

° СЕКРЕЦИЯ МИКРОМИЦЕТАМИ ПРОТЕИНАЗ С АКТИВНОСТЯМИ БЕЛКОВ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

Выполнила:

Бобровская А.А.

Научные руководители:

д.б.н., профессор Кураков А.В.

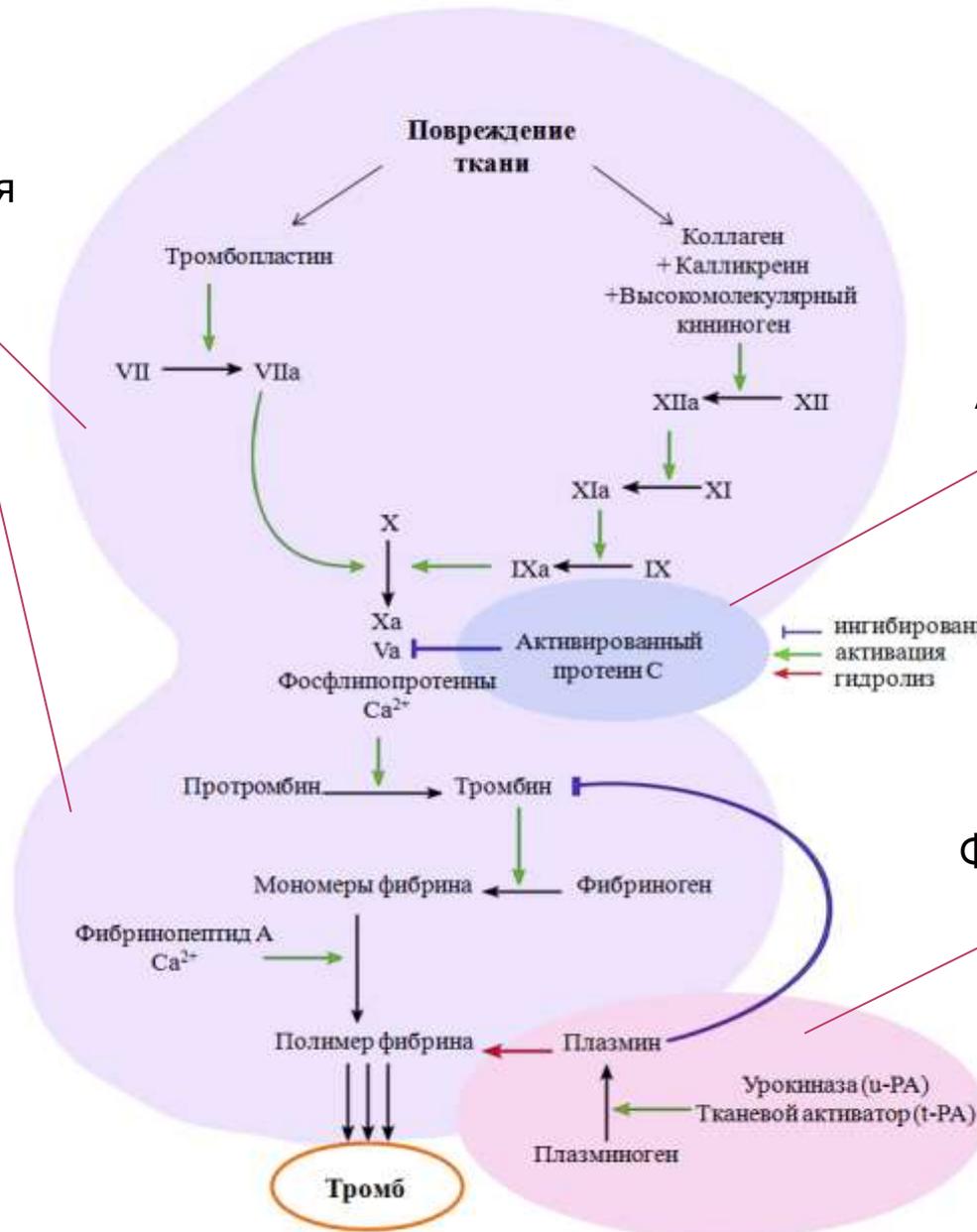
к.б.н., старший преподаватель Осмоловский А.А.

