

ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ ДЛЯ БИОМЕДИЦИНЫ

С.Н. Тиморшина, Е.А. Ганецкая, А.А. Осмоловский

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики, Москва, Россия

С каждым годом увеличивается востребованность протеолитических ферментов в биомедицине и биофармацевтике в связи с разработкой новых методов их применения. Вследствие этого растет и дефицит протеаз направленного действия с искомыми физико-химическими и биохимическими свойствами. Одними из наиболее актуальных направлений развития современной биофармацевтики являются поиск и изучение ферментов и ферментных препаратов, эффективных в терапии ран и инфекций, вызываемых бактериями, способными к биопленкообразованию (Fleming and Rumbaugh, 2017; Suresh et al., 2019). При лечении обширных ран и ожогов оказывается важным этап очистки области поражения от некротизирующих тканей, богатых фибриллярными белками, такими как коллаген, фибрин, кератин, которые могут служить питательным субстратом для патогенных и условнопатогенных микроорганизмов. Хирургический подход, наиболее распространенный в настоящее время, приводит к повреждению здоровых тканей и увеличению времени заживления и реабилитации, тогда как удаление продуктов распада клеток и деградации тканевой жидкости за счет ферментов позволяет снизить негативное воздействие на здоровые ткани. Более того, при ожоговых повреждениях наблюдается иммуносупрессия, благодаря чему инфекции развиваются почти беспрепятственно. Наиболее распространенный представитель микробиоты ожоговых ран – *Pseudomonas aeruginosa* – бактерия, способная к активному биопленкообразованию, что снижает эффективность стандартной антибиотической терапии (Андреева и др., 2018; Sevgi et al., 2014). Полное разрушение матрикса биопленок, богатого полисахаридами, приводит к переходу клеток инфекционного агента в планктонную форму и их распространению по организму человека (Mann et al., 2012). В связи с этим нами предложена схема комбинированной терапии, заключающейся в обработке биопленок *Pseudomonas aeruginosa* смесью протеаз и антибиотиков для частичного разрушения матрикса и проникновения бактерицидных агентов в толщу биопленок с предотвращением появления планктонных форм патогена и его распространения по организму.

Бактерии и микроскопические грибы – наиболее широко используемые в промышленности продуценты ферментов, в том числе протеаз. Однако более экологичные и рентабельные методы культивирования, применяемые именно при выращивании микромицетов, а также большее разнообразие ферментов, синтезируемых одним организмом, делает мицелиальные грибы наиболее перспективными продуцентами согласно современным тенденциям экономики (de Souza et al., 2015). Вследствие этого нами был проведен скрининг среди препаратов внеклеточных белков микромицетов-продуцентов протеолитических ферментов для поиска препаратов с востребованными для биомедицины и биофармацевтики свойствами.

Скрининг проводили среди ферментных препаратов 12 штаммов микроскопических грибов рода *Aspergillus* из коллекции кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Также сравнивали свойства изучаемых образцов с коммерческими препаратами: кислой протеазой *Aspergillus saitoi*, террилитином (протеазы *Aspergillus terricola*, применяемые в ожоговой терапии) и трипсином. Комплексные препараты внеклеточных белков микромицетов получали путем культивирования продуцентов в глубинных условиях на ранее подобранных средах, высаливания белков сульфатом аммония из культуральной жидкости, а также последующих диализа и лиофильного высушивания. Хранение препаратов осуществляли при -20 °С. Для изучения специфичности протеолитической активности ферментов проводили реакции с суспензиями окрашенных белковых субстратов: 0.2 % азоказеина, 0.2 % азоколлагена, 10.0 % кератин-азура, 0.2 % эластин-конго красного (ЭКК) и 2.0 % Hide Powder Azure (HРА). Все суспензии готовили на 0.05 М Трис-НCl буфере (рН 8.2). Количество продуктов реакции измеряли спектрофотометрически. За единицу активности принимали количество фермента, которое вызывало изменение оптической плотности на 0.01 ед. в условиях проведения реакции (рН 8.2, 37 °С, при перемешивании).

Результаты скрининга ферментных препаратов с различными окрашенными белковыми субстратами представлены в таблице 1. Как видно из полученных данных, большинство изучаемых ферментных препаратов обладают общей протеолитической активностью, сопоставимой с коммерческими препаратами, на что указывает активность с азоказеином и HРА.

Низкая эластолитическая активность позволяет сделать предположение о низком уровне патогенности микроскопических грибов (Kothary et al., 1984; Tamura et al., 1992; Khosravi et al., 2012), что является необходимым свойством для внедрения продуцентов в промышленность. А внеклеточные протеазы микромицетов *A. alliaceus*, *A. giganteus*, *A. raperi* и *A. sclerotiorum* показали большую эффективность при гидролизе азоколлагена и кератин-азура, чем коммерческие препараты, что может говорить о их перспективности в терапии ожоговых ран.

