. ochraceus* и препарата из яда южно-американского щитомордника показало некоторое превышение активаторной активности грибного препарата, что может сделать

его перспективным заменителем змеиного активатора в диагностикумах для определения содержания протеина С в клинических лабораториях.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (Соглашение № 7691ГУ2/2015).

ЛИТЕРАТУРА

1. Griffin J.H., Zlokovich B.V., Mosnier L.O. (2012) Int. J. Hematol., **95**(4), 333-345.
2. Barranco-Medina S., Murphy M., Pelc L., Chen Z., Di Cera E., Pozzi N. (2017) Scientific Reports, **7**, 44596.
3. Stoker K., Fisher H., Meier J., Brogli M., Svedsen L. (1987) Toxicon, **25**(3), 239-252.
4. Gempeler-Messina P.M., Müller C. (2006) Toxin Rev., **25**(4), 335-349.
5. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Кураков А.В., Баранова Н.А., Егоров Н.С. (2012) Прикл. биохим. микробиол., **48**(5), 537-542.
6. Звонарева Е.С., Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Котова И.Б., Егоров Н.С. (2015) Биоорган. химия, **41**(5), 559-564.
7. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Кураков А.В., Егоров Н.С. (2015) Прикл. биохим. микробиол., **51**(1), 86-92.
8. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Кураков А.В., Егоров Н.С. (2013) Прикл. биохим. микробиол., **49**(6), 580-586.
9. Vesterberg O. (1972) Biochem. Biophys. Acta, **257**(1), 11-19.
10. Gertler A., Trop M. (1971) Eur. J. Biochem., **19**(1), 90-96.

Поступила: 11. 10. 2017.  
Принята к печати: 17. 10. 2017.

POSSIBILITY OF APPLICATION OF EXTRACELLULAR PROTEASE OF MICROMYCET *ASPERGILLUS OCHRACEUS* VKM F-4104D FOR DETERMINATION OF PROTEIN C CONTENT IN HUMAN BLOOD PLASMA

A.A. Osmolovskiy<sup>1</sup>, A.V. Orekhova<sup>1,2</sup>, V.G. Kreyer<sup>1</sup>, N.A. Baranova<sup>1</sup>, N.S. Egorov<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Biological Faculty of Lomonosov Moscow State University,  
1-12 Lenin Hills, Moscow, 119234 Russia; e-mail: aosmol@mail.ru

<sup>2</sup>Faculty of Fundamental Medicine of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>3</sup>International Biotechnology Center of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

It was shown that the activator activity of protein C, determined in normal plasma using *Aspergillus ochraceus* protease, is comparable with the activity of commercial protease analogue from the South American copperhead venom (Protac®). It was found that protease of *A. ochraceus* can be used to determine protein C in plasma with its reduced content similar to Protac®. Comparison of the activator protein C activity of *A. ochraceus* protease and the commercial analogue showed some excess of the activator activity of the fungal preparation, which may make it a promising substitute for the snake activator in diagnostic kits for determining the protein C content in clinical laboratories.

**Key words:** proteases of micromycetes, activators of protein C, diagnosis of protein C