Система гемостаза человека

Коагулянтная система

Антикоагулянтная система

Фибринолитическая система

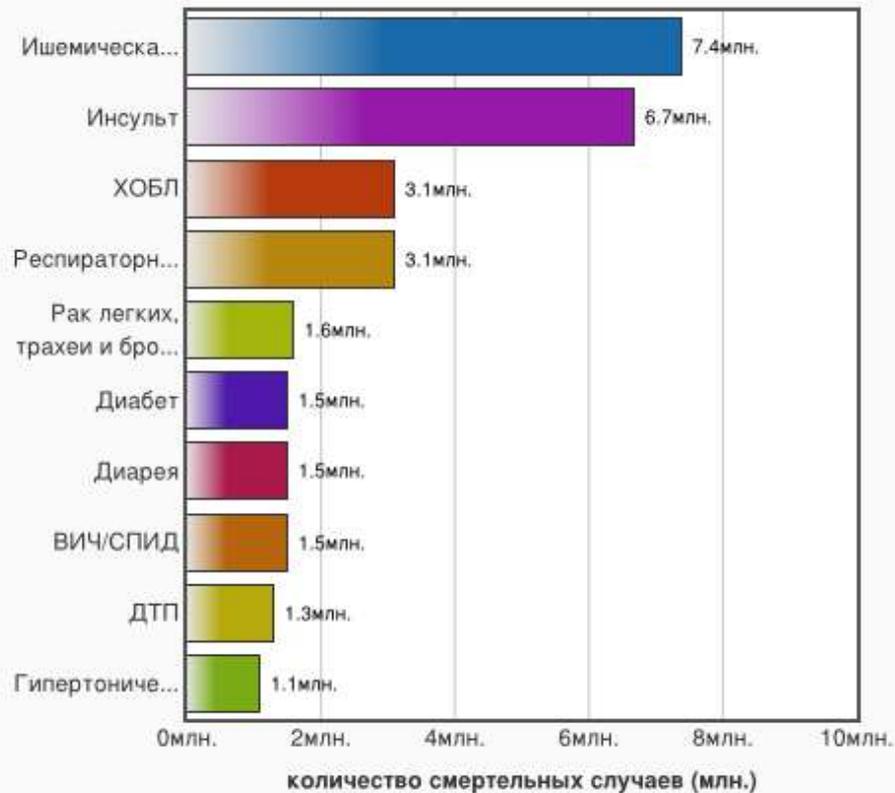


Тромб

10 ведущих причин смерти в мире
(в %, 2012 г.)



10 ведущих причин смерти в мире
(в миллионах, 2012 г.)





Цель

- ✓ Поиск среди микромицетов штаммов, продуцирующих протеазы с активностями ферментов системы гемостаза человека.

Задачи

- ✓ Скрининг штаммов, образующих внеклеточные протеазы с активностями ферментов системы гемостаза;
- ✓ Изучение динамики роста и подбор оптимальной температуры для отобранного штамма;
- ✓ Изучение динамики накопления протеолитических ферментов отобранным штаммом.

Объекты

Микромицеты отдела Ascomycota:

Aspergillus sclerotiorum х1

Aspergillus nidulans х2

Beauveria bassiana хк1

Purpureocillium lilacinum хк2

Paecilomyces carneus хк3

Tolyposcladium sp. хк4

Tolyposcladium cylindrosporum аз0-8-СА-4

Tolyposcladium cylindrosporum аз1-8-СА-4

Tolyposcladium inflatum k1

Для многих микромицетов этого рода показана секреция протеаз с активностями ферментов системы гемостаза.

