Тромболитическая и фибринолитическая активность бактериальных протеаз

Ю.В. Данилова, А.М. Черёмин, А.И. Замалеева, А.М. Марданова, Н.М. Замалютдинова, М.Р. Шарипова

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

Thrombolytic and fibrinolytic activity of bacterial proteases

J.V. Danilova, A.M. Cheremin, A.I. Zamaleeva, A.M. Mardanova, M.R. Sharipova

Kazan (Volga region) Federal University, Kazan

В медицинской практике все чаще применяют протеолитические ферменты микроорганизмов. Особое внимание исследователей привлекают протеиназы, обладающие фибринолитическими свойствами, а также способные лизировать тромбы. Ранее были выделены и очищены до гомогенного состояния глутамилэндопептидаза, субтилизиноподобная протеиназа и металлоэндопептидаза Bacillus pumilus 3-19, секретируемые рекомбинантным штаммом B. subtilis JB 2036. Проведен анализ тромболитических, фибринолитических и антикоагулянтных свойств рекомбинантных ферментов. Показано, что все исследуемые протеиназы способны эффективно лизировать тромб. В условиях in vitro субтилизиноподобная протеиназа и глутамилэндопептидаза рекомбинантного штамма B. subtilis обладают антикоагулянтной активностью. Металлопротеиназа же не способна повлиять на процесс тромбинообразования. Субтилизиноподобная протеиназа и глутамилэндопептидаза обладают фибринолитической активностью и активаторной способностью по отношению к плазминогену. Металлопротеиназа не проявляет фибринолитических свойств. В связи с широким распространением сердечно-сосудистых заболеваний актуальным является поиск новых ферментов с высокой биологической активностью, специфичностью и низкой токсичностью.

Ключевые слова: глутамилэндопептидаза, субтилизиноподобная протеиназа, металлопротеиназа, тромболитические и фибринолитические свойства, антикоагулянтная активность.

In medical practice is increasingly use proteolytic enzymes of microorganisms. Particular attention of researchers is attracted proteases, which have fibrinolytic properties, and can lyse clots. Previously had been isolated and purified to homogeneity glutamyl endopeptidase, subtilisin-like proteinase and metalloendopeptidase of Bacillus pumilis 3-19, secreted by B. subtilis JB 2036 recombinant strain. The analysis of thrombolytic, fibrinolytic, and anticoagulant properties of the recombinant enzymes was conducted. It is shown that all investigated proteinases are able to efficiently lyse the clot. In an in vitro subtilisin and glutamyl endopeptidase of B.subtilis recombinant strain have anticoagulant activity. Metalloproteinase is not able to influence the process clot formation. Subtilisin-like proteinase and glutamyl endopeptidase possess fibrinolytic activity and the ability of the activator relative to plasminogen. Metalloproteinase shows no fibrinolytic properties. Due to the high incidence of cardiovascular diseases is urgent search for new enzymes with high biological activity, specificity and low toxicity.

Key words: glutamyl endopeptidase, subtilisin-like proteinase, metalloproteinase, thrombolytic and fibrinolytic properties, anticoagulant activity.

Сериновые протеиназы бактерий — одна из наиболее изучаемых групп протеолитических ферментов. Они интенсивно используются в фармацевтической промышленности, тканевой инженерии, системной энзимотерапии [1—3]. Одной из перспективных областей применения протеиназ является создание на их основе тромболитических препаратов.

Другой чрезвычайно интересной и перспективной с практической точки зрения группой ферментов являются метцинкиновые эндопептидазы.

