БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 9, с. 1305 – 1320

УДК 577.152.3

ЦИСТЕИНОВАЯ ПРОТЕАЗА ИЗ СЕМЯН ЛЬНА ОБЛАДАЕТ СИЛЬНЫМ АНТИКОАГУЛЯНТНЫМ, АНТИТРОМБОЦИТАРНЫМ ДЕЙСТВИЕМ И СПОСОБНА РАСТВОРЯТЬ ТРОМБЫ

© 2020 Ш.К.М. Нандиш[1], Дж. Кенгайя[1], Чх. Рамачандрайя[1], Чандрамма[1], А. Шиваия[1], С.М. Сантош[2], Тирунавуккарасу[3], Д. Саннанингая[1]*

[1] *Department of Studies and Research in Biochemistry and Centre for Bioscience and Innovation, Tumkur University, 572103 Tumkur, India; E-mail: sdevbiochem@gmail.com*

[2] *Department of Medicinal Biochemistry and Microbiology (IMBM), Uppsala Biomedical Centre, 75237 Uppsala, Sweden*

[3] *Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Life Sciences, Pondicherry University, 605014 Pondicherry, Tamil Nadu, India*

Поступила в редакцию 21.03.2020
После доработки 26.05.2020
Принята к публикации 29.05.2020

В настоящем исследовании была выделена, очищена и охарактеризована цистеиновая протеаза из семян льна (FSCP – flax seed cysteine protease), которая обладает выраженными антикоагулянтными и антитромбоцитарными свойствами и способна растворять образовавшиеся сгустки крови. Эта протеаза была очищена до гомогенного состояния с использованием комбинации методов гель-фильтрации и ионообменной хроматографии. Чистота полученного препарата была подтверждена методами SDS-PAGE, RP-HPLC и MALDI-TOF. Согласно результатам SDS-PAGE в восстанавливающих условиях и в отсутствие восстановителей, в препарате FSCP присутствовала одна чётко выраженная белковая полоса с молекулярной массой ~160 кДа. Точное значение молекулярной массы FSCP, установленное с помощью метода масс-спектрометрии MALDI-TOF, оказалось равным 168 кДа. Спектры кругового дихроизма белка FSCP указывают на присутствие в структуре этого белка 25,6% спиральных структур, 25,8% структур типа «поворот» и 48% структур типа «случайный клубок» и на отсутствие бета-складчатой структуры. FSCP гидролизует как казеин, так и желатин с удельной активностью 3,5 и 4,2 ед./мг·мин соответственно. Протеолитическая активность FSCP полностью отменялась при добавлении йодоуксусной кислоты, что позволяет предположить, что FSCP является представителем семейства цистеиновых протеаз. Было обнаружено, что оптимальные значения pH и температуры для протеолитической активности FSCP равны pH 6,0 и 30 °C соответственно. FSCP демонстрировала сильную антикоагулянтную активность как в препаратах обогащённой тромбоцитами плазмы, так и в случае плазмы, бедной тромбоцитами, вызывая удлинение времени образования сгустков от 222 до 1100 с и от 256 до 1210 с соответственно. FSCP вызывал деградацию фибриногена человека и фибриновых сгустков. Конечные продукты деградации фибриногена в результате действия тромбина и FSCP были разными. Более того, FSCP ингибировал агрегацию отмытых тромбоцитов, индуцируемую ADP, эпинефрином, тромбином, коллагеном, арахидоновой кислотой и фактором активации тромбоцитов. Было обнаружено, что FSCP нетоксичное соединение, так как не повреждает мембрану эритроцитов и не вызывает кровоизлияния и отеков у экспериментальных мышей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цистеиновая протеаза, антикоагулянт, антитромбоцитарный, нетоксичный.

DOI: 10.31857/S0320972520090109

ВВЕДЕНИЕ

Семена льна являются хранилищем множества химических соединений растительного происхождения, включая белки, в том числе и ферменты, а также липиды, углеводы и вторичные метаболиты, которые можно использовать для различных фармакологических целей [1]. В растениях протеолитические ферменты участвуют в различных процессах – от стадии про-

Принятые сокращения: ADP – аденозиндифосфат; APTT – активированное частичное тромбопластиновое время; КД – круговой дихроизм; DEAE – диэтиламиноэтил; EDTA – этилендиаминтетраацетат; FSCP –цистеиновая протеаза семян льна; FSBE – буферный экстракт семян льна, IAA – йодоуксусная кислота; PAF – фактор активации тромбоцитов; PMSF – фенилметилсульфонилфлуорид; PPP – плазма с низким содержанием тромбоцитов; PRP – плазма, обогащённая тромбоцитами; PT –протромбиновое время; RP-HPLC – обратно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография; SDS-PAGE – электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия; TFA – трифторуксусная кислота; TCA – трихлоруксусная кислота.

* Адресат для корреспонденции.

растания семян до гибели клеток [2]. Кроме того, они имеют множество промышленных применений в пищевой промышленности, пивоварении, при приготовлении сыров и смягчении мяса, в хлебобулочной промышленности, кожевенной и текстильной промышленностях [3]. Однако, в отличие от действия протеолитических ферментов из ядов змей, пчёл и пауков [4], влияние растительных протеаз на гемостаз изучено слабо. Протеолитические ферменты, которые обладают прокоагулянтными свойствами и могут вызвать деградацию молекулы фибриногена с её *N*-конца, образуя фибринопептиды А и Б, сходны с тромбин-подобными ферментами, активаторами протромбина, фактора X и V [5]. Протеазы, которые обладают антикоагулянтной активностью и вызывают деградацию фибриногена с его *C*-конца, вызывая образование укороченного фибриногена, не способного к полимеризации, являются как активаторами белка C, так и ингибиторами факторов IX и X [6]. Протеазы, которые способны вмешиваться в процессы функционирования тромбоцитов, действуют одновременно как активаторы и как ингибиторы процесса агрегации тромбоцитов [7]. Также сообщалось, что ферменты, вызывающие деградацию фибриногена, активируют плазминоген и вызывают кровоизлияние у экспериментальных животных [8]. Наиболее широко изучены металлопротеазы и сериновые протеазы из ядов гадюк и кроталидов, которые обладают способностью деградировать фибриноген и фибрин и демонстрируют про- и антикоагулянтную активность [9]. В то же время цистеиновые протеазы животных клеток недостаточно хорошо изучены. С другой стороны, несколько групп ученых описали цистеиновые протеазы из латекса различных видов растений, таких как *Asclepius curassavica, Pergularia extensa, Calotropis gigantean, Synadenium grantii, Wrightia tinctoria* [10]. Было обнаружено, что сырой латекс препятствует гемостазу, проявляя прокоагулянтные, тромбоиндуцирующие или растворяющие сгустки свойства. Было показано, что фуцин (цистеиновая протеаза из *Ficus carica*) может активировать фактор X и вызывать образование сгустков [11]. Папаин был первой охарактеризованной цистеиновой протеазой из латекса *Carica papaya* [12]. Однако цистеиновые протеазы из съедобных семян изучены в меньшей степени. Лишь недавно появились сообщения о присутствии цистеиновой протеазы в буферном экстракте семян льна и о её антикоагулянтной, антитромбоцитарной и растворяющей тромбы активностях [13]. Очистка и описание свойств фермента имеют большое значение для понимания структурно-функциональных взаимосвязей и предсказания его возможного практического применения. Основной целью настоящей работы являлась очистка фермента с максимальным выходом продукта с наивысшей каталитической активностью. Кроме того, анализ свойств полученного фермента обеспечивает комплексное понимание об аллостерических эффектах, возможностях белковой инженерии и нового дизайна лекарств. В связи с этим мы очистили и охарактеризовали цистеиновую протеазу из буферного экстракта семян льна.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В исследованиях использовали следующие реактивы: свободный от липидов казеин, желатин, фенилметилсульфонилфлуорид (PMSF), этилендиаминтетрацетат (EDTA), йодоуксусная кислота (IAA), аденозиндифосфат (ADP), эпинефрин, тромбин, арахидоновая кислота, фактор активации тромбоцитов (PAF), коллаген, Sephadex G-100, DEAE-Sephadex A-25, фибриноген плазмы крови человека и 1,10-фенантролин были приобретены в компании «Sigma», США. Набор белков-маркеров молекулярной массы был приобретен в компании «Bangalore Genie Pvt Ltd.», Индия. Реагенты для определения активированного частичного тромбопластинового времени (APTT) (LIQUICELIN-E Phospholipids preparation derived from rabbit brain with ellagic acid) и протромбинового времени (PT) (UNIPLASTIN rabbit brain thromboplastin) были приобретены в компании «AGAPPE Diagnostic Pvt Ltd.», Индия. Все другие реактивы, использованные в настоящей работе, были аналитической чистоты. Для проведения анализа плазмы, обогащённой тромбоцитами (PRP), и плазмы с пониженным содержанием тромбоцитов (PPP) использовали свежесобранную кровь от здоровых доноров.

Получение буферного экстракта семян льна (FSBE – flax seed buffer extract) и определение концентрации общего белка. Семена льна были приобретены на местном рынке в г. Тумкур. Семена промывали дважды дистиллированной водой и обрабатывали в течение 1 ч 0,5 M $NaHCO_3$ в соотношении 1 : 8 (*w*/*v*) при постоянном перемешивании. Затем удаляли клейковину, фильтруя экстракт через муслиновую ткань. Семена промывали и тщательно высушивали при комнатной температуре в течение 24 ч. Далее высушенные семена измельчали в порошок, который повторно суспендировали в 50 мМ Tris-HCl буфере, pH 7,6 и центрифугировали при 8000 g в течение 15 мин. Супернатант собирали и храни-

ли при –20 °C до дальнейшего использования. Концентрацию белка определяли по методу Bradford [14], используя в качестве белкового стандарта бычий сывороточный альбумин (БСА).

Гель-фильтрация на колонке с Sephadex G-100. Колонка с Sephadex G-100 (1,0 × 62 см) была предварительно уравновешена 0,1 M NaCl. 100 мг FSBE в 1 мл 0,1 M NaCl наносили на колонку. Элюцию белка проводили с помощью раствора 0,1 M NaCl при скорости потока 0,25 мл/мин. Мониторинг элюции проводили с помощью регистрации поглощения при 280 нм. В каждой второй пробирке определяли протеолитическую активность, регистрируя поглощение при 660 нм, используя в качестве субстрата казеин, не содержащий примесей жиров. Фракции с выраженной протеолитической активностью лиофилизировали и использовали для дальнейших анализов.

Хроматография на колонке с DEAE-Sephadex A-25. Фракции, соответствующие пику II (20 мг белка в 1 мл уравновешивающего буфера), полученные во время предыдущей стадии очистки, наносили на колонку с DEAE-Sephadex A-25 (1,0 × 15 см), предварительно уравновешенную 10 мМ Tris-HCl буфером, pH 7,5. Белки элюировали, последовательно, используя 20 мМ Tris-HCl (pH 9,0); 20 мМ Tris-HCl (pH 8,5); 30 мМ Tris-HCl (pH 8,0); 40 мМ Tris-HCl (pH 7,5); 50 мМ Tris-HCl (pH 7,0); 75 мМ Tris-HCl (pH 6,5); 100 мМ Tris-HCl (pH 6,0); 0,5 M NaCl в 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5) и 1 M NaCl в 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5) при скорости потока 0,25 мл/мин. Мониторинг процесса элюции проводили под контролем поглощения при 280 нм. Полученные фракции анализировали на присутствие протеолитической активности, используя в качестве субстрата казеин и регистрируя поглощение при 660 нм.