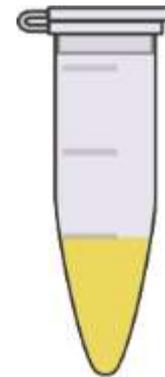
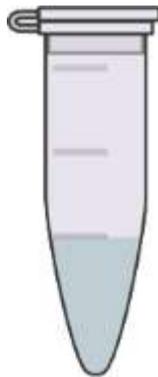
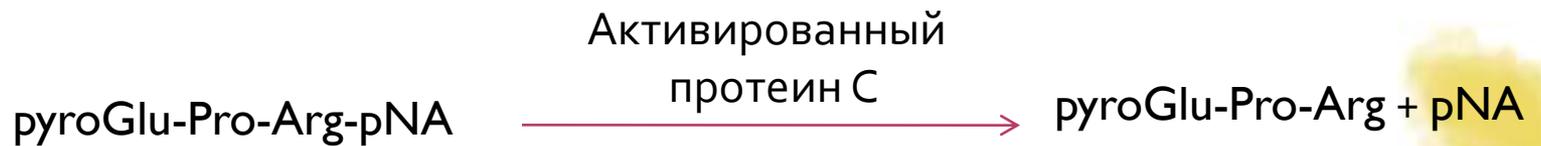
Нематофаги и энтомопатогены. Потенциально перспективные продуценты фибринолитических ферментов в соответствии с последними исследованиями.



Методы

- Глубинное культивирование
- Определение активностей с хромогенными пептидами субстратами
- Определение общей протеолитической активности с казеином
- Определение коллагенолитической активности
- Определение фибринолитической и активаторной к плазминогену активностей (метод фибриновых пластин)
- Определение концентрации белка (по методу Бретфорд)
- Регистрация динамики роста (ежедневное измерение диаметра колоний на чашках Петри с агаризованной питательной средой)

Принцип реакции с хромогенными пептидными субстратами (ХПС)



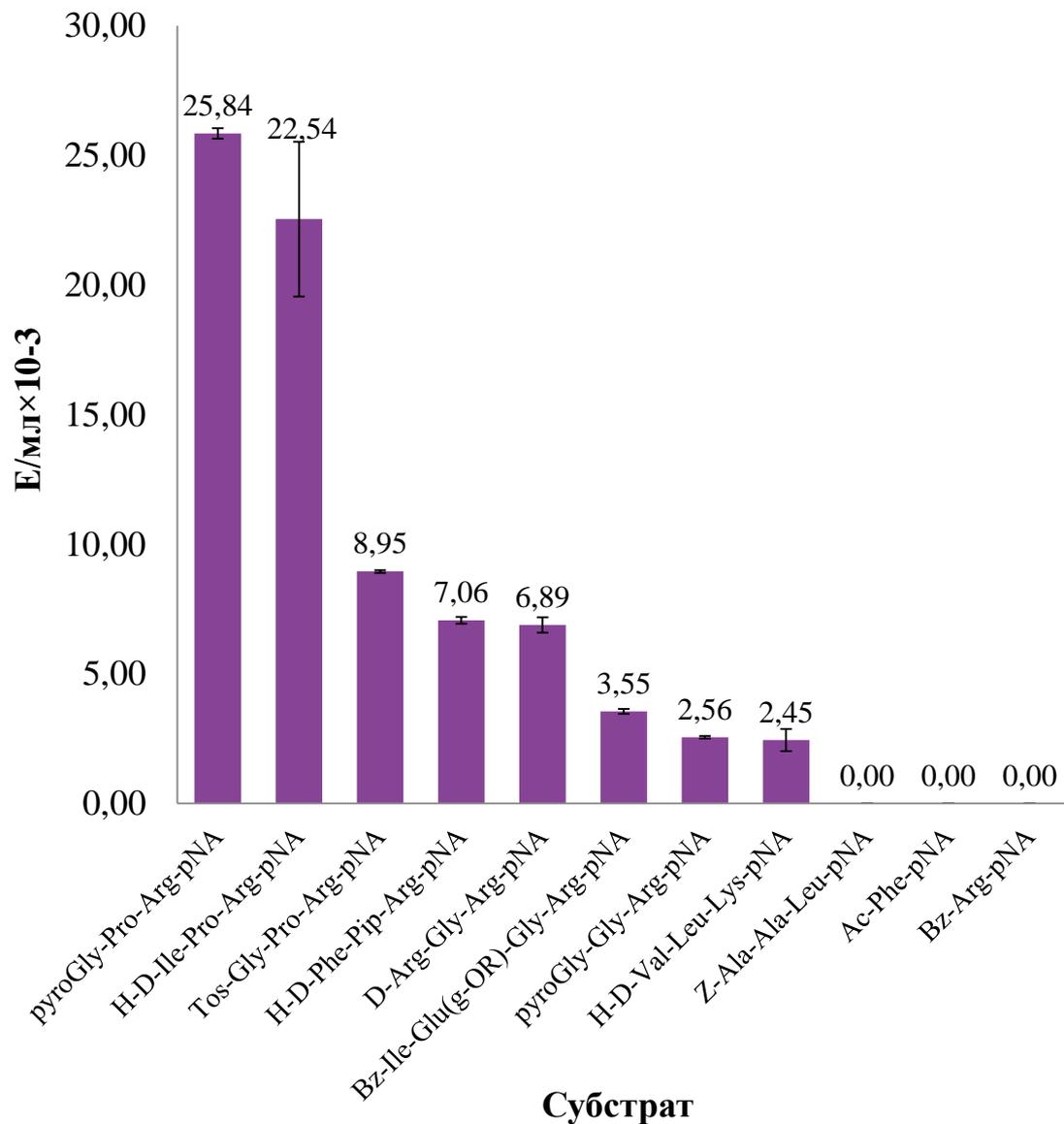
Активности некоторых штаммов микромицетов с ХПС

