

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 61:577.152.344

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ПРОТЕАЗЫ МИКРОМИЦЕТА *ASPERGILLUS OCHRACEUS* ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ФАКТОРА X В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКАА.В. Орехова¹, А.А. Осмоловский^{1,*}, В.Г. Крейер¹, Н.А. Баранова¹, Н.С. Егоров²

¹Кафедра микробиологии, биологический факультет и ²Международный биотехнологический центр, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы д. 1, стр. 12

*e-mail: aosmol@mail.ru

Показано, что активность фактора X, определенная в нормальной плазме с помощью протеазы *Aspergillus ochraceus*, сравнима с активностью, оцениваемой при использовании коммерческого аналога – протеазы из яда гадюки Рассела (препарат RVV-X[®]). Выявлено, что протеаза *A. ochraceus* наряду с препаратом RVV-X[®] может быть применена для определения концентрации фактора X в плазме с его пониженным содержанием. Исследование активаторной по отношению к фактору X активности протеазы *A. ochraceus* показало, что она несколько выше по сравнению с активностью препарата из яда змеи. Это может сделать протеазу *A. ochraceus* перспективным заменителем змеиного активатора в диагностикумах для определения содержания фактора X.

Ключевые слова: протеолитические ферменты, активаторы фактора X, диагностика фактора X, препарат RVV-X[®], протеазы аспергиллов, патологическая плазма

Фактор X – сериновая эндопротеаза, играющая одну из ключевых ролей в системе гемостаза. В процессе свертывания крови активированный фактор X является одним из компонентов протромбиназы, превращающей протромбин в тромбин [1]. При дефиците фактора X возникают экхимозы, петехиальные кровоизлияния, гематомы, продолжительные кровотечения из слизистых оболочек пищеварительного тракта [2]. В связи с этим стоит необходимость длительного мониторинга концентрации фактора X в плазме крови. Кроме того, динамический контроль уровня фактора X необходим при лечении низкомолекулярными гепаринами тромбозомболических осложнений, инфарктов и инсультов [3].

Для проведения диагностики содержания фактора X в кровотоке используют специфическую протеазу из яда гадюки Рассела *Daboia russellii* [4]. На ее основе был разработан препарат RVV-X[®] («Pentapharm», Швейцария). Инкубация фактора X с протеазой-активатором из яда *D. russellii* приводит в результате ограниченного протеолиза к превращению фактора X в его активную форму – активированный фактор X, который расщепляет специфический хромогенный пептидный субстрат Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA (S-2765) по связи

аргинил-*n*-нитроанилид. Концентрация отщепившегося в результате реакции *n*-нитроанилина (pNA) прямо пропорциональна концентрации фактора X в образце [4].

Исследования последних лет показывают, что в качестве активаторов проферментов системы гемостаза, альтернативных змеиным, могут быть использованы протеазы, образуемые микромицетами [5]. Так, внеклеточные протеазы *Aspergillus ochraceus* могут активировать протеин C плазмы крови человека аналогично протеазе южноамериканского щитомордника, используемой в диагностике этого белка. Данные протеазы сопоставимы по активности и сходны по ряду свойств [6]. Наряду с активностью по отношению к протеину C, протеазы микромицета *A. ochraceus* обладают и активаторной по отношению к фактору X активностью, поэтому большой интерес представляет выявление возможности их применения для определения содержания фактора X в плазме крови наряду с протеазой препарата RVV-X[®]. Поскольку к настоящему времени неактивный рекомбинантный фермент из яда гадюки получить не удалось, использование альтернативного фермента-активатора фактора X представляется весьма перспективным.

Материалы и методы

В исследовании были использованы протеазы с активаторной по отношению к фактору X активностью из культуральной жидкости микромицета *A. ochraceus* ВКМ F- 4104 (получены на кафедре микробиологии МГУ имени М.В. Ломоносова) и препарата из яда гадюки Рассела RVV-X® («Pentapharm», Швейцария), а также лиофилизированная плазма 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, дефицитная по фактору X.

Получение внеклеточной протеазы продуцента.

