

УДК 582.282.123.4 : 577.152.34

МИКРОМИЦЕТЫ *ASPERGILLUS FLAVUS* И *A. ORYZAE* КАК ПРОДУЦЕНТЫ ПРОТЕИНАЗ – АКТИВАТОРОВ БЕЛКОВ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА ЧЕЛОВЕКА

© 2019 г. А. А. Осмоловский^{1,*}, В. Г. Крейер¹, А. В. Кураков¹, Н. А. Баранова¹,
Н. Ф. Пискунова¹, Н. С. Егоров¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия

* E-mail: aosmol@mail.ru

Поступила в редакцию 18.02.2018 г.

После доработки 13.10.2018 г.

Принята к публикации 24.12.2018 г.

С помощью специфических хромогенных пептидных субстратов белков системы гемостаза изучена способность 2-х штаммов микроскопических грибов *Aspergillus flavus* 1 и *A. oryzae* k1 секретировать протеиназы с прямой и активаторной к проферментам системы гемостаза человека активностью. Спектр активности их протеиназ в отношении использованных субстратов достаточно близок, что может быть связано с близким родством этих видов аспергиллов. Протеиназы *A. flavus* 1 и *A. oryzae* k1 обладали плазминоподобной, тромбиноподобной и незначительной урокиназной активностью. Впервые была показана активирующая фактор X и протеин С активность протеиназ у этих видов микромицетов. Наибольшую активаторную к фактору X активность проявили внеклеточные протеиназы *A. flavus* 1, а активаторную к протеину С – протеиназы *A. oryzae* k1.

Ключевые слова: аспергиллы, протеиназы – активаторы белков системы гемостаза, протеиназы микромицетов, фибринолитические ферменты

DOI: 10.1134/S0026364819030103

Способность микромицетов, в том числе аспергиллов, секретировать протеолитические ферменты, активные в отношении белков системы гемостаза интенсивно изучается в последние годы (Pashmi, Liny, 2013; Kotb, 2014; Osmolovskiy et al., 2014, 2017; Sharkova et al., 2015; Afini et al., 2016). Обнаружены протеиназы, которые проявляют фибрино- и фибриногенолитическое действие или активируют проферменты кровотока (протеин С, фактор X, протромбин, плазминоген, прекалликреин), превращая их в физиологически активные ферменты. Подобные свойства позволяют, наряду с ферментами животного происхождения, использовать эти протеиназы в терапии и диагностике тромбозов и тромбоэмболических заболеваний.

Внеклеточные протеиназы разных видов микромицетов различаются по своим физико-химическим характеристикам и по специфичности к тем или иным белкам системы гемостаза, причем часто одновременно проявляют активность по отношению к нескольким из них. Поэтому активно проводятся исследования по поиску продуцентов протеиназ, специфичных по отношению к определенным белкам системы гемостаза человека, в особенности, обладающих активаторной активностью. Наиболее активными и специфичными

по отношению к различным проферментам плазмы крови являются протеиназы, образуемые представителями рода *Aspergillus*. Выделенные протеиназы *A. ochraceus* L-1 обладают активаторной активностью к протеину С и фактору X, а протеиназы *A. terreus* 2 – к прекалликреину (Zvonareva et al., 2015). Помимо активаторной активности, эти протеиназы расщепляют лишь несколько хромогенных пептидных субстратов протеиназ гемостаза, что отличает их от протеиназ других аспергиллов. Внеклеточные протеиназы некоторых видов аспергиллов могут обладать только прямой протеолитической активностью, расщепляя либо большинство, либо ограниченный набор хромогенных пептидных субстратов протеиназ гемостаза и не проявлять активаторного на проферменты плазмы действия (Osmolovskiy et al., 2014, 2017). Все это свидетельствует об актуальности изучения спектра протеолитического действия в отношении белков системы гемостаза внеклеточных протеиназ аспергиллов ранее не исследованных в этом отношении видов.

Целью работы было изучение способности внеклеточных протеиназ *A. flavus* 1 и *A. oryzae* k1 воздействовать на белки системы гемостаза человека.