Ранее было показано, что бактерии *Bacillus pumilus* 3-19 секретируют в среду несколько протеиназ, среди которых доминируют сериновые: субтилизиноподобная протеиназа и глутамилэндопептидаза [4]. Позже выяснили, что наряду с сериновыми протеиназами бактерии *B. pumilus* выделяют в среду также металлоэндопептидазу. Гены данных ферментов были клонированы и секвенированы, последовательности зарегистрированы в Международной базе данных. Была изучена экспрессия этих генов в рекомбинантном штамме *B. subtilis* [5—7]. Соответствующие белки были выделены в гомогенном состоянии и подробно охарактеризованы [8—10].

e-mail: Danilova146@mail.ru

Разработка новых эффективных лекарственных препаратов на основе ферментов бактериального происхождения является перспективным направлением современной медицины, микробиологии и биотехнологии.

Представляет интерес изучение тромболитических, фибринолитических и антикоагулянтных свойств эндопептидаз *B. pumilus* 3-19, секретируемых рекомбинантным штаммом *B. subtilis.*

Материал и методы

Для определения тромболитических свойств протеиназ аликвоту крови крыс смешивали с раствором тромбина и выдерживали в течение 10 мин в водяном термостате при 37°С для образования сгустков. К сгусткам добавляли раствор препарата фермента и помещали в водяной термостат (в контрольные пробирки добавляли 0,145 М NaCl). Отмечали время полного лизиса свертков.

Способность белков предотвращать образование фибриновых свертков исследовали с помощью тромбоэластографа. Аликвоту плазмы крови человека смешивали с препаратом фермента и выдерживали в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем добавляли раствор $CaCl_2$ (для запуска коагуляционного каскада). В контрольные пробирки вместо белка добавляли 0,145 М NaCl. За процессом тромбообразования следили по кривой тромбоэластографа («Hellige», Австрия).

Активность протеиназ по отношению к фибриновым пластинкам определяли по методу Аструпа [11]. Раствор фибриногена смешивали с раствором тромбина и переливали на чашку Петри, выдерживали при комнатной температуре до образования плотной пленки. Половину чашек с образованными фибриновыми пластинами прогревали в течение 30 мин при 85°С. На прогретые и непрогретые фибриновые пластины наносили каплю 0,145 М раствора NaCl, а поверх неё каплю раствора фермента. Фибриновые пластины инкубировали при 37°С и регулярно измеряли образующиеся зоны лизиса. Площадь зоны лизиса определяли как произведение двух взаимно перпендикулярных диаметров и выражали в квадратных миллиметрах.

Определяли площадь лизиса на прогретой пластине (фибринолитическую активность ферментов), а также активаторную активность протеиназ по отношению к плазминогену — разность между площадями лизиса на непрогретой и прогретой пластинах.

Результаты

Показано, что все исследуемые протеиназы эффективно лизировали тромб. При этом наибольшей активностью обладала субтилизиноподобная протеиназа (табл. 1).

После предварительной инкубации плазмы с металлоэндопептидазой образовывался сверток аналогичный контрольному вне зависимости от концентрации фермента. При инкубации плазмы крови с субтилизиноподобной протеиназой и глутамилэндопептидазой сгусток не образовывался (рис.).

Таким образом, в условиях in vitro субтилизиноподобная протеиназа и глутамилэндопептидаза рекомбинантного штамма *B. subtilis* обладают антикоагулянтной активностью, в отличие от металлопротеиназы, которая не способна повлиять на процесс тромбинообразования.