3-4 сутки культивирования, Е/мл×10⁻³

Культура \ Субстрат	Субстрат тромбина	Субстрат урокиназы	Субстрат тканевого активатора плазмино-гена	Субстрат Ха фактора	Субстрат АРС	Субстрат плазмина
<i>Aspergillus sclerotiorum</i> x1	0,64	2,45	2,45	0,07	2,27	2,17
<i>Aspergillus nidulans</i> x2	3,44	1,95	1,95	3,37	3,94	2,95
<i>Beauveria bassiana</i> xк1	2,63	3,76	3,76	2,24	0,71	2,88
<i>Tolypocladium inflatum</i> k1	2,45	3,20	3,20	1,92	0,82	1,17
<i>Purpureocillium lilacinum</i> xк2	8,95	2,56	22,54	7,06	25,84	6,89
<i>Paecilomyces carneus</i> xк3	2,02	1,28	1,28	1,49	2,66	1,03
<i>Tolypocladium cylindrosporum</i> a30-8-CA-4	0,00	0,00	0,00	0,60	0,00	1,42
<i>Tolypocladium cylindrosporum</i> a31-8-CA-4	2,17	1,85	1,85	2,24	2,59	0,92
<i>Tolypocladium</i> sp. xк4	3,48	1,46	1,46	0,78	2,34	1,70

