Биомедицинская химия, 2018 том 64, вып. 1, с. 115-118.

©Коллектив авторов

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

А.А. Осмоловский[1]*, А.В. Орехова[1,2], В.Г. Крейер[1], Н.А. Баранова[1], Н.С. Егоров[3]

[1]Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119234, Москва, ул. Ленинские горы д. 1, стр. 12; эл. почта: aosmol@mail.ru
[2]Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова
[3]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 диагностикумах 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 гидролизуя 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 насыщении на холоду (4°С, 24 ч), с последующим их отделением центрифугированием (15000 *g*, 4°С, 25 мин), перерастворением в минимальном объёме 0,005 М Трис-HCl буфера, pH 8,2 и диализа против этого же буфера (4°С, 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

(800 В, 4°С, 36 ч) [9], используя амфолины фирмы "LKB" с pH 4-9, после чего содержимое колонки собирали по фракциям объёмом 1,5 мл с помощью коллектора фракций ("LKB"). Для работы отбирали фракции с pI 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-HCl буфером, pH 8,2 соответствующей плазмы крови в течение 5 мин на термошейкере BioSan TS-100 (Латвия) при температуре 37±0,1°С. 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

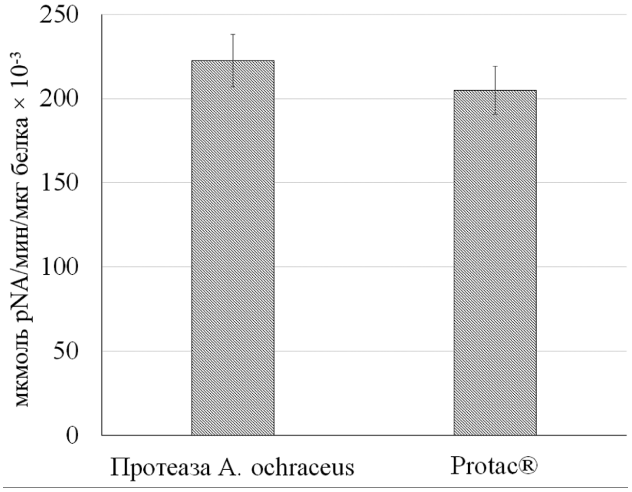

Рисунок 1. Активаторная к протеину С активность протеаз *Aspergillus ochraceus* и препарата Protac®.

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 микромицета 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

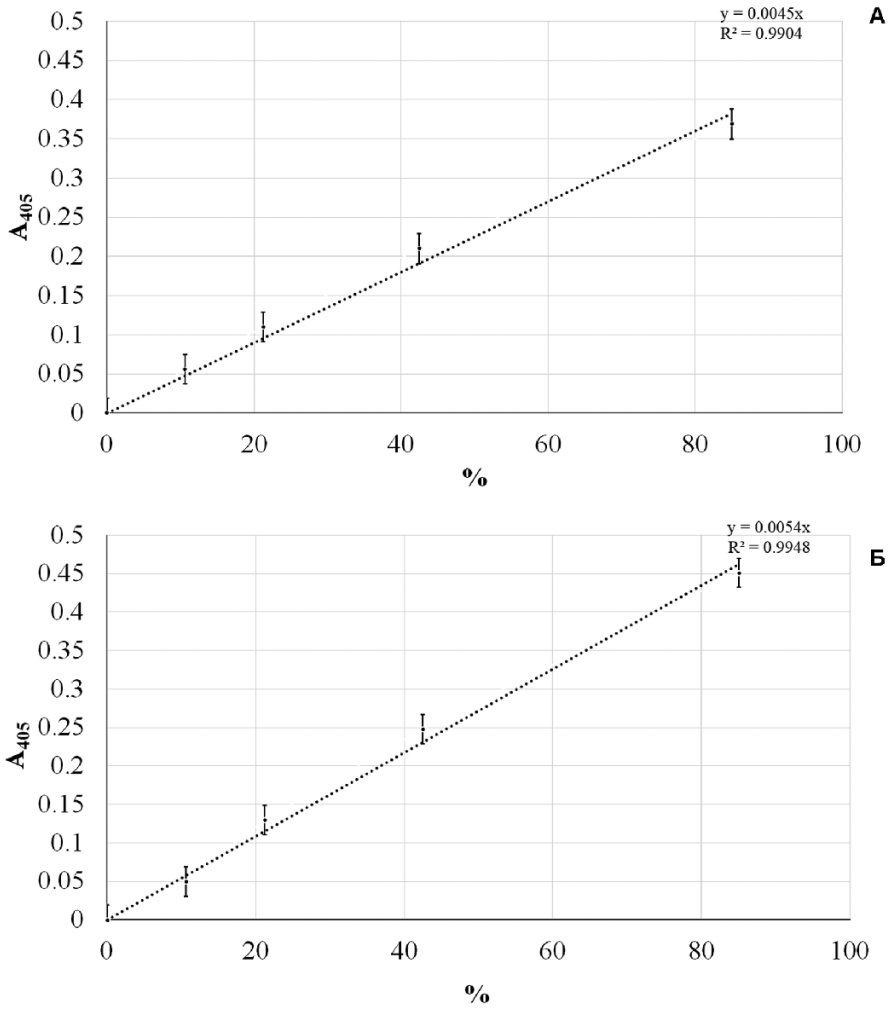

Рисунок 2. А) Калибровочная кривая с лиофилизированной плазмой крови человека с параметрами системы гемостаза в пределах нормы (препарат Protac®, хромогенный субстрат S-2366). Б) Калибровочная кривая с лиофилизированной плазмой крови человека с параметрами системы гемостаза в пределах нормы (протеаза *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 *Aspergillus ochraceus*
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[1], A.V. Orekhova[1,2], V.G. Kreyer[1], N.A. Baranova[1], N.S. Egorov[3]

[1]Biological Faculty of Lomonosov Moscow State University,
1-12 Lenin Hills, Moscow, 119234 Russia; e-mail: aosmol@mail.ru
[2]Faculty of Fundamental Medicine of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
[3]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 diagnostical kits for determining the protein C content in clinical laboratories.

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