Таблица 1. Активность внеклеточных протеиназ аспергиллов по отношению к белкам системы гемостаза человека

Субстрат	Наличие плазмы в реакции	Активность	Активность, Е/мл × 10 ^{-3*}	
			<i>Aspergillus flavus</i> 1	<i>Aspergillus oryzae</i> k1
H-D-Val-Leu-Lys-pNA	–	плазминоподобная	39.7	14.8
	+	активирующая плазминоген	–	–
Tos-Gly-Pro-Arg-pNA	–	тромбиноподобная	39.8	6.3
	+	активирующая протромбин	–	–
H-D-Phe-Pip-Arg-pNA	–	тромбиноподобная	0	0
	+	активирующая протромбин	2.6	0
Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA	–	фактор Ха-подобная	0	0
	+	активирующая X-фактор	11.7	1.1
Bz-Ile-Glu(γ-OR)-Gly-Arg-pNA	–	фактор Ха-подобная	0	0
	+	активирующая X-фактор	0	0
pGlu-Pro-Arg-pNA	–	подобная активированному протеину С	0	0
	+	активирующая протеин С	9.6	31.3
pGlu-Gly-Arg-pNA	–	урокиназная	1.3	2.3
	+	активирующая плазминоген	–	–

Примечание. *Прочерк – активность не определяли.

Использованные в работе микромицеты были выделены из почвенных образцов на кафедре микологии и альгологии МГУ имени М.В. Ломоносова. Культивирование штаммов для изучения образования протеолитических ферментов проводили в глубинных условиях на среде, содержащей источник аминного и минерального азота по описанному ранее способу (Osmolovskiy et al., 2014).

Активность протеиназ, образуемых *A. flavus* 1 и *A. oryzae* k1, в отношении белков системы гемостаза определяли по расщеплению их специфических хромогенных пептидных субстратов: плазмينا (H-D-Val-Leu-Lys-pNA), тромбина (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA и H-D-Phe-Pip-Arg-pNA), фактора Ха (Bz-Ile-Glu(OR)-Gly-Arg-pNA и Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA), активированного протеина С (pGlu-Pro-Arg-pNA) и урокиназы (pGlu-Gly-Arg-pNA). Реакции проводили путем добавления к культуральной жидкости 0.05% раствора соответствующего субстрата (прямая активность) или, прединкубируя ее с плазмой крови человека с последующим добавлением субстрата (активаторная активность) в случае отсутствия прямой активности, как описано ранее (Osmolovskiy et al., 2012). Единица активности (Е) фермента – количество мкмоль п-нитроанилина, отщепившегося от хромогенного субстрата за 1 мин при 37°C.

Результаты определения прямой и активаторной к белкам системы гемостаза активности внеклеточных протеиназ *A. flavus* 1 и *A. oryzae* k1 представлены в табл. 1.

Прямая протеолитическая активность протеиназ *A. flavus* 1 установлена в реакции с субстратами

плазмина и урокиназы и с одним из субстратов тромбина (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA). Внеклеточные протеиназы *A. oryzae* k1 также были активны в отношении этих субстратов, но их плазминоподобная и тромбиноподобная активность была ниже в 2.7 и 6.1 раза, соответственно, чем активность протеиназ *A. flavus* 1. Урокиназная активность протеиназ *A. oryzae* k1 была несколько выше по сравнению с активностью протеиназ *A. flavus* 1 (табл. 1).

Установлена избирательность действия протеиназ *A. flavus* 1 и *A. oryzae* k1 на хромогенные пептидные субстраты. Из двух субстратов – тромбина и фактора Ха, протеиназы этих двух видов аспергиллов, как и других изученных аспергиллов, расщепляли только один (Osmolovskiy et al., 2017). Эти данные подтверждают зависимости проявления протеолитической активности аспергиллов от последовательности аминокислотных остатков и их количества в хромогенном пептидном субстрате (Osmolovskiy et al., 2014).

Активаторная активность протеиназ *A. flavus* 1 и *A. oryzae* k1 была обнаружена в отношении фактора X (с субстратом Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA) и активированного протеина С. Данные активности у обоих видов микромицетов были обнаружены впервые. Причем, внеклеточные протеиназы *A. flavus* 1, по сравнению с протеиназами *A. oryzae* k1 обладали наибольшей активаторной к фактору X активностью, а активаторной к протеину С – наоборот.

Показано, что протеиназы *A. flavus* 1 обладали незначительной активаторной к протромбину активностью.

Микромицеты этих видов известны как продуценты протеиназ с фибринолитической (плазминоподобной) активностью (Monkhouse et al., 1964; Shirasaka et al., 2012; Pashmi, Liny, 2013). Это подтверждают и полученные нами данные. Известна коагулянтная и незначительная антикоагулянтная активность протеиназ этих видов. Под их воздействием происходило свертывание плазмы крови, однако механизмы, лежащие в ее основе, установлены не были (Monkhouse et al., 1964; Pashmi, Liny, 2013). Полученные нами данные позволяют полагать, что протеиназы *A. flavus* 1 и *A. oryzae* k1 вызывают свертывание крови через активацию фактора X, а проявляют антикоагулянтную активность вследствие активации протеина C.