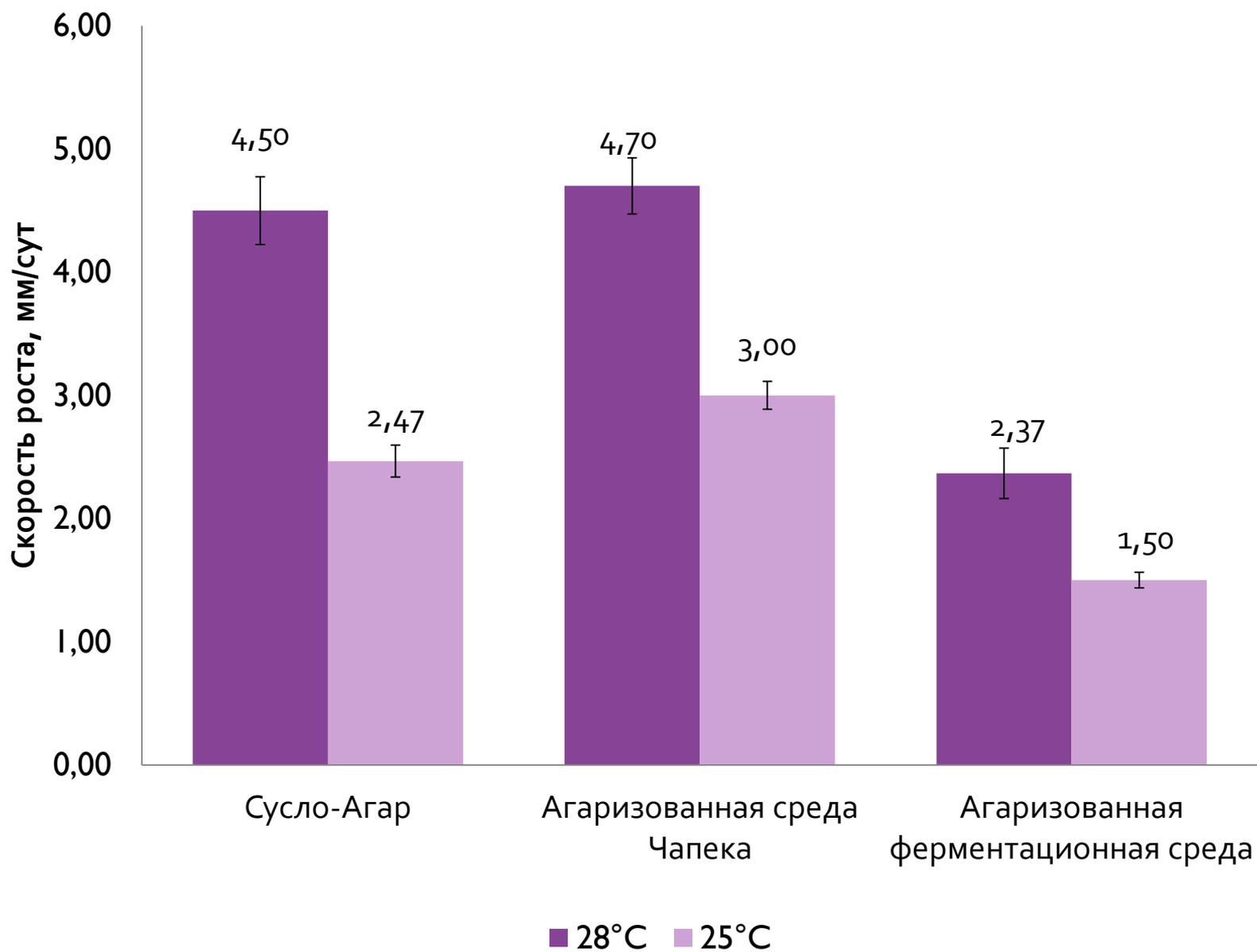
Спектр активностей *P. lilacinus* хк2 с ХПС

3 сутки



- pyroGly-Pro-Arg-pNA - Субстрат активированного протеина С,
- H-D-Ile-Pro-Arg-pNA - субстрат тканевого активатора плазминогена,
- pyroGly-Gly-Arg-pNA - субстрат урокиназы,
- Tos-Gly-Pro-Arg-pNA - субстрат тромбина,
- H-D-Phe-Pip-Arg-pNA - субстрат тромбина,
- D-Arg-Gly-Arg-pNA - субстрат фактора Ха,
- Bz-Ile-Glu(g-OR)-Gly-Arg-pNA - субстрат Ха,
- H-D-Val-Leu-Lys-pNA - субстрат плазмينا,
- Z-Ala-Ala-Leu-pNA - субстрат субтилизина,
- Ac-Phe-pNA - субстрат химотрипсина,
- Bz-Arg-pNA - субстрат трипсина

