

МИКРОМИЦЕТЫ РОДА ASPERGILLUS КАК ПРОДУЦЕНТЫ ГЕМОСТАТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРОТЕАЗ

А.Г. Очнева, А.А. Осмоловский

МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия,

Современная экономика и медицина нуждаются в препаратах протеолитических ферментов, способных быстро воздействовать на ряд факторов плазменного гемостаза. Используемые в настоящее время препараты имеют ряд ограничений, таких как большое число побочных эффектов, системное, а не локальное действие, аллергенность и др. Более того, у них сложный процесс получения, например, из ядов змей, что обуславливает их высокую стоимость. Ряд микроорганизмов продуцирует протеазы, обладающие действием белков системы гемостаза или способностью к их активации. Было показано, что многие представители рода *Aspergillus* являются активными продуцентами таких ферментов. Такие протеазы обладают разной специфичностью, сохраняют высокую активность в широком диапазоне pH и при разной температуре. Ввиду явной недостаточности представлений о распространенности таких ферментов среди представителей рода *Aspergillus* необходимо изучать разные штаммы, которые могут потенциально оказаться перспективными продуцентами. Более того, ферменты разных штаммов различаются по субстратной специфичности, что позволяет использовать эти ферменты для терапии целого ряда заболеваний, связанных с дисфункцией системы гемостаза и для диагностических целей.

Скрининг активности ферментов штаммов микромицетов проводили в условиях двухстадийного культивирования в глубинных условиях. В скрининг вошли штаммы выделенные из почв Вьетнама: *A. janus*, *A. raperi*, *A. ustus*, *A. candidus*, *A. aculeatus*, *A. amstelodami*, *A. giganteus*, *A. niger*, *A. fisheri*. Для определения общей ферментной активности использовали нативные белки (казеин), для определения прямой активности, схожей с белками системы гемостаза – хромогенные пептидные субстраты, для определения активаторной активности – хромогенные пептидные субстраты с предшествующей инкубацией с донорской плазмой крови при 37⁰ C. В случае с казеином ферментативную активность определяли как количество свободного тирозина в супернатанте на мг белка в мл среды. В случае с хромогенными пептидными субстратами – как количество свободного пара-нитроанилина в растворе на мг белка в мл среды. Определение динамики накопления ферментов и ферментативной активности среди активных штаммов проводили также в глубинных условиях в течение 16 суток до выраженного спада активности.

В результате скрининга штаммов микромицетов были выделены штаммы *A. raperi* и *A. candidus* как продуценты самых активных ферментов. Было показано, что *A. raperi* обладает высокой прямой тромбиноподобной ($8,9 \cdot 10^{-3}$ мкмоль pNA/мг/мл), плазминоподобной ($7,54 \cdot 10^{-3}$ мкмоль pNA/мг/мл) и прямой активностью к плазминогену по урокиназному типу ($6,37 \cdot 10^{-3}$ мкмоль pNA/мг/мл), а *A. candidus* обладает высокой прямой тромбиноподобной ($8,7 \cdot 10^{-3}$ мкмоль pNA/мг/мл), плазминоподобной ($7 \cdot 10^{-3}$ мкмоль pNA/мг/мл) и активаторной к калликреину активностью ($6,1 \cdot 10^{-3}$ мкмоль pNA/мг/мл).

Таким образом, штаммы *A. raperi* и *A. candidus* являются перспективными штаммами-продуцентами гемостатически активных белков. Такие ферменты могут быть использованы в терапии и диагностике заболеваний системы гемостаза, а именно тромбозов или гемморагий различной этиологии.