Полученные данные свидетельствуют о том, что микроскопические грибы *A. flavus* 1 и *A. oryzae* k1 являются продуцентами активаторов белков системы гемостаза человека – фактора X и протеина C. Спектр протеолитической активности *A. flavus* 1 и *A. oryzae* k1 по отношению к белкам системы гемостаза сходен, что скорее всего обусловлено их близкородственными связями (Lee et al., 2004; Samson et al., 2014).

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-29-25073.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Afini A.V.M., Sooraj S.N., Smitha K.V., Kunhi A.A.M. Production and partial characterization of fibrinolytic enzyme from a soil isolate *Aspergillus carbonarius* S-CSR-0007. Int. J. Pharm. Sci. 2016. V. 8 (12). P. 142–148.
- Kotb E. The biotechnological potential of fibrinolytic enzymes in the dissolution of endogenous blood thrombi. Biotechnol. Prog. 2014. V. 30 (3). P. 656–672.
- Lee C.Z., Liou G.Y., Yuan G.F. Comparison of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae* by amplified fragment length polymorphism. Bot. Bull. Acad. Sin. 2004. V. 45. P. 61–68.
- Monkhouse F.C., Daramola F., Gillespie R.J. The action of a proteolytic enzyme from *Aspergillus oryzae* on components of the blood clotting system. Can. J. Physiol. Pharmacol. 1964. V. 42 (4). P. 377–384.
- 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. V. 48 (5). P. 488–492.
- Osmolovskiy A.A., Kurakov A.V., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Ability of Extracellular proteinases of micromycetes *Aspergillus flavipes*, *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus sydowii* to affect proteins of the human haemostatic system. Mosc. Univ. Biol. Sci. Bull. 2017. V. 72 (1). P. 20–24.
- Osmolovskiy A.A., Zvonareva E.S., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. The effect of micromycete extracellular proteases of *Aspergillus* genus on the proteins of haemostatic system. Russ J Bioorg Chem. 2014. V. 40 (6). P. 634–639.
- Pashmi B.S., Liny P. Production and characterization of novel fibrinolytic enzyme from different soil fungal species. Int. J. Pharm. Biol. Sci. 2013. V. 4 (3). P. 454–463.
- Samson R.A., Visagie C.M., Houbraeken J., Hong S.B., Hubka V., Klaassen C.H.W., Perrone G., Seifert K.A., Susca A., Tanney J.B., Varga J., Kocsub S., Szigeti G., Yaguchi T., Frisvad J.C. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Stud. Mycol. 2014. V. 78. P. 141–173.
- Sharkova T.S., Kurakov A.V., Osmolovskiy A.A., Matveeva E.O., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Screening of producers of proteinases with fibrinolytic and collagenolytic activities among micromycetes. Microbiology. 2015. V. 84 (3). P. 359–364.
- Shirasaka N., Naitou M., Okamura K., Kusuda M., Fukuta Y. Purification and characterization of a fibrinolytic protease from *Aspergillus oryzae* KSK-3. Mycoscience. 2012. V. 53 (5). P. 354–364.
- Zvonareva E.S., Osmolovskiy A.A., Kreier V.G., Baranova N.A., Kotova I.B., Egorov N.S. Identification of targets for extracellular proteases activating proteins of the haemostatic system produced by micromycetes *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus terreus*. Russ. J. Bioorg. Chem. 2015. V. 41 (5). P. 500–505.

Micromycetes *Aspergillus ochraceus* and *A. flavus* as Producers of Proteinases Activating the Proteins of Human Hemostasis System

A. A. Osmolovskiy^{a,*}, V. G. Kreier^a, A. V. Kurakov^a, N. A. Baranova^a, N. F. Piskunkova^a, and N. S. Egorov^a

^a Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

* E-mail: aosmol@mail.ru

The ability of 2 strains of microscopic fungi *Aspergillus flavus* 1 and *A. oryzae* k1 to secrete proteases with direct and activator activity to human hemostasis proenzymes was studied by applying of specific chromogenic peptide substrates of proteins of the hemostasis system. The spectrum of activity of their proteinases in relation to the used substrates is quite similar, which may be due to the close relationship of these species. Proteases of *A. flavus* 1 and *A. oryzae* k1 possessed plasmin-like, thrombin-like and insignificant urokinase activity. For the first time was shown activating factor X and protein with proteinase activity in these species of micromycetes. The highest activator activity to factor X had the extracellular proteinases of *A. flavus* 1, and the activator protein C activity – proteinase *A. oryzae* k1.

Key words: *Aspergillus flavus*, *A. oryzae*, fibrinolytic enzymes, proteinases – activators of proteins of the hemostasis system, proteinases of micromycetes