Получение протеазы *A. ochraceus* осуществляли в несколько этапов. Сначала проводили осаждение белков из культуральной жидкости сульфатом аммония до 80%-ной степени насыщения на холоду (4°C, 24 ч) с дальнейшим их отделением центрифугированием (15000 g, 4°C, 25 мин) [7]. Затем полученный осадок внеклеточных ферментов перерастворяли в минимальном объеме 0,005М Трис-НСl буфера (рН 8,2) и диализовали против этого же буфера (4°C, 12 ч). Полученный раствор белков центрифугировали при тех же условиях для удаления нерастворимой части осадка. Далее белки супернатанта подвергали изоэлектрофокусированию в колонке объемом 110 мл («ЛКВ», Швеция) в градиенте плотности сахарозы 0–40% по методу Вестерберга (800 В, 4°C, 36 ч), используя амфолины фирмы «ЛКВ» (Швеция) с рН 4–9. Содержимое колонки собирали по фракциям объемом 1,5 мл с помощью коллектора фракций («ЛКВ», Швеция). Фракции с рI 5,7–6,2, содержащие искомым протеазу, были отобраны для дальнейшей работы [8]. С целью подтверждения гомогенности выделенного белка был проведен денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле по методу Лэммли. Очистку протеаз от амфолинов и одновременное концентрирование фракции проводили в мембранных концентраторах Microcon Ultracel 30 для эппендорфов («Millipore», США) в соответствии с инструкцией: 500 мкл фракции переносили в мембранные концентраторы и центрифугировали (12400 g, 10 мин). Далее супернатант сливали, а ретентат собирали в новый эппендорф и повторно центрифугировали (1000 g, 1 мин) [6]. В пробе проводили определение белка и активаторной по отношению к фактору X активности.

Определение белка. Концентрацию белка определяли 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., A280) [9].

Определение ферментативной активности.

Активность активатора фактора X определяли, проводя прединкубацию 200 мкл пробы белка *A. ochraceus* или RVV-X® с 50 мкл разведенной в два раза 0,05 М Трис-НСl буфером (рН 8,2) соответствующей плазмы крови в течение 5 мин на термостатической бане BioSan TS-100 (Латвия) при температуре 37±0,1°C. Через 5 мин в смесь вносили 100 мкл хромогенного субстрата Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA (S-2765) и продолжали инкубацию еще в течение 5 мин. Реакцию останавливали добавлением 200 мкл 50%-ной уксусной кислоты. Количество высвободившегося *n*-нитроанилина измеряли на спектрофотометре «Hitachi 200-20» (Япония) при длине волны 405 нм [10]. За единицу активности (Е) принимали количество мкмоль отщепившегося за 1 мин *n*-нитроанилина в 1 мл пробы.

Построение калибровочных кривых для определения содержания фактора X в плазме строили в соответствии с протоколом подготовки к работе препарата RVV-X® («Pentapharm», Швейцария).

Эксперименты выполнены в 3 повторностях, полученные результаты приведены как средние величины из трех опытов, для каждой величины даны доверительные интервалы. Статистическую обработку проводили с помощью пакета MS Excel 2013.

Результаты и их обсуждение

Внеклеточная протеаза *A. ochraceus* является потенциальным компонентом диагностикомов для определения концентрации фактора X. Была проведена сравнительная характеристика активаторной по отношению к фактору X активности протеазы, выделенной из культуральной жидкости, лиофилизированного препарата и препарата после изоэлектрофокусирования, которая показана

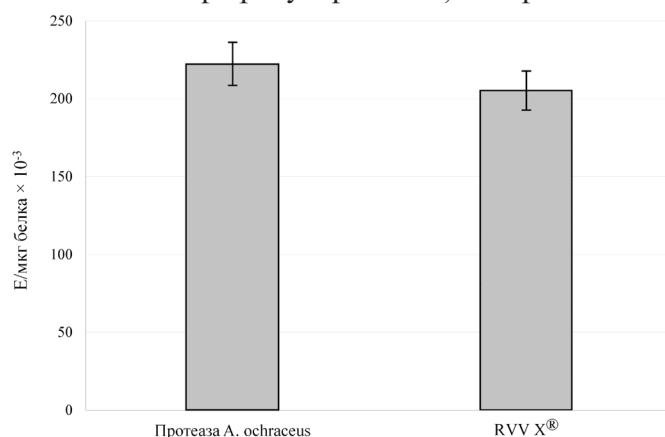


Рис. 1. Удельная активаторная по отношению к фактору X активность протеазы *A. ochraceus* и препарата RVV-X®.

ла (табл. 1), что удельная активаторная активность протеазы после изоэлектрофокусирования в 15,7 раз выше, чем у протеазы, полученной методом лиофилизации, и в 40 раз выше, чем в культуральной жидкости продуцента. Далее производили

сравнение активности выделенного фермента по отношению к фактору X с активностью протеазы из яда змеи, входящей в состав препарата RVV-X® (рис. 1). Видно, что удельная активность протеазы *A. ochraceus* сопоставима с данным показателем

стандартная кривая (А), полученная при использовании в качестве активного компонента диагностического набора препарата RVV-X®, по которой проводят клиническое определение содержания X фактора в плазме крови. График Б на рис. 2 полу-

Таблица 1

Содержание белка и активаторная по отношению к фактору X активность протеазы *Aspergillus ochraceus* в культуральной жидкости, лиофилизированном препарате и фракциях после изоэлектрофокусирования

Параметр	Культуральная жидкость	Лиофилизированный препарат	Активная фракция после изоэлектрофокусирования
Белок, мкг/мл	1,46±0,10	1,08±0,10	0,31±0,10
Активаторная активность по отношению к фактору X, Е ×10 ⁻³	10,7±1,20	20,1±1,20	90,4±1,20
Удельная активаторная активность, (Е/мкг белка) ×10 ⁻³	7,3±1,20	18,6±1,20	291,6±1,20

для змеиногo активатора.