Таблица 1. Протеолитическая активность ферментных препаратов микромицетов рода *Aspergillus*

Культура	Протеолитическая активность с окрашенными субстратами, Е				
	Азоказеин	Азоколлаген	Кератин-азур	ЭКК	НРА
<i>A. alliaceus</i>	78.7	20.5	13.9	1.2	94.6
<i>A. candidus</i>	55.5	3.2	6.1	1.2	81.8
<i>A. flavipes</i>	2.5	1.6	2.4	0.2	55.6
<i>A. flavus</i>	100.2	3.9	6.5	0.2	97.5
<i>A. fumigatus</i>	92.6	8.3	1.0	0.5	73.8
<i>A. giganteus</i>	95.4	15.3	12.0	2.0	74.7
<i>A. ochraceus</i>	88.9	10.8	9.0	1.7	85.6
<i>A. raperi</i>	88.9	25.4	7.7	0.1	86.0
<i>A. sclerotiorum</i>	82.2	17.8	13.1	0.3	78.9
<i>A. sydowii</i>	101.9	5.5	2.8	0.5	86.5
<i>A. terreus</i>	92.6	8.4	4.0	0.9	71.0
<i>A. ustus</i>	95.3	10.5	4.5	0.7	88.1
<i>A. saitoi</i> _{коммерц.}	2.3	0.7	7.5	0.2	4.8
Террилитин	100.0	10.5	10.1	0.0	96.8
Трипсин	77.2	10.2	0.0	0.2	94.6

*A. saitoi*_{коммерц.} – коммерческий препарат кислой протеазы *A. saitoi*

Также было изучено действие некоторых ферментных препаратов на биопленки *Pseudomonas aeruginosa*. Культивирование биопленок проводили в 12-луночных планшетах в течение 48 часов при 37 °С. Затем в лунки добавляли 50 мкл раствора ферментного препарата, раствора антибиотика (10 мг/л) или их комбинацию (10 и 40 мкл), воду (50 мкл) использовали для контрольных образцов. Инкубирование проводили в течение 4 часов. Далее жидкость с планктонными формами удаляли, количество метаболически активных клеток в биопленках определяли спектрофотометрически с помощью МТТ.

Наибольший эффект наблюдали при использовании ферментного препарата микромицета *A. fumigatus*. При добавлении антибиотика изменения количества метаболически активных клеток по сравнению с контролем не происходило, комплексный препарат внеклеточных белков *A. fumigatus* снизил это значение на 31 %, их комбинация на 35 %. Таким образом, микромицет *Aspergillus fumigatus* может быть рассмотрен в качестве источника ферментов для терапии инфекций, связанных с развитием биопленок *Pseudomonas aeruginosa*.

Результаты данного исследования указывают на высокий потенциал грибных протеолитических ферментов в терапии ожоговых ран, а также на перспективность поисковых работ в области ферментов направленного действия микромицетного происхождения.

Литература

- Андреева С.В. и др.. Чувствительность к антисептикам биоплёночных форм *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных из ожоговых ран // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2018. № 3. С. 249–256
- de Souza P.M., Bittencourt M.L., Caprara C.C. A biotechnology perspective of fungal proteases // Brazilian Journal of Microbiology. 2015. V. 46. № 2. P. 337–346.
- Fleming D., Rumbaugh K.P. Approaches to Dispersing Medical Biofilms // Microorganisms. 2017. V. 5. № 2. P. 15.
- Khosravi A.R., Mahdavi Omran S., Shokri H., Lotfi A., Moosavi Z. Importance of elastase production in development of invasive aspergillosis // Journal de mycologie medicale. 2012. V. 22. № 2. P. 167–172.
- Kothary M.H., Chase T. Jr., Macmillan J.D. Correlation of elastase production by some strains of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive aspergillosis in mice // Infection and Immunity. 1984. V. 43. № 1. P. 320–325.
- Mann E.E., Wozniak D.J. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology // FEMS microbiology reviews. 2012. V. 36. № 4. P. 893–916.
- Sevgi M., Toklu A., Vecchio D., Hamblin M.R. Topical Antimicrobials for Burn Infections – An Update // Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov. 2014. V. 8. № 3. P. 161–197.
- Suresh M.K., Biswas R., Biswas L. An update on recent developments in the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms // International journal of medical microbiology. 2019. V. 309. № 1. P. 1–12.
- Tamura Y., Suzuki S., Sawada T. Role of elastase as a virulence factor in experimental *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice // Microbial pathogenesis. 1992. V. 12. № 3. P. 237–244.