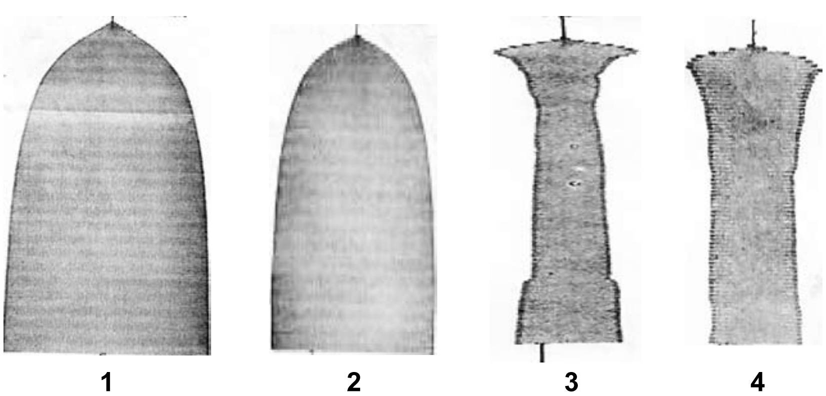
Была исследована способность протеиназ рекомбинантного штамма *B. subtilis* лизировать прогретые и непрогретые фибриновые пластинки. По разности площадей зон лизиса на непрогретой и прогретой пластинках определяли активаторную активность протеолитических ферментов рекомбинантного штамма *B. subtilis*. Было показано, что после внесения раствора, содержащего белок, небольшие зоны лизиса появились на прогретых чашках через 1,5 ч инкубации при 37°С. Через 20 ч площади зон лизиса фибрина значительно увеличились (табл. 2).

Следовательно, исследуемые белки обладают фибринолитической активностью.

Таким образом, субтилизиноподобная протеиназа и глутамилэндопептидаза обладают как фибринолитической, так и активаторной способностью по отношению к плазминогену. Металлопротеиназа не проявляет фибринолитических свойств.

Таблица 1. **Тромболитическая активность протеиназ рекомбинантного штамма *B. subtilis***

Протеиназы	Концентрация, мг/мл	Время лизиса тромба, мин
Глутамилэндопептидаза	0,2 0,4	270 225
Субтилизиноподобная протеиназа	0,2 0,4	185 125
Металлоэндопептидаза	0,2 0,4	300 240



Тромбоэластограммы крови крыс после инкубации ее с ферментами:
1 — контроль;
2 — металлопротеиназа;
3 — глутамилэндопептидаза;
4 — субтилизиноподобная протеиназа

Таблица 2. **Фибринолитическая активность протеиназ рекомбинантного штамма *B. subtilis***

Протеиназы	Площадь зоны лизиса на прогретой фибриновой пластинке, мм²	Площадь зоны лизиса на непрогретой фибриновой пластинке, мм²	Разница площадей зон лизиса на непрогретой и прогретой пластинках, мм²
Глутамилэндопептидаза	12	62	50
Субтилизиноподобная протеиназа	40	80	40
Металлоэндопептидаза	22	22	0

Обсуждение

Одним из важнейших аспектов практического применения протеиназ является их использование в медицине, в частности, в тромболитической терапии.

Оказалось, что исследуемые протеиназы рекомбинантного штамма *B. subtilis* обладают дозозависимой тромболитической активностью. При этом наибольшей активностью обладала субтилизиноподобная протеиназа в концентрации 0,4 мг/мл: лизис тромба происходил в течение 125 мин. Наименьшей активностью обладали глутамилэндопептидаза и металлопротеиназа. Известно, что протеиназы *B. amyloliquefaciens* и *B. pumilus* в высоких концентрациях (1 мг/мл) эффективно лизируют тромб, при этом наибольшей активностью обладают субтилизиноподобные протеиназы *B. pumilus*, а наименьшей — глутамилэндопептидазы *B. amyloliquefaciens* [12].

Все исследованные протеиназы обладали выраженными антикоагулянтными свойствами, сопоставимыми с таковыми для протеиназы *B. intermedius* [13].

С целью выяснения влияния ферментов *B. pumilus*, секретируемых рекомбинантным штаммом *B. subtilis* на процесс тромбинообразования, мы проинкубировали их с плазмой крови человека. Выяснилось, что после предварительной инкубации плазмы с металлоэндопептидазой образовывался сгусток аналогичный контрольному вне зависимости от концентрации фермента, а при инкубации плазмы крови с субтилизиноподобной протеиназой и глутамилэндопептидазой сверток не образовывался. Очевидно, это связано с тем, что фермент, добавленный к крови, разрушает компоненты гемостаза, в результате чего образуется менее плотный сверток.