С целью проверки возможности применения протеазы *A. ochraceus* для диагностики фактора X в плазме были построены калибровочные графики с использованием лиофилизированной плазмы крови человека с параметрами системы гемостаза в пределах нормы в различных разведениях, что предписывается существующими протоколами имеющихся диагностикумов. На рис. 2 показана

график с использованием в качестве активного компонента протеазы *A. ochraceus*. Данный график также линеен, но отличается от калибровочного с использованием RVV-X® по своему уравнению. Показано, что активаторная к фактору X активность протеазы *A. ochraceus* имеет концентрационно-зависимый характер.

Следующий этап исследования заключался в проверке применимости построенных калибровочных графиков для выявления содержания фактора X путем проведения соответствующих реакций с плазмами с искусственно сниженным содержанием этого компонента или дефицитных по нему.

Данные по определению активаторной по отношению к фактору X активности протеазы *A. ochraceus* с плазмами крови с разным содержанием фактора X в сравнении с препаратом RVV-X® представлены в табл. 2. Активаторная активность протеазы *A. ochraceus* сопоставима с активностью к фактору X, определяемой с помощью препарата RVV-X®. Уровень содержания фактора X в использованных плазмах крови (в соответствии с их паспортами) достоверно определяется с помощью как протеазы из яда змеи, так и протеазы *A. ochraceus* (табл. 2). Полученные данные свидетельствуют о том, что протеаза микромицета может быть применима в составе диагностического набора для определения содержания фактора X в плазме крови пациентов.

Таким образом, активность фактора X, определенная в нормальной плазме по стандартной методике с использованием протеазы *A. ochraceus*, сопоставима с этим показателем, оцениваемым с помощью коммерческого аналога – препарата RVV-X®. Протеаза *A. ochraceus* может быть использована для определения X фактора в плаз-

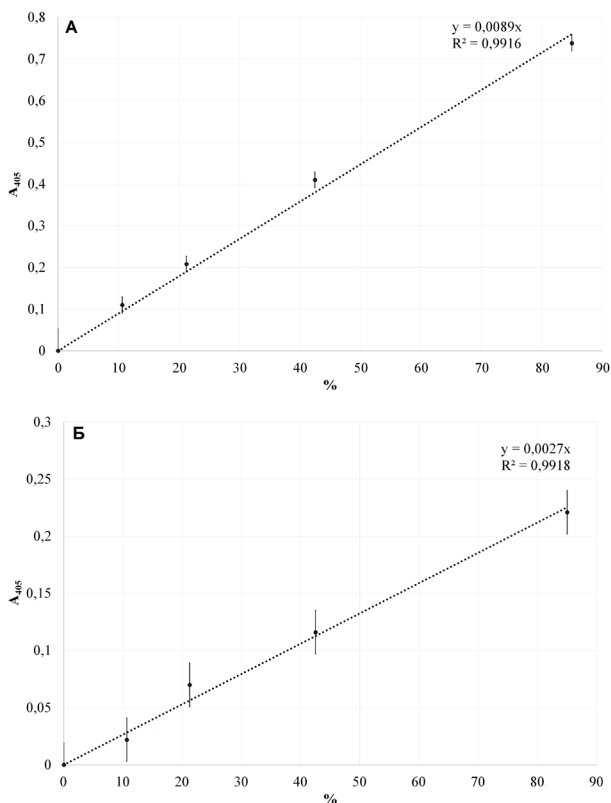


Рис. 2. Калибровочная кривая с лиофилизированной плазмой крови человека с параметрами системы гемостаза в пределах нормы, полученная с помощью препарата RVV-X® (А) и протеазы *A. ochraceus* (Б).

Таблица 2

Активаторная по отношению к фактору X активность коммерческого диагностикума и протеазы *Aspergillus ochraceus*, определяемая с плазмами со сниженными параметрами системы гемостаза

Тип плазмы	Содержание X фактора, %		
	В соответствии с паспортом	Активатор X фактора (RVV-X®)	Протеаза <i>Aspergillus ochraceus</i>
Нормальная плазма	95 ± 10	95 ± 9	95 ± 12
Плазма патологическая (с искусственно сниженными параметрами системы гемостаза)	38 ± 4	36,6 ± 4	37,4 ± 4
Плазма крови человека, дефицитная по факторам II, VII, X	Менее 1%	Менее 1%	Менее 1%

мах с его пониженным содержанием аналогично препарату RVV-X®. Препарат протеаз *A. ochraceus* может быть рекомендован в качестве нового диагностикума в клинических лабораториях для мониторинга фактора X в плазме крови.