Обратно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (RP-HPLC assay). После гель-фильтрации на колонке с DEAE-Sephadex A-25 очищенную протеазу подвергали RP-HPLC на колонке C_{18} (150 мм × 4,60 мм, размер частиц – 5 мкм), предварительно уравновешенной 0,1%-ной трифторуксусной кислотой (TFA) в воде с использованием прибора «Shimadzu LC-20AD prominence HPLC» с детектором PDA («Shimadzu Corp.», Япония). Связавшиеся белки элюировали линейным градиентом (0–100%) ацетонитрила, 0,1% TFA в течение 40 мин при скорости потока 1 мл/мин. Мониторинг элюции проводили при длине волны 280 нм.

Масс-спектрометрия MALDI-TOF. Молекулярную массу цистеиновой протеазы (FSCP) определяли с помощью метода масс-спектрометрии с использованием прибора «Bruker Daltonics MALDI-TOF» («Bruker Daltonics», США) в режиме положительной ионизации. В качестве матрикса MALDI была использована α-циано-4-гидроксикоричная кислота.

Метод кругового дихроизма (КД). Спектры КД белка FSCP (20 мкг/мл в дважды дистиллированной воде Milli-Q) получали с использованием спектрополяриметра «JASCO J-815» («Bayer», Германия). Спектры регистрировали при комнатной температуре в диапазоне 190–250 нм с использованием кварцевой кюветы с длиной оптического пути 1 мм. Ширина полосы 1 нм, время ответа 1 с, скорость сканирования 100 нм/мин. Итоговый спектр является совокупностью трех сканов. Расчет вторичной структуры на основе полученных спектров КД производили с помощью программы «K2d».

Электрофорез белков в SDS-PAGE и окрашивание йодной кислотой и Шиффовым основанием (PAS staining). Электрофорез белков в 10%-ном SDS-PAGE осуществляли по методу Laemmli [15]. Разделение белков грубого экстракта семян льна (FSBE, 100 мкг белка) и анализ чистоты очищенного белка FSCP (50 мкг) проводили в восстанавливающих или в невосстанавливающих условиях в Tris-глициновом буфере, pH 8,3, содержащем 0,1% SDS, в течение 2 ч при комнатной температуре. После завершения электрофореза для выявления полос белка гели окрашивали 0,1%-ным красителем Coomassie brilliant blue R-250, и затем их обесцвечивали смесью этанол/уксусная кислота/вода (40/10/50, *v/v/v*). Для определения молекулярной массы были использованы стандарты со значениями молекулярной массы от 14,3 до 200 кДа.

Окрашивание гелей с использованием йодной кислоты и основания Шиффа (PAS staining) проводили по методу Leach [16]. После завершения электрофореза гель фиксировали в 7,5% уксусной кислоте и оставляли при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем гель промывали 1%-ной азотной кислотой и инкубировали в 0,2%-ном водном растворе йодной кислоты при 4 °C в течение 45 мин. После этого гель помещали в раствор реагента Шиффа на 24 ч при 4 °C. После завершения окрашивания гель обесцвечивали с использованием 10%-ной уксусной кислоты, чтобы выявить полосы белков, окрашенные в розовый цвет.

Определение протеолитической активности. Протеолитическую активность определяли, как было описано в работе Satake et al. [17]. 10 мкг белка FSCP инкубировали с 0,4 мл раствора свободного от липидов казеина (2% в 0,2 M Tris-HCl, pH 7,6) в общем объёме 1 мл в течение 2,5 ч при 37 °C. Непереваренный казеин осаждали

путём добавления 1,5 мл 0,44 М трихлоруксусной кислоты (TCA) и оставляли в течение 30 мин. Затем проводили центрифугирование образцов при 2000 g в течение 10 мин. К 1 мл супернатанта последовательно добавляли карбонат натрия (2,5 мл, 0,4 М) и реактив Folin–Ciocalteu (1/2). Поглощение окрашенных образцов определяли при 660 нм. За единицу активности фермента было принято количество фермента, необходимое для увеличения поглощения при 660 нм на величину, равную 0,01. Удельную активность фермента выражали в виде ед./мин на мг белка. При определении влияния различных ингибиторов белок FSCP (10 мкг) предварительно инкубировали в течение 30 мин с одним из ингибиторов (5 мм): EDTA; 1,10-фенантролин; PMSF или IAA. Во всех случаях были использованы соответствующие контроли.

Зимограмма. Зимограммы FSCP получали, как было описано ранее [18]. Вкратце, образцы FSCP (5 мкг и 10 мкг), приготовленные в невосстанавливающих условиях, наносили на разделяющий гель, содержащий 2%-ный казеин/желатин. После завершения электрофореза гели промывали 10 мМ натрий-фосфатным буфером (PBS), pH 7,0, содержащим 2,5% Triton X-100, при постоянном перемешивании в течение 1 ч, чтобы удалить SDS. Гель инкубировали в течение ночи при 37 °C в 50 мМ Tris-HCl, pH 7,6, содержащем 50 мМ $CaCl_2$ и 40 мМ NaCl. Затем гель подвергали окрашиванию для выявления полупрозрачных полос, соответствующих активному ферменту.

Влияние pH, температуры и продолжительности реакции на активность FSCP. Чтобы определить оптимальное значение pH для FSCP, измеряли её активности в диапазоне значений pH 3–9. С этой целью 10 мкг фермента инкубировали с 0,4 мл раствора, не содержащего примеси жиров казеина (2% в 0,2 М Tris-HCl, pH 7,6) в общем объёме реакционной смеси 1 мл в течение 2,5 ч при 37 °C. Чтобы определить влияние температуры, 10 мкг белка инкубировали с 0,4 мл обезжиренного казеина (2% в 0,2 М Tris-HCl, pH 7,6) в общем объёме реакционной смеси 1 мл при различных температурах (5–50 °C). Изменения активности фермента с течением времени определяли в результате инкубации 10 мкг белка FSCP с 0,4 мл обезжиренного казеина (2% в 0,2М Tris-HCl, pH 7,6) в общем объёме 1 мл при 37 °C в течение различных интервалов времени (30–240 мин). Во всех экспериментах не переваренный казеин осаждали, добавляя 1,5 мл 0,44 М TCA и оставляя в течение 30 мин. Протеолитическую активность фермента определяли, как было описано выше.

Определение времени рекальцификации плазмы. Время рекальцификации плазмы проводили в соответствии с методом, описанным в работе Quick et al. [19]. Вкратце, FSCP (2–14 мкг) предварительно инкубировали с 0,2 мл человеческой плазмы цитратной крови в присутствии 20 мкл 10 мМ Tris-HCl, pH 7,4, в течение 1 мин при 37 °C. Затем в реакционную смесь добавляли 20 мкл 0,25 М раствора $CaCl_2$ и регистрировали время образования сгустка.

Время кровотечения. Время кровотечения определяли, как описано ранее [20]. Вкратце, FSCP (0–8 мкг) в 30 мкл PBS вводили внутривенно в хвостовую вену (n = 5). Спустя 10 мин мыши были анестезированы диэтиловым эфиром, и им делали острые надрезы на кончике хвостовой вены длиной 3 мм. Сразу после этого хвосты мышей погружали вертикально в PBS, который предварительно был нагрет до 37 °C. Время кровотечения фиксировалось с момента начала кровотечения до его полной остановки.

Определение значений APTT и PT. 100 мкл нормальной плазмы цитратной крови человека предварительно инкубировали с белком FSCP (0–10 мкг) в течение 1 мин. Для проведения теста на APTT добавляли 100 мкл реагента, активированного в течение 3 мин при 37 °C. Образование сгустков инициировали добавлением 100 мкл 0,02 М $CaCl_2$, и регистрировали время формирования сгустков. При проведении теста на PT образование сгустков запускали добавлением 200 мкл реагента для определения PT. Записывали время (в секундах), в течение которого образовывался видимый глазом сгусток. Соотношение APTT и международного нормализованного соотношения (INR – international normalized ratio) для PT в каждой точке рассчитывали, исходя из значений контрольной плазмы, инкубированной с буфером в течение одинакового периода времени.

Определение фибриногенолитической активности. Фибриногенолитическую активность определяли, как было описано ранее в работе Ouyang и Teng [21]. Белок FSCP (0–10 мкг) инкубировали с фибриногеном плазмы крови человека (50 мкг) в общем объёме реакционной смеси 40 мкл 10 мМ Tris-HCl буфера, pH 7,4, в течение 4 ч при 37 °C. Реакцию останавливали, добавляя 20 мкл денатурирующего буфера, содержащего 1 М мочевины, 4% SDS и 4% β-меркаптоэтанола. Затем проводили электрофорез образцов в 10%-ном SDS-PAGE. При проведении определения влияния ингибиторов FSCP (10 мкг) предварительно инкубировали в течение ~20 мин с 5 мМ какого-либо из следующих ингибиторов: PMSF, IAA, EDTA или 1,10-фенантролин.

Определение конечных продуктов деградации фибриногена с использованием HPLC. Фибриноген (50 мкг) обрабатывали тромбином человека (2,5 единиц) или очищенным FSCP (10 мкг) в 50 мМ Tris-HCl буфере, pH 7,8, и инкубировали при 37 °C в течение 4 ч. Затем 20 мкл реакционной смеси анализировали на колонке C_{18} с помощью хроматографической системы «Shimadzu LC-Prominence HPLC system («Shimadzu Corp.», Япония). Белковые фракции получали с помощью градиента ацетонитрила и 0,1% TFA в воде в течение 10 мин. Контроль элюции проводили при 280 нм.

Определение фибринолитической активности. Активность белка FSCP в отношении фибриновых сгустков определяли, как ранее было описано в работе Rajesh et al. [22]. Вкратце, 100 человеческой плазмы цитратной крови смешивали с 20 мкл 0,2 М раствора $CaCl_2$ и инкубировали в течение 2 ч при 37 °C. Полученный сгусток тщательно промывали 5–6 раз PBS и суспендировали в 400 мкл 0,2 М Tris-HCl (pH 8,5). Инициацию реакции осуществляли добавлением различных количеств белка FSCP (0–10 мкг) в 100 мкл PBS и инкубировали в течение 2,5 ч при 37 °C. Непереваренный сгусток осаждали, добавляя 750 мкл 0,44 М TCA в течение 30 мин, после чего образцы центрифугировали в течение 15 мин при 1500 g. Аликвоты супернатанта объёмом 0,5 мл переносили в чистые стеклянные пробирки, добавляли по 1,25 мл 0,4 М карбоната натрия и по 0,25 мл разведенного в 2 раза фенол-содержащего реагента Folin–Ciocalteu и оставляли на 30 мин. Образовавшиеся окрашенные продукты реакции регистрировали при 660 нм. За единицу активности принимали количество фермента, которое необходимо для увеличения поглощения при 660 нм на 0,01.