Ранее было показано, что субтилизиноподобные протеиназы *B. amyloliquefaciens* обладают высокой фибринолитической активностью [14]. Интересно, что узкоспецифичные глутамилэндопептидазы *B. amyloliquefaciens* также обладают фибринолитическими свойствами. Они способны не только расщеплять фибриноген, но и оказывают активирующее воздействие на плазминоген, превращая его в плазмин.

Оказалось, что субтилизиноподобная протеиназа и глутамилэндопептидаза обладают как фибринолитической активностью, так и активаторной способностью по отношению к плазминогену. Металлопротеиназа же не проявляет фибринолитических свойств.

Таким образом, субтилизиноподобная протеиназа и глутамилэндопептидаза *B. pumilus* могут рассматриваться как потенциально перспективные ферменты для применения в качестве тромболитических препаратов.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. № П1053 от 31.05.2010. Работа частично выполнена на оборудовании Федерального центра коллективного пользования физико-химических исследований веществ и материалов (ФЦКП ФХИ) и Научно-образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Kudrya V.A., Simonenko I.A. Alkaline serine proteinase and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1994; 41: 505–9.
2. Gupta R., Beg Q.K., Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Applied Microbiology and Biotechnology 2002; 59: 15–32.
3. Даниличев В.Ф., Кнорринг Г.Ю. Системная энзимотерапия при патологии глаз. Кремлевская медицина. Клинический вестник 2002; 3: 68–70.
4. Шарипова М.Р., Шакиров Е.В., Балабан Н.П. и др. Локализация протеолитических ферментов в клетках *Bacillus intermedius*. Микробиология 2000; 69(5): 660–7.
5. Sharipova M.R., Shagimardanova E.I., Chastukhina I.B. et al. The expression of *Bacillus intermedius* glutamyl endopeptidase gene in *Bacillus subtilis* recombinant strains. Mol. Biol. Rep. 2007; 34: 79–87.
6. Balaban N.P., Kayumov A.R., Kirillova Yu. et al. The expression of the serine proteinase gene of *Bacillus intermedius* in *Bacillus subtilis*. Microbiological Research 2008; 163: 39–50.
7. Сабирова А.Р. Структура гена новой металлопротеиназы *Bacillus intermedius* и регуляция его экспрессии [диссертация]. Казань: Казанский (Приволжский) федеральный ун-т; 2011.
8. Михайлова Е.О. Субтилизинподобная протеиназа *Bacillus intermedius*, секретируемая рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* на разных фазах роста [диссертация]. Казань: Казанский (Приволжский) федеральный ун-т; 2007.
9. Шамсутдинов Т.Р. Глутамилэндопептидаза *Bacillus intermedius*, секретируемая рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* на разных фазах роста [диссертация]. Казань: Казанский (Приволжский) федеральный ун-т; 2009.
10. Рудакова Н.Л. Новая секретируемая металлоэндопептидаза *Bacillus intermedius* [диссертация Казань: Казанский (Приволжский) федеральный ун-т; 2010.
11. Astrup T., Mullertz S.T. The fibrin plate method for estimating fiblinolytic aktiviti. Arch. Biochem.Biophys. 1952; 40: 346–51.
12. Маликова Л.А., Марданова А.М., Соколова О.В. и др. Особенности биосинтеза внеклеточных субтилизиноподобных протеиназ, секретируемых *Bacillus pumilis* КММ 62. Ученые записки КГУ 2006; 148(2): 90–101.
13. Лютова Л.В., Андреенко Г.В., Карабасова М.А. и др. Исследование тромболитических и фибринолитических свойств тиолзависимой сериновой протеиназы (ТСП) из *Thermoactinomyces vulgaris in vivo*. Прикл. биохим. и микробиол. 1990; 26(5): 623–8.
14. Ицкович Е.Л., Знаменская Л.В., Балабан Н.П. и др. Биосинтез щелочной внеклеточной протеиназы *Bacillus intermedius*. Микробиология 1995; 64(5): 623–9.

Поступила: 13.08.2012