Работа выполнена при поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприя-

тий в научно-технической сфере (Соглашение № 9107ГУ/2015).

Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Girolami A., Molaro G., De Marco L.* Factor X survival and therapeutic factor X levels in the abnormal factor X (factor X Friuli) coagulation disorder // *Acta Haematol.* 1974. Vol. 52. N 4. P. 223–231.
2. *Chatterjee T., Philip J., Nair V., Mallhi R. S., Sharma H., Ganguly P., Biswas A.K.* Inherited factor X (Stuart-Prower factor) deficiency and its management // *Med. J. Armed Forces India.* 2015. Vol. 71. Suppl. 1. P. S184–S186.
3. *Tsevens H., Mandalaki T., Symvoulidis A., Philips H.* Fluctuations and relations of the Quick time and the heparin tolerance test and the X factor during anticoagulant treatment with coumarins // *Arch. Inst. Pasteur Hell.* 1961. Vol. 7. P. 49–58.
4. *Sajevic T., Leonardi A., Križaj I.* Haemostatically active proteins in snake venoms // *Toxicon.* 2011. Vol. 57. N 5. P. 627–645.
5. *Бобровская А. А., Осмоловский А. А., Звонарева Е. С., Крейер В. Г., Кураков А.В.* Протеиназы микромицетов с активностями ферментов системы гемостаза человека // *Усп. мед. микол.* 2015. Т. 14. № 14. С. 414–416.
6. *Osmolovskiy A.A., Orekhova A.V., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S.* Possibility of application of extracellular proteases of the micromycete *Aspergillus ochraceus* VKM F-4104D for determination of the protein C content in human blood plasma // *Biochem. (Moscow) Suppl. Ser. B. Biomed. Chem.* 2018. Vol. 12. N 2. P. 164–166.
7. *Osmolovsky A.A., Kreier V.G., Baranova N.A., Kurakov A.V., Egorov N.S.* Production of extracellular proteinases – protein C activators of blood plasma – by the micromycete *Aspergillus ochraceus* during submerged and solid-state fermentation // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2013. Vol. 49. N 6. P. 581–586.
8. *Barranco-Medina S., Murphy M., Pelc L., Chen Z., Di Cera E., Pozzi N.* Rational design of protein C activators // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7: 44596.
9. *Gertler A., Trop M.* The elastase-like enzymes from *Streptomyces griseus* (pronase). Isolation and partial characterization // *Eur. J. Biochem.* 1971. Vol. 19. N 1. P. 90–96.
10. *Osmolovskiy A.A., Kreier V.G., Kurakov A.V., Baranova N.A., Egorov N.S.* *Aspergillus ochraceus* micromycetes – producers of extracellular proteinases – protein C activators of blood plasma // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2012. Vol. 48. N 5. P. 488–492.

Поступила в редакцию 11.02.2019 г.
После доработки 07.04.2019 г.
Принята в печать 15.04.2019 г.

SHORT COMMUNICATION

POSSIBILITY OF APPLICATION OF EXTRACELLULAR PROTEASE OF MICROMYCET *ASPERGILLUS OCHRACEUS* FOR DETERMINATION OF FACTOR X CONTENT IN HUMAN BLOOD PLASMA

A.V. Orekhova¹, A.A. Osmolovskiy^{1,*}, V.G. Kreyer¹, N.A. Baranova¹, N.S. Egorov²

¹*Biological Faculty and* ²*International Biotechnology Center, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia*
**e-mail: aosmol@mail.ru*

It has been shown that activity of factor X activity determined in normal plasma using *Aspergillus ochraceus* protease is comparable with the activity of a commercial analogue, a protease from Russell's viper venom (RVV-X[®]). It was revealed that the protease of *A. ochraceus* along with the RVV-X[®] preparation can be used to determine the content of factor X in the plasma with its reduced content. A study of the protease activity of *A. ochraceus*, an activator to factor X, showed that it is slightly higher compared to the snake venom preparation, which can make *A. ochraceus* protease a promising substitute for the snake activator in diagnostics for determining the content of factor X.

Keywords: *proteolytic enzymes, activators of factor X, diagnostics of factor X, RVV-X[®], aspergilli protease, pathological plasma*

Сведения об авторах

Орехова Анастасия Владимировна – вед. инженер кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: stasya77@list.ru

Осмоловский Александр Андреевич – канд. биол. наук, ст. преп. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: aosmol@mail.ru

Крейер Валериана Георгиевна – канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: vkreyer@yandex.ru

Баранова Нина Андреевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: vkreyer@yandex.ru

Егоров Николай Сергеевич – докт. биол. наук, проф. Международного биотехнологического центра МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: nsegorov21@mail.ru