Определение фибринолитической активности с помощью SDS-PAGE электрофореза. Получение фибриновых сгустков проводили, как описано выше. Полученные сгустки инкубировали с различными концентрациями белка FSCP (0–10 мкг) в 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4) в конечном объёме реакционной смеси 40 мкл при 37 °C в течение 12 ч. Реакцию останавливали добавлением 20 мкл денатурирующего буфера для образцов, содержащего 4% SDS, 1 М мочевины и 4% β-меркаптоэтанола. Образцы выдерживали в кипящей водяной бане в течение 10 мин и затем подвергали центрифугированию, чтобы осадить обрывки сгустков плазмы. Отбирали аликвоты супернатанта объёмом 30 мкл и анализировали с помощью гель-электрофореза в 7,5%-ном SDS-PAGE. При проведении анализа с использованием ингибиторов белок FSCP (10 мкг) предварительно инкубировали в течение ~15 мин с 5 мМ какого-либо из использованных в работе ингибиторов (PMSF, EDTA, IAA или 1,10-фенантролин).

Деградация белков плазмы крови. Определение уровня деградации белков плазмы крови проводили по методу, ранее описанному в работе Kumar et al. [23]. Белок FSCP (0–10 мкг) инкубировали с 100 мкг белков плазмы крови в течение 12 ч при 37 °C в общем реакционном объёме 40 мкл, в 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4), содержащем 10 мМ NaCl и 0,05% азида натрия. Реакцию останавливали добавлением 20 мкл денатурирующего буфера, содержащего 4% SDS, и последующим кипячением образцов в течение 5 мин. Затем образцы анализировали с использованием метода электрофореза белков в 7,5%-ном SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях.

Получение отмытых тромбоцитов. Отмытые тромбоциты получали в соответствии с методом, описанным Born [24]. 1,5 мл буфера с лимонной кислотой и декстрозой добавляли в пластиковые центрифужные пробирки. Затем добавляли по 9 мл крови и центрифугировали в течение 15 мин при 30 g. Супернатант PRP переносили в пластиковые пробирки и выдерживали в инкубаторе при 37 °C в течение 15 мин и затем центрифугировали в течение 20 мин при 4500 g. Собирали осадок, и суспендировали его в буфере, содержащем раствор Тироде (Tyrode) и альбумин, pH 6,5. После перемешивания смесь центрифугировали при 4500 g в течение 20 мин. Осадок снова суспендировали в буфере, содержащем раствор Тироде (Tyrode) и альбумин, pH 6,5 и снова центрифугировали в течение 20 мин при 4500 g. Полученный осадок суспендировали в буфере, содержащем раствор Тироде (Tyrode) и альбумин, pH 7,35. Полученную суспензию использовали в дальнейшем для изучения агрегации тромбоцитов.

Определение степени агрегации тромбоцитов. Агрегацию тромбоцитов оценивали с помощью турбидиметрического метода, описанного Born [24], с использованием двухканального агрегометра «Chronolog whole blood/optical lumi aggregation system» («CHRONO-LOG CORP.», США). Аликвоты отмытых тромбоцитов предварительно инкубировали с различными концентрациями белка FSCP (0–6 мкг) в общем объёме реакционной смеси 0,25 мл. Процесс агрегации тромбоцитов запускали независимо друг от друга, добавляя тот или иной агонист из следующего списка: ADP, эпинефрин, арахидоновая кислота, тромбин, коллаген или PAF, и выдерживали в течение 6 мин. В случае индуцированной ADP и эпинефрином агрегации тромбоцитов до запуска процесса агрегации к отмытым тромбоцитам предварительно добавляли 50 мкг фибриногена.

Определение прямой гемолитической активности. Гемолитическую активность определяли, используя отмытые эритроциты человека. Вкратце, упакованные эритроциты человека суспендировали в PBS в соотношении 1/9 (*v*/*v*). 1 мл этой суспензии инкубировали независимо друг от друга с различными количествами белка FSCP (0–30 мкг) в течение 1 ч при 37 °C. Реакцию останавливали, добавляя 9 мл ледяного PBS, и центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин при 37 °C. Количество гемоглобина в супернатанте измеряли при длине волны 540 нм. Гемолитическую активность выражали в виде процента лизированных клеток. В качестве положительного и отрицательного контролей использовали лизис эритроцитов в дистиллированной воде (100%-ный лизис) и PBS соответственно.

Отек-индуцирующая активность. В данном случае был использован метод, описанный ранее Vishwanath et al. [25]. Группам мышей (n = 5 в каждой группе) независимо друг от друга в подушечки правой ноги вводили различные дозы белка FSCP (10–200 мкг) в 20 мкл физиологического раствора. В подушечки левой ноги вводили только 20 мкл физраствора, и это служило в качестве контроля. Спустя 1 ч мышей подвергали анестезии в результате ингаляции диэтилового эфира. Задние конечности на уровне голеностопного сустава удаляли, и их взвешивали. Увеличение веса удаленной конечности рассчитывали как коэффициент отека, который был равен весу отечной ноги × 100/вес нормальной ноги. В качестве минимальной дозы, способной вызвать появление отеков, было определено количество белка, необходимое для достижения значения коэффициента отека 120%.

Геморрагическая активность. Геморрагическую активность определяли по методу, описанному ранее Kondo et al. [26]. Различные количества белка FSCP (0–30 мкг) в 30 мкл физиологического раствора вводили мышам внутрикожно (n = 5 в каждой группе). Группа мышей, которая получала только физраствор, служила в качестве отрицательного контроля, а группа, получавшая яд из *Daboia russelli*, являлась положительным контролем. Спустя 3 ч мышей подвергали анестезии с помощью ингаляции диэтиловым эфиром. Спинной участок поверхности кожи тщательно удаляли и обследовали, проводя его сравнение с картиной геморрагии у контрольных мышей, которым вводили только физраствор. Измеряли диаметр геморрагического пятна на внутренней поверхности кожи. Минимальную дозу, приводящую к кровоизлиянию, определяли как количество белка, вызывающего образование геморрагического пятна диаметром 10 мм.

Статистическая обработка полученных результатов. Полученные результаты представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение (SD). Статистический анализ был проведен с использованием t-критерия Стьюдента. Различия между группами считались статистически достоверными, если значение $p < 0{,}01$.

Таблица 1. Влияние различных ингибиторов на протеолитическую активность белка FSCP

Ингибитор (5 мМ)	Активность (%)
Нет ингибитора	100
PMSF	99
IAA	8
EDTA	99
1,10-фенантролин	98

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Очистка и определение свойств белка FSCP. Для того чтобы выделить цистеиновую протеазу из FSBE нами было использовано сочетание методов колоночной хроматографии на Sephadex G-100 и DEAE-Sephadex A-25. В результате фракционирования FSCP с помощью гельфильтрации были получены два основных пика (рис. 1, *a*), и только во фракциях пика II была выявлена казеин-гидролизующая активность, указывающая на протеолитическую активность. Для очистки протеазы пик II фракционировали методом ионообменной колоночной хроматографии на DEAE-Sephadex A-25. Было получено 7 пиков (рис. 1, *b*). Все пики были проверены на наличие протеолитической активности с использованием казеина и желатина в качестве субстратов. Только пик IV гидролизовал субстраты с удельной активностью 3,45 и 4,20 ед./мин белка соответственно. Протеолитическая активность пика IV была полностью отменена IAA (ингибитором цистеиновой протеазы), в то время как 1,10-фенантролин, PMSF и ЭДТА были неэффективны, что указывало на присутствие остатка цистеина в активном участке фермента (табл. 1). На этом основании данный фермент был определен нами как цистеиновая протеаза семян льна (FSCP – flax seed cysteine protease).

Белок FSCP является мономером, что было ранее подтверждено наличием только одной полосы с молекулярной массой ~160 кДа при его электрофорезе в SDS-PAGE в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях (рис. 2, *a*). Однако точная молекулярная масса белка

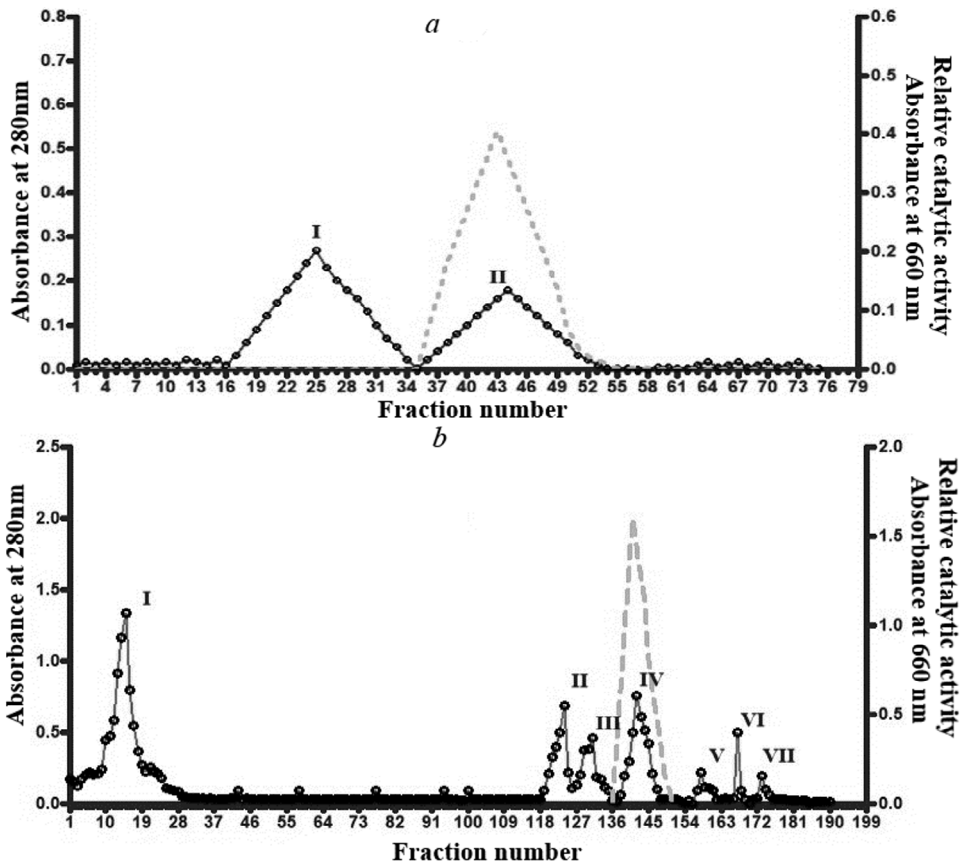

Рис. 1. *a* – Гель-фильтрация на колонке с Sephadex G-100. Препарат FSBE (100 мг в 1 мл 0,1M NaCl) наносили на колонку с Sephadex G-100 (1,5 × 108 см), предварительно уравновешенную 0,1 M NaCl. Белки элюировали 0,1 M NaCl при скорости потока 16 мл/ч. Контроль элюции проводили при 280 нм. Каждую вторую фракцию белка (1,6 мл) анализировали на протеолитическую активность, используя казеин в качестве субстрата (пунктиром показан профиль элюции фракций с протеолитической активностью). *b* – Хроматография на колонке с DEAE-Sephadex A-25. Фракции, соответствующие пику II (Peak-II), полученные на предыдущей стадии очистки белка (20 мг белка в 1 мл уравновешивающего буфера), наносили на колонку с DEAE-Sephadex A-25 (1,5 × 20 см), предварительно уравновешенную 10 мМ Tris-HCl буфером, pH 8,0. Далее белки последовательно элюировали (см. раздел «Материалы и Методы») при скорости потока 15 мл/ч. Мониторинг процесса элюции проводили при 280 нм. В каждой второй пробирке определяли протеолитическую активность, используя в качестве субстрата казеин (пунктиром показан профиль элюции фракций с протеолитической активностью). (С цветными вариантами рис. 2–4, 6 и 8 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/.)

FSCP, определенная методом масс-спектрометрии MALDI-TOF, составила 168 кДа (рис. 2, *c*). Белок FSCP, в отличие от фибриногена, не образовывал основания Шиффа при его обработке йодной кислотой. Это означает, что белок FSCP не содержит остатки углеводов (рис. 2, *b*). Чистота FSCP была подтверждена RP-HPLC, был выявлен единичный острый пик со временем удержания 7,2 мин (рис. 2, *d*).

Во вторичной структуре белка FSCP с помощью метода КД было выявлено ~25,6% спиральных структур, 25,8% поворотов и 48% структур типа «случайный клубок». При этом бета-складчатые структуры не были обнаружены (рис. 3, *a*). Белок FSCP был очищен в 19 раз (табл. 2). Гидролитическая активность белка FSCP в отношении казеина и желатина была подкреплена экспериментами по получению зимограмм. Белок FSCP показал сходную картину полупрозрачных полос активности в районе ~168 кДа в экспериментах по зимографии казеина и желатина соответственно (рис. 3, *b* и *e*). Было установлено, что оптимальными значениями pH и температуры для протеолитической активности FSCP являются pH 6,0 и 30 °C соответственно. Наибольшее количество гидролизованного субстрата наблюдается через 150 мин реакции (рис. 3, *f–h*).

FSCP демонстрирует выраженные антикоагулянтные свойства, вмешиваясь во внутренние пути каскада свертывания крови. Препарат FSCP (12 мкг) показал сильную антикоагулянтную активность, увеличивая время свертывания цитратной крови в препаратах PRP (от 222 до 1100 с)

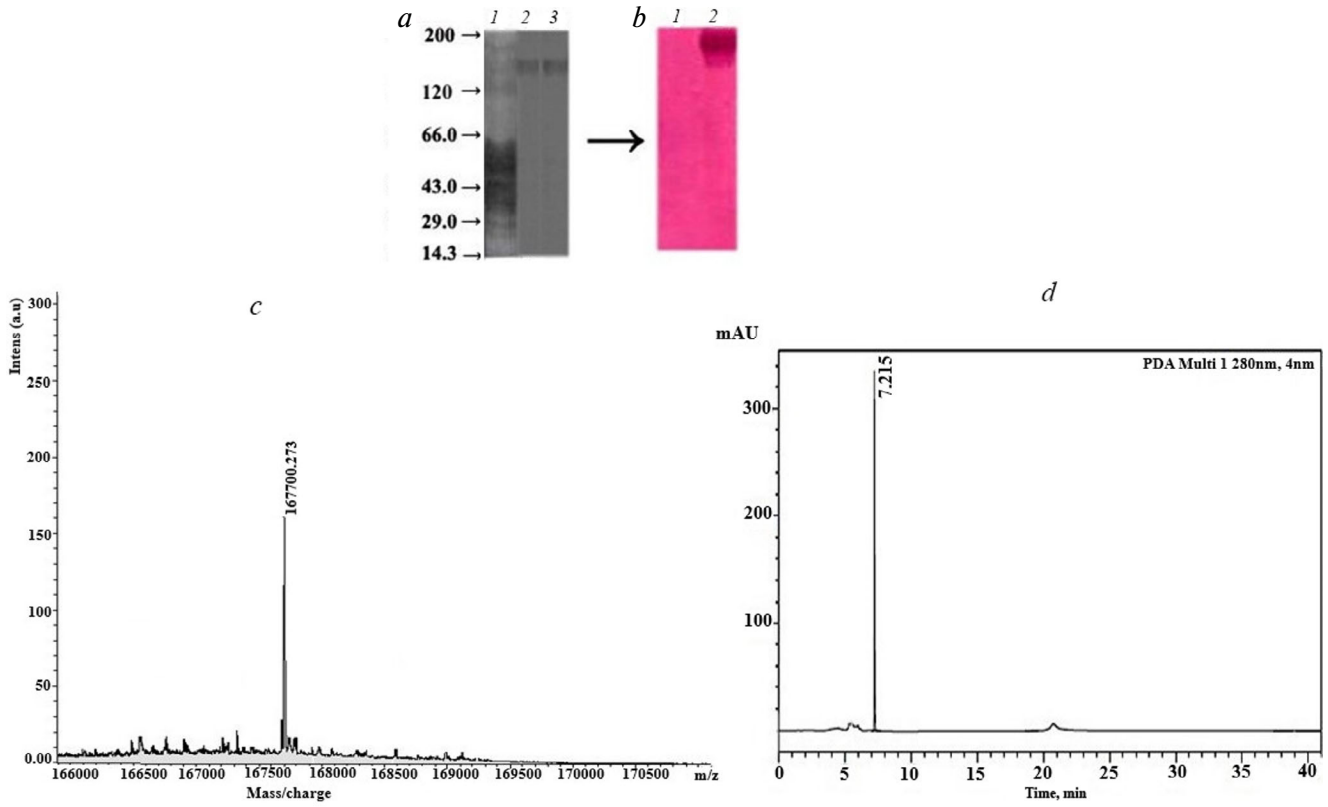

Рис. 2. *a* – Электрофорез белков в 10%-ном SDS-PAGE: *1* – экстракт семян льна (100 мкг), невосстанавливающие условия; *2* – белок FSCP (50 мкг) в невосстанавливающих условиях; *3* – FSCP (50 мкг) в восстанавливающих условиях. *b* – Окрашивание йодной кислотой и основанием FSCP (*1*), 50 мкг и фибриноген (*2*), 50 мкг, положительный контроль; *M* – маркеры молекулярной массы: H-цепь миозина (200 кДа), β-галактозидаза (120 кДа), бычий сывороточный альбумин (66 кДа), овальбумин (43 кДа), карбоангидраза (29 кДа) и лизоцим (14.3 кДа). *c* – Масс-спектрометрия MALDI-TOF белка FSCP (5 мкг) в режиме положительной ионизации с использованием в качестве матрикса α-циано-4-гидроксикоричной кислоты. *d* – RP-HPLC белка FSCP (5 мкг) на колонке C_{18} предварительно уравновешенной 0,1% TFA в воде. Элюцию белка проводили с помощью увеличивающейся концентрации (0–100%, 40 мин) ацетонитрила, 0,1% TFA при скорости потока 1 мл/мин. Мониторинг элюции проводили при 280 нм

и PPP (от 256 до 1210 с) человека (рис. 4, *a*). Антикоагулянтная активность белка FSCP была подтверждена *in vivo* с помощью теста на кровотечение из хвостовой вены мыши. Внутривенная инъекция препарата FSCP приводила к значительному доза-зависимому увеличению продолжительности кровотечения. Продолжительность кровотечения превышала 800 с ($p < 0{,}01$) при инъекции 8 мкг в сравнении с 200 с при обработке контрольных мышей PBS (рис. 4, *c*). IAA полностью подавляла антикоагулянтную активность FSCP как *in vitro*, так и *in vivo*, однако другие ингибиторы протеаз на неё не влияли (рис. 4, *b* и *d*). Кроме того, FSCP пролонгировал процесс образования сгустков только в случае APTT, но не PT. Эти результаты позволяют предположить, что антикоагулянтное действие FSCP может быть связано с его вмешательством во внутренний путь каскада свертывания крови (табл. 3).

FSCP вызывает гидролиз только фибриногена и не действует на другие белки плазмы крови. FSCP в количестве 10 мкг полностью расщеплял Aα-цепь и частично Bβ-цепь фибриногена в доза-зависимой манере (рис. 5, *a*) при инкубации в течение 4 ч при 37 °C. С другой стороны, 5 мкг FSCP при инкубации в течение 24 ч при 37 °C не вызывали гидролиз γ-цепи фибриногена (рис. 5, *b*). Фибриногенолитическая активность FSCP отменялась полностью только при добавлении IAA. PMSF, EDTA и 1,10-фенантролин на неё не влияли (рис. 5, *c*). Субстратная специфичность FSCP оценивалась с использованием белков плазмы крови человека. FSCP специфически расщеплял фибриноген, не влияя на другие белки плазмы, при инкубации в течение 12 ч в максимальной дозе 10 мкг при 37 °C (в качестве положительного контроля использовался только фибриноген) (рис. 5, *d*).

FSCP растворяет сгустки фибрина. FSCP растворял фибриновый сгусток с удельной активностью 4,16 ед./мин на мг белка (рис. 6, *a*). Его способность гидролизовать фибрин была

Таблица 2. Сводная таблица результатов очистки белка FSCP. Приведены значения в виде среднего трех независимых определений

Метод	Общее количество белка (мг)	Выход белка (%)	Удельная активность (U/мин·мг белка)	Общая активность	Выход активности (%)	Степень очистки
Грубый буферный экстракт	100	100	0,18 ± 0,02	18	100	1,0
Sephadex G-100	20	20	0,81 ± 0,04	16	90	4,5
DEAE-Sephadex A-25	1	1	3,45 ± 0,03	3	19	19

подтверждена картиной разделения белковых полос в результате проведения SDS-PAGE при деградации фибрина. 10 мкг FSCP за 12 ч инкубации при 37 °C расщепляли только целый фибрин, а димер γ–γ, α-цепь и β-цепь оставались устойчивыми к протеолизу (рис. 6, *b*). Странно, но при инкубации в течение 24 ч при 37 °C FSCP в количестве 4 мкг расщеплял все цепи фибрина, и эффективность такого расщепления зависела от продолжительности инкубации (рис. 6, *c*). Его фибринолитическая активность полностью подавлялась IAA, но не PMSF, EDTA и 1,10-фенантролином (рис. 6, *d*).

FSCP расщепляет фибриноген с его *C*-конца. Чтобы определить сайты деградации фибриногена в результате действия FSCP, конечные продукты деградации фибриногена в результате его инкубации с тромбином и FSCP анализировали с помощью метода HPLC. Фибриноген элюировался с колонки в виде единственного пика с временем задержки 1,3 мин (рис. 7, *a*). Расщепление фибриногена тромбином дало пять пиков со временем удержания 1; 1,2; 1,4; 1,6 и 2 мин соответственно (рис. 7, *b*). В то же время фибриноген, обработанный FSCP, также показывал пять пиков элюции с временем задержки 1; 1,4; 1,6;

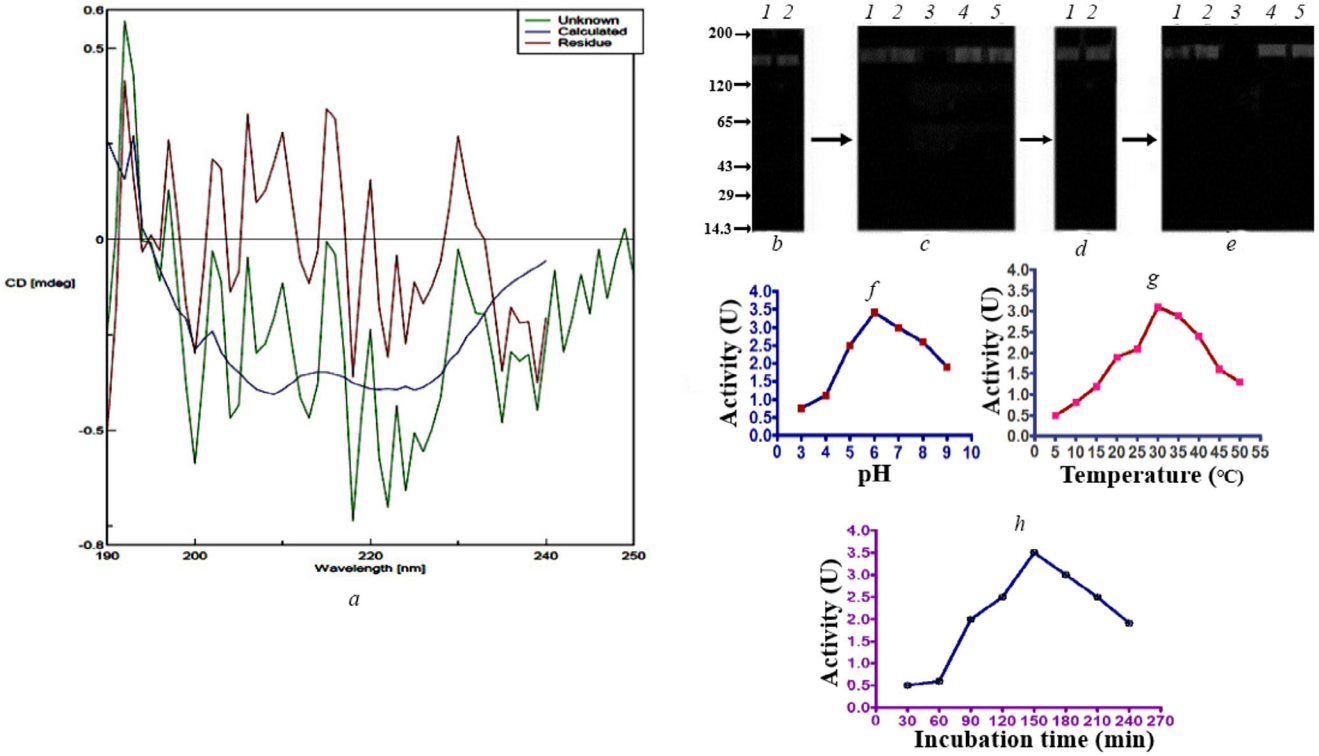

Рис. 3. *a* – Спектры кругового дихроизма белка FSCP (20 мкг в дважды дистиллированной воде). *b* – Зимограмма FSCP с казеином: 5 мкг (*1*) и 10 мкг (*2*) FSCP. *c* – Зимограмма FSCP (5 мкг) с казеином в отсутствие или в присутствии ингибиторов (5 мМ): нет ингибиторов (*1*); PMSF (*2*); IAA (*3*); 1,10-фенантролин (*4*); EDTA (*5*). *d* – Зимограмма FSCP с желатином: 5 мкг (*1*) и 10 мкг (*2*) белка FSCP. *e* – Зимограмма FSCP (5 мкг) с желатином в отсутствие или в присутствии ингибиторов (5 мМ): нет ингибиторов (*1*); PMSF (*2*); IAA (*3*); 1,10-фенантролин (*4*); EDTA (*5*). *f* – Влияние pH (3–9) на протеолитическую активность FSCP. *g* – Влияние температуры (5–50°C) на протеолитическую активность FSCP. *h* – Влияние продолжительности инкубации (30–240 мин) на протеолитическую активность FSCP

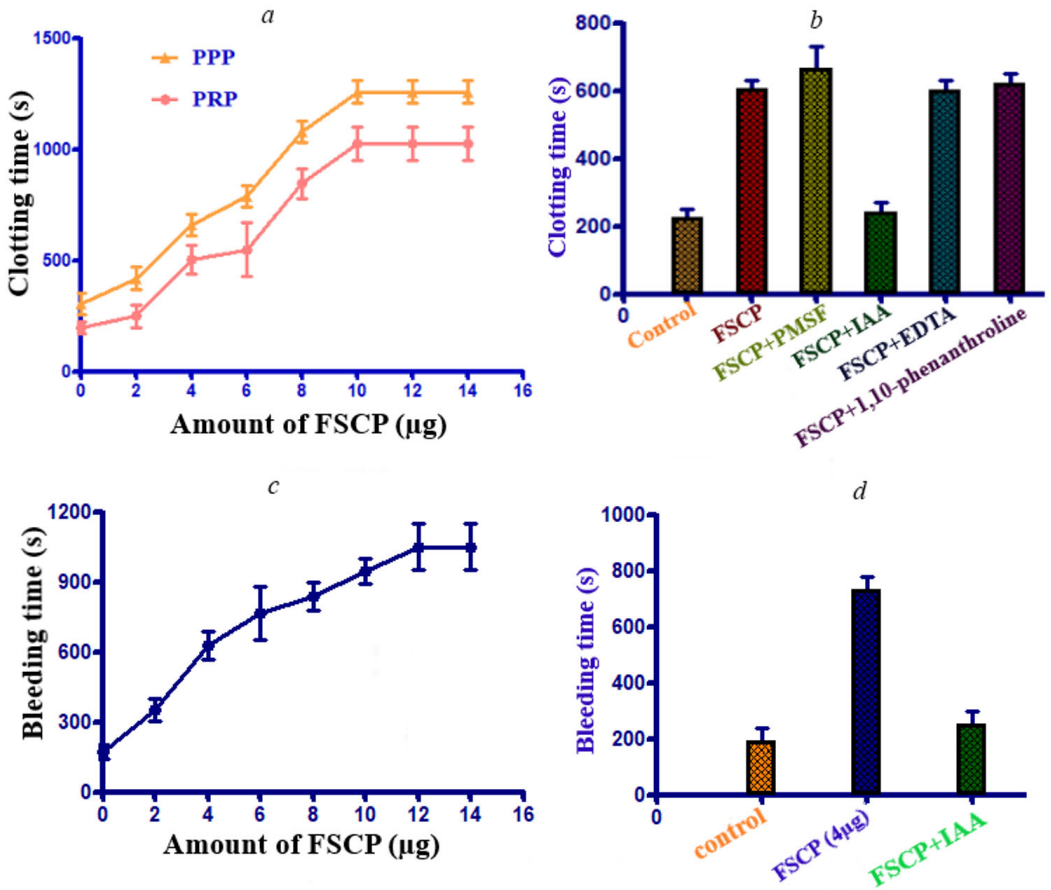

Рис. 4. *a* – Влияние FSCP на время рекальцификации плазмы. *b* – Влияние ингибиторов протеаз на антикоагулянтную активность FSCP. FSCP (4 мкг) предварительно инкубировали с 5 мМ ингибитора (PMSF, IAA, EDTA, 1,10-фенантролина) в течение 15 мин при 37 °C. *c* – Влияние FSCP на продолжительность кровотечения из хвостовой вены после введения FSCP измеряли спустя 10 мин после внутривенного введения PBS или различных количеств белка FSCP. *d* – Влияние ингибиторов на продолжительность кровотечения из хвостовой вены. FSCP (4 мкг) предварительно инкубировали с 5 мМ IAA в течение 15 мин при 37 °C. Каждое значение представляет среднее ± SD от трех независимых определений ($p < 0,01$)

1,8 и 2 мин соответственно (рис. 7, *c*). Однако хроматограммы, полученные в обоих случаях, отличались друг от друга. Было установлено, что FSCP расщеплял фибриноген с *C*-конца. На рис. 7, *d* и *e* представлена картина разделения белковых полос конечных продуктов деградации фибриногена, выявленная с помощью SDS-PAGE.

FSCP обладает антитромбоцитарной активностью. FSCP (6 мкг) ингибировал агрегацию отмытых тромбоцитов, индуцированную различными агонистами, такими как ADP, эпинефрин, тромбин, коллаген, арахидоновая кислота и PAF. Процент ингибирования индуцированной вышеуказанными агонистами агрегации

Таблица 3. Доза-зависимое влияние FSCP на время свертывания человеческой плазмы в норме

FSCP, мкг	PT, с	PT (INR)	APTT, с	Коэффициент APTT
0	11 ± 0,01	0,89 ± 0,05	34 ± 0,02	1,31 ± 0,09
2	11 ± 0,05	0,98 ± 0,02	47 ± 0,07	2,03 ± 0,01
4	12 ± 0,02	1,15 ± 0,07	71 ± 0,05	3,99 ± 0,05
6	12 ± 0,08	1,08 ± 0,03	96 ± 0,01	5,40 ± 0,01
8	11 ± 0,03	0,91 ± 0,09	127 ± 0,09	7,54 ± 0,03
10	11 ± 0,1	1,03 ± 0,04	166 ± 0,03	9,11 ± 0,02

тромбоцитов при инкубации с FSCP был равен 62%, 73%, 57%, 88%, 70% и 60% соответственно (рис. 8, *a*). Сравнение изученных агонистов показало, что FSCP ингибировал агрегацию отмытых тромбоцитов в следующем порядке: коллаген > эпинефрин > арахидоновая кислота > ADP > фактор активации тромбоцитов > тромбин.

FSCP является нетоксичным белком. Было установлено, что FSCP не токсичен, так как он не повреждает мембраны эритроцитов. FSCP также не повреждал кровеносные сосуды, что позволяет предположить отсутствие у него геморрагической активности (рис. 8, *b*). В подушечках ног экспериментальных мышей не было выявлено накопления жидкости и поэтому можно считать, что белок FSCP не обладает способностью вызывать появление отеков (рис. 8, *c*).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании мы очистили и охарактеризовали FSCP – фермент с сильными антикоагулянтными, антитромбоцитарными и фибринолитическими свойствами. FSCP был успешно очищен с использованием методов гель-фильтрации и ионообменной хроматографии. FSCP является мономерным белком, поскольку он движется в виде одной полосы при SDS-PAGE как в восстанавливающих, так и в невосстанавливающих условиях и элюируется в виде одного пика при RP-HPLC. Эти результаты также указывают на гомогенность и чистоту полученного нами препарата фермента. Точная молекулярная масса, определенная с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF, составляет 168 кДа. Вторичная структура FSCP содержала спиральные структуры, повороты спирали и структуры типа «случайный клубок», но не имела бета-складчатых структур. FSCP расщеплял казеин и желатин с удельной активностью 3,45 и 4,20 ед./ мин на мг белка соответственно при 37 °C. Оптимальное значение pH для этого фермента оказалось равным 6,0. Оптимум температуры был определен как 30 °C, и наибольшая степень гидролиза субстратов наблюдалась че-

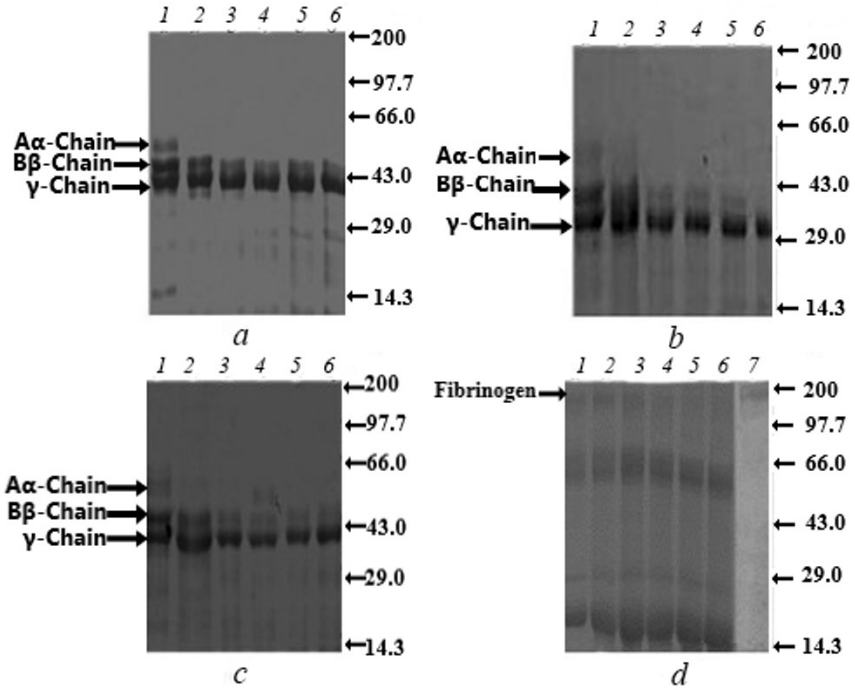

Рис. 5. *a* – Гидролиз фибриногена (50 мкг) в течение 4 ч при 37 °C в отсутствие фермента (*1*) и в присутствии 2 мкг (*2*), 4 мкг (*3*), 6 мкг (*4*), 8 мкг (*5*) и 10 мкг (*6*) белка FSCP. Продукты гидролиза после электрофореза в 10% SDS-PAGE в восстанавливающих условиях. *b* – Гидролиз фибриногена (50 мкг) белком FSCP (4 мкг) после инкубации в течение 0 ч (*1*), 4 ч (*2*), 8 ч (*3*), 12 ч (*4*), 16 ч (*5*) и 24 ч (*6*) при 37 °C. *c* – Влияние ингибиторов протеаз на фибриногенолитическую активность белка FSCP. FSCP (4 мкг) предварительно инкубировали с ингибиторами протеаз (5 мМ) в течение 30 мин при 37 °C. Реакцию начинали добавлением 50 мкг фибриногена и реакционную смесь инкубировали в течение 4 ч: *1* – только фибриноген, *2* – фибриноген в присутствии FSCP, *3* – FSCP и PMSF, *4* – FSCP и IAA, *5* – FSCP и EDTA и *6* – FSCP и 1,10-фенантролин. *M* – маркеры молекулярной массы, кДа. *d* – Деградация белков плазмы крови человека. Белки плазмы крови (100 мкг) инкубировали в отсутствие фермента (*1*) или в присутствии 2 мкг (*2*), 4 мкг (*3*), 6 мкг (*4*), 8 мкг (*5*) и 10 мкг (*6*) белка FSCP в 40 мкл 10 мМ Tris-HCl буфера (pH 7,4) при 37 °C. Затем их анализировали с помощью 7,5% SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях. В качестве контроля использовали фибриноген (20 мкг)

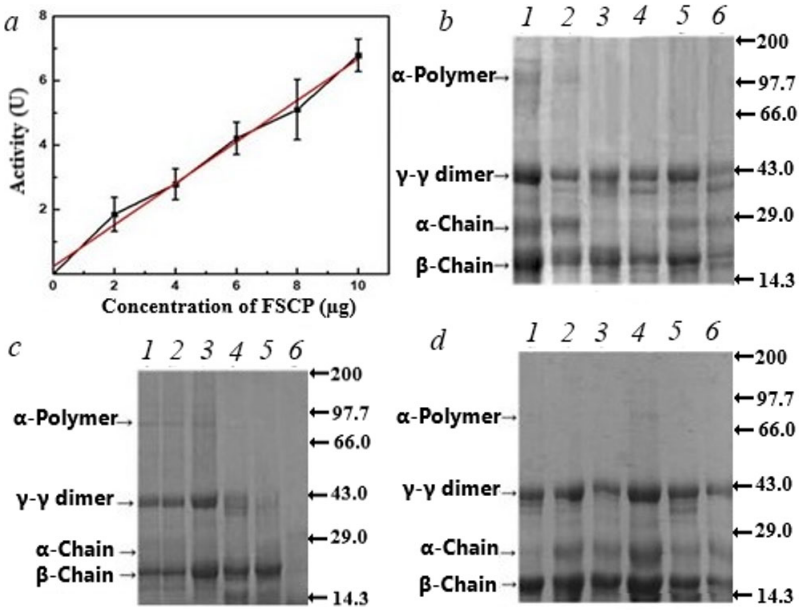

Рис. 6. Фибринолитическая активность FSCP. *a* – Колориметрическое определение фибринолитической активности. Отмытый сгусток крови инкубировали с 0–10 мкг белка FSCP в течение 2,5 ч и деградацию субстрата оценивали по поглощению при 660 нм. *b* – Влияние количества белка FSCP на гидролиз сгустков крови. Промытый сгусток плазмы крови инкубировали течение 12 ч: в отсутствие фермента (*1*), с 2 мкг (*2*), 4 мкг (*3*), 6 мкг (*4*), 8 мкг (*5*) и 10 мкг (*6*) FSCP. Продукты реакции анализировали с помощью метода SDS-PAGE (7,5%). *c* – Зависимость гидролиза сгустков крови от продолжительности инкубации. Фибриновый сгусток инкубировали при 37 °C в отсутствие фермента (*1*) или в присутствии белка FSCP (4 мкг) в течение 0 ч (*2*), 6 ч (*3*), 12 ч (*4*), 18 ч (*5*) и 24 ч (*6*). *d* – Ингибирование активности FSCP. FSCP (4 мкг) предварительно инкубировали с ингибиторами протеаз (5 мМ) в течение 30 мин при 37 °C. Реакцию запускали добавлением фибринового сгустка. Реакционную смесь инкубировали в течение 12 ч: фибриновый сгусток (*1*), фибриновый сгусток в присутствии FSCP (*2*), FSCP и PMSF (*3*), FSCP и IAA (*4*), FSCP и EDTA (*5*); FSCP и 1,10-фенантролин (*6*)

рез 150 мин реакции. В структуре белка FSCP отсутствуют углеводные остатки, так как этот белок не образовывал основания Шиффа. IAA ингибировала активность FSCP. В то же время он был малочувствителен к действию хелаторов металлов (EDTA и 1,10-фенантролин) и ингибитора сериновых протеаз (PMSF). Поэтому нами было предположено, что этот фермент принадлежит к цистеиновым протеазам. В семенах содержится удивительно большое количество протеолитических ферментов, включая сериновые, цистеиновые, аспартат-зависимые протеазы и металлопротеазы [27]. Были всесторонне изучены сериновые протеазы и металлопротеазы из латекса растений, клещей, дождевых червей, гусениц и различных ядов змей, пауков, пчел и семян растений [28–30]. В то время как цистеиновые протеазы из семян растений были охарактеризованы в наименьшей степени.

Гемостаз – это физиологическое явление, которое играет ключевую роль в остановке кровотечения, возникающего при повреждении кровеносных сосудов [31]. В его поддержании участвуют факторы коагуляции внутреннего пути (факторы IX–XII), факторы коагуляции внешнего пути (тканевой фактор и фактор VII) и факторы коагуляции общего пути (фактор X, протромбин, тромбин, фибриноген, фибриновый сгусток и фактор XIII). Активация вышеуказанных факторов имеет место при воздействии необычных поверхностей и/или повреждении тканей через активацию зимогенов [32]. Антикоагулянты обычно блокируют специфические факторы внутренних, внешних и/или общих путей свертывания крови. FSCP показал сильную антикоагулянтную активность как *in vitro*, так и *in vivo*. Тест APTT оценивает активность внутренних факторов пути в образовании сгустка, в то время как тест PT оценивает инициацию образования сгустка через внешний путь [33]. Тот факт, что FSCP увеличивал время образования сгустка только в тесте APTT, но не в тесте PT, предполагает вмешательство этого фермента во внутренний путь свертывания крови. Однако точное место действия FSCP на внутреннем пути остается неясным. Антикоагулянтное действие белка FSCP *in vitro* и *in vivo* полностью отменялось йодоуксусной кислотой, что указывает на ключевую роль остатков цистеина. Протеазы, которые принимают участие в каскаде свертывания крови, запуская про- или антикоагулянтную активность, были обнаружены у змей, пауков и в латексе растений [34–36]. Протеазы из змеиного яда (Ancrod) и грибов

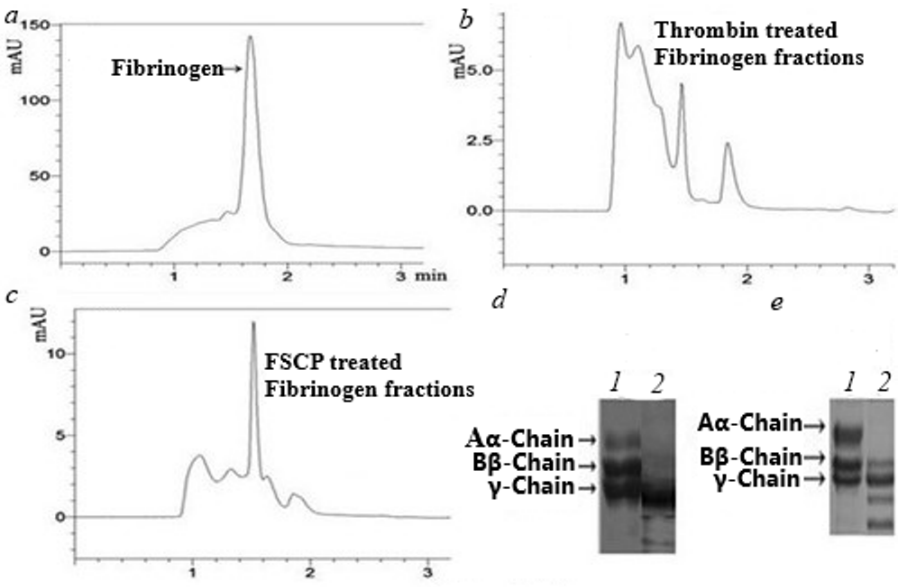

Рис. 7. Результат HPLC 50 мкг фибриногена (*a*) и продуктов его деградации, вызванной тромбином человека (*b*) и FSCP (*c*). *d*, *e* – SDS-PAGE (10%) продуктов деградации фибриногена тромбином (*d*) и конечные продукты деградации белком FSCP (*e*)

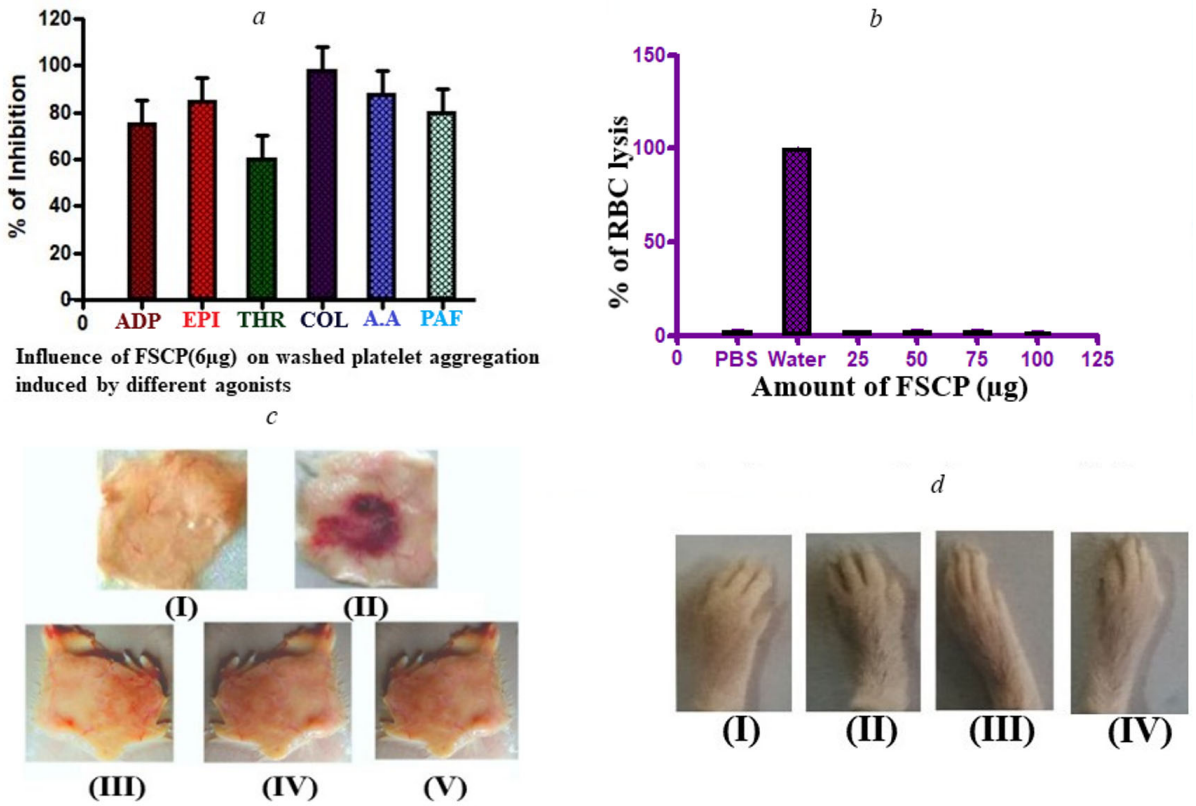

Рис. 8. *a* – Влияние FSCP (6 мкг) на агрегацию отмытых тромбоцитов, индуцированную аденозиндифосфатом (10 мкМ ADP + 50 мкг фибриногена), эпинефрином (5 мкМ эпинефрина + 50 мкг фибриногена), тромбином (2 мкМ), коллагеном (5 мкг), арахидоновой кислотой (50 мкМ) и PAF (2 мкМ). *b* – Влияние FSCP на гемолитическую активность: FSCP (0–100 мкг) предварительно инкубировали в течение 30 мин с обработанными физраствором упакованными эритроцитами. Процент эритроцитов, подвергшихся лизису, рассчитывали по измерению свободного гемоглобина в супернатанте при 540 нм. *c* – Геморрагическая активность FSCP : I – физраствор, II – положительный контроль, яд из *Daboia russelli*, III – 25 мкг, IV – 50 мкг и V – 100 мкг белка FSCP в общем объеме 50 мкл вводили мышам. *d* – Влияние FSCP на индукцию отеков: положительный контроль, яд из MDH (I); физраствор (II); FSCP, 50 мкг (III) и 100 мкг (IV)

Aspergillus oryzae (Brinase) были использованы для лечения тромботических заболеваний [37, 38]. Было показано, что протеазы, которые участвуют в каскаде свертывания крови, могут расщеплять фибриноген и фибрин человека [39]. FSCP расщеплял Aα- и Bβ-цепи и частично γ-цепь фибриногена человека. Ферменты, подобные тромбину, расщепляют фибриноген с его *N*-конца с образованием так называемых фибринопептидов А и Б, способствуя свертыванию крови [40]. Расщепление фибриногена с *C*-конца вызывает образование укороченных фрагментов, отличающихся от этих фибринопептидов, приводит к задержке коагуляции [41]. Поэтому чтобы определить место действия белка FSCP на фибриноген, нами было проведено сравнение конечных продуктов деградации фибриногена с помощью тромбина и FSCP. Интересно, что при этом не было выявлено соответствия между конечными продуктами деградации, вызванными действием тромбина и FSCP. Поэтому можно предположить, что запускаемая белком FSCP антикоагуляция может быть следствием деградации фибриногена с его *C*-конца. Фибриногенолитическая активность FSCP полностью ингибировалась только IAA, но не ингибиторами сериновых протеаз и металлопротеаз, что указывает на роль остатка цистеина в активном центре этого фермента. Цистеиновые протеазы ранее были получены из латекса *Asclepias curassavica* L., растения семейства молочного дерева (*Asclepiadaceae*) [41]. Протеаза Pergularain E I, выделенная из латекса *Pergularia extensa*, расщепляла цепи фибриногена с его *N*-конца и была похожа по своим свойствам на тромбин [10]. Полученная нами FSCP продемонстрировала фибринолитическую активность и расщепляла все цепи фибрина. Образование сгустков и их последующее растворение играют основную роль не только при заживлении ран, но и при нормальном токе крови в артериях и венах [42–43]. Нарушение растворения сгустков также является основным фактором, вносящим вклад в патофизиологию тромбоза [44]. Так, устойчивый к нагреванию низкомолекулярный гликопротеин латекса из *Synadenium grantii* показывал фибринолитическую активность [45]. Кроме фибриногена, FSCP не расщеплял белки плазмы крови. Более того, FSCP ингибировала процесс агрегации отмытых тромбоцитов, индуцированный различными агонистами, такими как ADP, эпинефрин, тромбин, коллаген, арахидоновая кислота и PAF. Из всех изученных в настоящей работе агонистов белок FSCP более всего ингибировал агрегацию тромбоцитов, индуцированную коллагеном, и в наименьшей мере он ингибировал агрегацию тромбоцитов, индуцированную PAF. Это может быть обусловлено специфичностью взаимодействия FSCP с рецепторами тромбоцитов или с другими агонистами. FSCP может распознавать в качестве субстратов рецепторы тромбоцитов и расщеплять их, вызывая таким образом их инактивацию, что, в свою очередь, может влиять на связывание агонистов с этими рецепторами. Другое предположение заключается в том, что отдельные агонисты могут взаимодействовать с различными доменами FSCP и регулировать (понижать) его способность ингибировать агрегацию тромбоцитов. Поэтому наблюдается снижение степени ингибирования агрегации тромбоцитов. Тем не менее в настоящее время преждевременно говорить о точном механизме действия FSCP на каскад свертывания крови и функционирование тромбоцитов, опираясь на результаты изучения их взаимодействия. Ранее были охарактеризованы различные антитромбоцитарные агенты из природных источников [46–48], включая покрытые лигнином наночастицы [49], локснекрогин из яда коричневого паука *Loxosceles gauchor* [50] и сериновая протеаза из яда паука *Hippasa agelenoides* [34]. FSCP оказался неспособен нарушать целостность мембран эритроцитов, и поэтому он не вызывал высвобождение гемоглобина из эритроцитов. Кроме того, он не повреждал кровеносные сосуды и не демонстрировал геморрагическую активность. Также FSCP не вызывает появление отеков на подушечках ног экспериментальных мышей, что указывает на отсутствие у него токсичности.

В целом, в настоящей работе из буферного экстракта семян льна был выделен высокомолекулярный (168 кДа) белок FSCP. Нами были продемонстрированы сильные антикоагулянтные и антитромбоцитарные свойства этого белка. Наблюдаемая антикоагулянтная активность FSCP может быть связана с его участием во внутреннем пути свертывания крови. FSCP также специфически расщеплял фибриноген и фибрин. Следовательно, большой интерес представляет изучение в дальнейшем механизма действия FSCP на каскад свертывания крови и функционирование тромбоцитов.

Благодарности. D.S. и S.K. выражают благодарность департаменту науки и технологий, правительству Индии, Нью-Дели и группе поддержки развития науки и технологий при правительстве штата Карнатака, Бангалор, за оказанную финансовую поддержку.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все эксперименты проводились в соответствии с руководствами по этике и были одобрены институциональным комитетом по этике работы с человеком (IHEC-UOM No. 47Res/2014–15), университет штата Майсур, Майсуру, Индия. Проведение экспериментов над лабораторными животными было разрешено институциональным комитетом по этике работы с лабораторными животными (UOM/IAEC/02/2016), университет штата Майсур, Майсуру, Индия. Работа с лабораторными животными проводилась в соответствии с руководством комитета по контролю и надзору за экспериментами над животными (CPCSEA – Committee for the purpose of monitoring and supervision of experiments on animals).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tarpila, A., Wennberg, T., and Tarpila, S. (2005) Flaxseed as a functional food, *Curr. Top. Nutr. Res.*, **3**, 167-188.
2. Yadav, R. P., Patel, A. K., and Jagannadham, M. V. (2011) Purification and biochemical characterization of a chymotrypsin like serine protease from *Euphorbia neriifolia* Linn, *Process Biochem.*, **46**, 1654-1662.
3. Mahajan, R. T., and Chaudhary, G. M. (2014) Plant latex as vegetable source for milk clotting enzymes and their use in cheese preparation, *Int. J. Adv. Res.*, **2**, 1173-1181.
4. Fox, J. W., and Serrano, S. M. (2005) Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases, *Toxicon*, **45**, 969-985.
5. Koh, D. C., Armugam, A., and Jeyaseelan, K. (2006) Snake venom components and their applications in biomedicine, *Cell. Mol. Life Sci.*, **63**, 3030-3041.
6. Larréché, S., Mion, G., and Goyffon, M. (2008) Haemostasis disorders caused by snake venoms, *Ann. Fr. Anesth. Reanim.*, **27**, 302-309.
7. Zhu, Z. G., and Wu, S. G. (1999) Fibrinogenolytic properties of natrahagin (a proteinase from cobra venom) and its effect on human platelet aggregation, *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, **20**, 944-947.
8. Kini, R. M., and Evans, H. J. (1991) Inhibition of platelet aggregation by a fibrinogenase from Naja nigricollis venom is independent of fibrinogen degradation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1095**, 117-121.
9. Guo, X. X., Zeng, L., and Lee, W. H. (2007) Isolation and cloning of a metalloproteinase from king cobra snake venom, *Toxicon*, **49**, 954-965.
10. Holenarasipur, S. V., Rajesh, R., Brigitte, F., Felix, F., and Bannikuppe, V. S. (2010) "Pergularain E I" – a plant cysteine protease with thrombin-like activity from Pergularia extensa latex, *Thromb. Res.*, **125**, e100-e105.
11. Gunter, R., Hans, P. S., and Friedrich, D. P. (2002) Activation and inactivation of human factor X by proteases derived from Ficus carica, *Br. J. Haematol.*, **119**, 1042-1051.
12. Eagle, H., and Harris, T. N. (1937) Studies in blood coagulation: The coagulation of blood by proteolytic enzymes (trypsin, papain), *J. Gen. Physiol.*, **20**, 543-560.
13. Nandish, M. S. K., Kengaiah, J., Ramachandraiah, C., Shivaiah, A., Chandramma, S., and Girish, K. S. (2018) Anticoagulant, antiplatelet and fibrin clot hydrolyzing activities of flax seed buffer extract, *Pharmacogn. Mag.*, **14**, 175-183.
14. Bradford, M. M. (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-54.
15. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685.
16. Leach, B. S., Collawn, J. F., and Fish, W. W. (1980) Behavior of glycol-polypeptides with empirical molecular weight estimation methods in sodium dodecyl sulphate, *Biochemistry*, **9**, 5734-5741, doi: 10.1021/bi00566a011.
17. Satake, M., Murata, Y., and Suzuki, Y. (1963) Studies on snake venoms XIII Chromatographic separation and properties of three proteinases from Agkistrodon halys blomhoffii venom, *J. Biochem.*, **53**, 483-497, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a127720.
18. Sowmyashree, G., Bhagyalakshmi, M., Girish, K. S., Kemparaju, K., Rangaiah, S. M., and Jane, H. P. (2015) Jackfruit (Artocarpush eterophyllus) seed extract exhibits fibrino(geno)lytic activity, *Pharmacogn. J.*, **7**, 171-177.
19. Quick, A. J., Stanley, M., and Bancroft, F. W. (1935) A study of the coagulation defect in hemophilia and in jaundice, *Am. J. Med. Sci.*, **190**, 501-511.
20. Bhagyalakshmi, M., Sowmyashree, G., Kesturu, G. S., Kempaiah, K., and Sathish, J. G. (2015) Momordica charantia seed extract exhibits strong anticoagulant effect by specifically interfering in intrinsic pathway of blood coagulation and dissolves fibrin clot, *Blood Coagul. Fibrin.*, **26**, 191-199.
21. Ouyang, C., and Teng, C. M. (1976) Fibrinogenolytic enzymes of Trimeresurus mucrosquamatus venom, *Biochim. Biophys. Acta*, **420**, 298-308.
22. Rajesh, R., Raghavendra, C. D., and Nataraju, A. (2005) Procoagulant activity of Calotropisgigantea latex associated with fibrin(ogen)olytic activity, *Toxicon*, **46**, 84-92.
23. Kumar, M. S., Devaraj, V. R., Vishwanath, V. S., and Kemparaju, K. (2010) Anti-coagulant activity of a metalloprotease: further characterization from the Indian cobra (Najanaja) venom, *J. Thromb. Thrombolysis*, **29**, 340-348.
24. Born, G. V. (1962) Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal, *Nature*, **194**, 27-29.
25. Vishwanath, B. S., Kini, R. M., and Gowda, T. V. (1987) Characterization of three edema-inducing phospholipase A2 enzyme from habu (Trimeresurus flavoviridis) venom and their interaction with the alkaloid arisatolochic acid, *Toxicon*, **25**, 501-515.
26. Kondo, H., Kondo, S., Itezawa, H., Murata, R., and Ohasaka, A. (1969) A study on the quantitative method from determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom, *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **13**, 43-51.
27. Ramachandraiah, C., Nandish, S. K. M., Kengaiah, J., Shivaiah, A., and Chandramma, S. (2017) Evaluation of anticoagulant and antiplatelet activity of Pisum sativum Pod extract, *J. Blood Res. Hematol. Dis.*, **2**.
28. Lynn, K. R., and Clevette, N. A. (1985) Two proteases from the latex of Euphorbia drupifera, *Phytochemistry*, **24**, 2843-2845.
29. Yadav, S. C., Pande, M., and Jagannadham, M. V. (2006) Highly stable glycosylated serine protease from the medicinal plant Euphorbia milli, *Phytochemistry*, **67**, 1414-1426.
30. Devaraja, S., Nagaraju, S., Mahadeshwara, S. Y. H., Girish, K. S., and Kemparaju, K. (2008) A low molecular weight serine protease: purification and characterization from Hippasa agelenoides (Funnel web) spider venom gland extract, *Toxicon*, **52**, 130-138.
31. Reis, C. V., Portaro, F. C. V., Andrade, A. S., Fritzen, M., Fernandes, B. L., and Sampaio, C. A. M. (2006) A prothrombin activator serine protease from the Lonomia obiqua Caterpillar venom (Lopap): biochemical characterization, *Thromb. Res.*, **102**, 427-436.
32. Kumar, R. V., Gowda, C. D., Shivaprasad, H. V., Siddesha, J. M., Sharath, B. K., and Vishwanath, B. S. (2010) Purification and characterization of "Trimarin" a hemorrhagic metalloprotease with factor Xa-like Activity, from Trimeresurus malabaricus snake venom, *Thromb. Res.*, **126**, e356-e364.

33. Gowda, C. D., Shivaprasad, H. V., Kumar, R. V., Rajesh, R., Saikumari, Y. K., and Frey, B. M. (2011) Characteriz-ation of major zinc containing myonecrotic and Procoagulant metalloprotease "malabarin" from non-lethal trimeresurus malabaricus snake venom with thrombin like activity: its neutralization by chelating agents, *Curr. Top. Med. Chem.*, **11**, 2578-2588.
34. Devaraja, S., Girish, K. S., Gowtham, Y. J. M., and Kemparaju, K. (2010) The Hag-protease-II is a fibrin(ogen)ase from *Hippasa agelenoides* spider venom gland extract: purification, characterization and its role in hemostasis, *Toxicon.*, **57**, 248-258.
35. Shivaprasad, H. V., Rajesh, R., Nanda, B. L., Dharmappa, K. K., and Vishwanath, B. S. (2009) Thrombin like activity of Asclepias curassavica L. latex: action of cysteine proteases, *J. Ethno Pharmacol.*, **123**, 106-109.
36. Asadi, H., Yan, B., Dowling, R., Wong, S., and Mitchell, P. (2014) Advances in medical revascularisation treatment in acute ischemic stroke, *Trombosis*, **7**, 42-48.
37. Larsson, L. J., Frisch, E. P., Törneke, K., Lindblom, T., and Björk, I. (1988) Properties of the complex between alpha 2-macroglobulin and brinase, a proteinase from Aspergillus oryzae with thrombolytic effect, *Thromb. Res.*, **49**, 55-68.
38. Drake, T. A., Morrissey, J. H., and Edgington, T. S. (1989) Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis, *Am. J. Pathol.*, **134**, 1087-1097.
39. Åstrup, T. (1958) The haemostatic balance, *Thromb. Diath. Haemorrh.*, **2**, 347-357.
40. Lu, Q. (2005) Snake venoms and haemostasis, *J. Thromb. Hemostat.*, **3**, 1791-1799.
41. Shivaprasad, H. V., Riyaz, M., Venkatesh, K. R., Dharmappa, K. K., Tarannum, S., and Siddesha, J. M. (2009) Cysteine proteases from the Asclepiadaceae plants latex exhibited thrombin and plasmin like activities, *J. Thromb. Thrombolysis*, **28**, 304-308.
42. Veiga, S. S., da-Sliveria, R. R., Dreyfuss, J. L., Haoach, J., Pereira, A. M., and Mangili, O. C. (2000) Identification of high molecular weight serine proteases in Loxosceles intermedia (Brown spider) venom, *Toxicon*, **38**, 825-839.
43. Schwartz, M. L., Pizzo, S. V., Hill, R. L., and McKee, P. A. (1973) Human factor XIII from plasma and platelets: molecular weights, subunit structures, proteolytic activation and cross-linking of fibrinogen and fibrin, *J. Biol. Chem.*, **248**, 1395-1407.
44. Lewis, S. D., Janus, T. J., Lorand, L., and Shafer, J. A. (1985) Regulation of formation of factor XIIIa by its fibrin substrates, *Biochemistry*, **24**, 6772-6777.
45. Rajesh, R., Nataraju, A., Raghavendra, C. D., Frey, B. M., Frey, F. J., and Vishwanath, B. S. (2006) Purification and characterization of a 34-kDa, heat stable glycoprotein from Synadenium grantii latex: action on human fibrinogen and fibrin clot, *Biochimie*, **88**, 1313-1322.
46. Kahn, M. L. (1998) A dual thrombin receptor system for platelet activation, *Nature*, **394**, 690-694.
47. Sims, P. J., Wiedmer, T., Esmon, C. T., Weiss, H. J., and Shattil, S. J. (1989) Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane, *J. Biol. Chem.*, **264**, 17049-17057.
48. Giesen, P. L. (1999) Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 2311-2315.
49. Marulasiddeshwara, M. B., Dakshayani, S. S., Sharath, K. M. N., Chethana, R., Raghavendra, K. P., and Devaraja, S. (2017) Facile-one pot-green synthesis, antibacterial, antifungal, antioxidant and antiplatelet activities of lignin capped silver nanoparticles: a promising therapeutic agent, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, **81**, 182-190, doi: 10.1016/j.msec.2017.07.054.
50. Cunha, R. B., Barbaro, K. C., Muramatsu, D., Portaro, F. C. V., Fontes, W., and de-Souza, M. V. (2003) Purification and characterization of Loxnecrogin a dermonecrotic toxin from Loxosceles gaucho Brown spider venom, *J. Protein Chem.*, **22**, 135-146.

FLAXSEED CYSTEINE PROTEASE EXHIBITS STRONG ANTICOAGULANT, ANTIPLATELET, AND CLOT-DISSOLVING PROPERTIES

S. K. M. Nandish[1], J. Kengaiah[1], Ch. Ramachandraiah[1], Chandramma[1], A. Shivaiah[1], S. M. Santhosh[2], Thirunavukkarasu[3], and D. Sannaningaiah[1a]*

[1] *Department of Studies and Research in Biochemistry and Centre for Bioscience and Innovation, Tumkur University, 572103 Tumkur, India; E-mail: sdevbiochem@gmail.com*

[2] *Department of Medicinal Biochemistry and Microbiology (IMBM), Uppsala Biomedical Centre, 75237 Uppsala, Sweden*

[3] *Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Life Sciences, Pondicherry University, 605014 Pondicherry, Tamil Nadu, India*

Received March 21, 2020
Revised May 26, 2020
Accepted May 29, 2020

In this study, we purified and characterized flaxseed cysteine protease (FSCP) with strong anticoagulant, antiplatelet, and clot-dissolving properties. The enzyme was purified to homogeneity by a combination of gel permeation and ion-exchange column chromatography techniques. The purity of the enzyme was evaluated by SDS-PAGE, RP-HPLC, and MALDI-TOF. FSCP was observed a single band of approximately 160 kDa in SDS-PAGE under reducing and non-reducing conditions. The exact molecular mass of FSCP was found to be 168 kDa by MALDI-TOF. The CD spectra of FSCP revealed the presence of 25.6% helices, 25.8% turns, and 48% random coils with no beta-sheet structures. FSCP hydrolyzed both casein and gelatin with a specific activity of 3.5 and 4.2 unit/mg min respectively. The protef olytic activity of FSCP was completely abolished by iodoacetic acid (IAA), suggesting FSCP is a cysteine protease. The pH optimum for the proteolytic activity of FSCP was pH 6.0; the temperature optimum was 30°C. FSCP exhibited strong anticoagulant effect in both platelet-rich plasma (PRP) and platelet-poor plasma (PPP) by extending the clotting time from 222 to 1100 s and from 256 to 1210 s, respectively. FSCP degraded human fibrinogen and fibrin clots. The products of fibrinogen degradation by thrombin and FSCP were different. Furthermore, FSCP inhibited aggregation of washed platelets triggered by ADP, epinephrine, thrombin, collagen, arachidonic acid, and platelet activating factor (PAF). FSCP was found to be nontoxic as it did not damage the membrane of red blood cells (RBCs) and did not induce hemorrhage and edema in experimental mice.

Keywords: cysteine protease, anticoagulant, antiplatelet, non-toxic