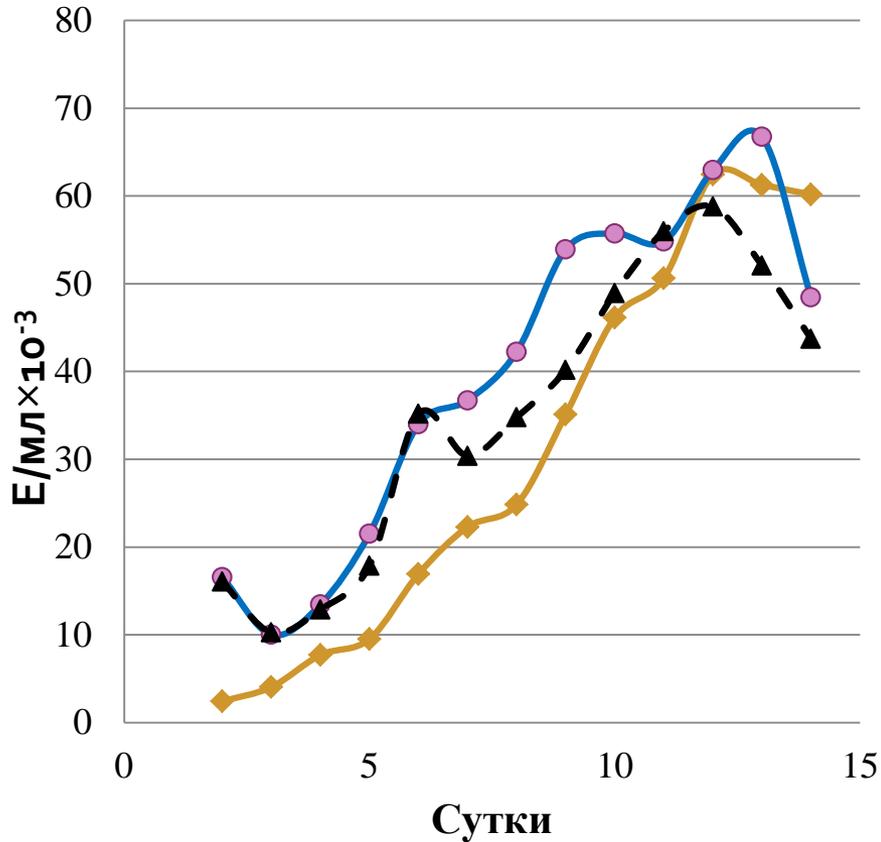
Скорости роста *P. lilacinum* хк2



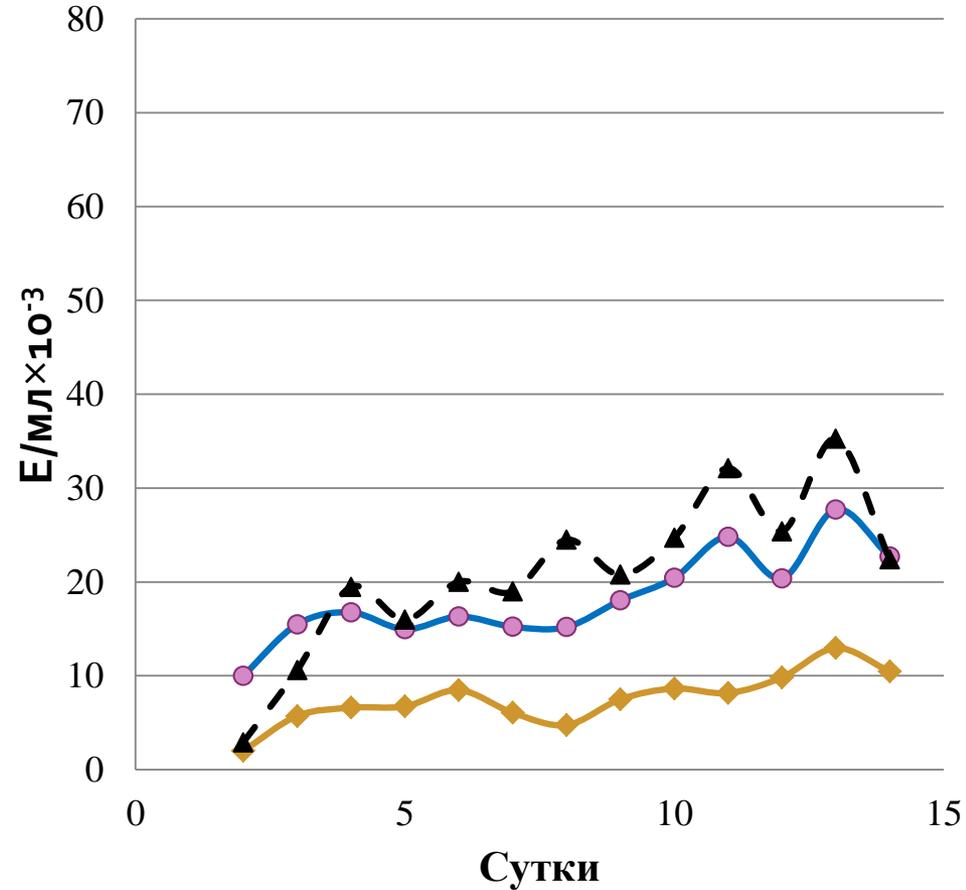
Динамика активностей ферментного комплекса *P.lilacinus* хк2 с ХПС

3-14 сутки

25°С



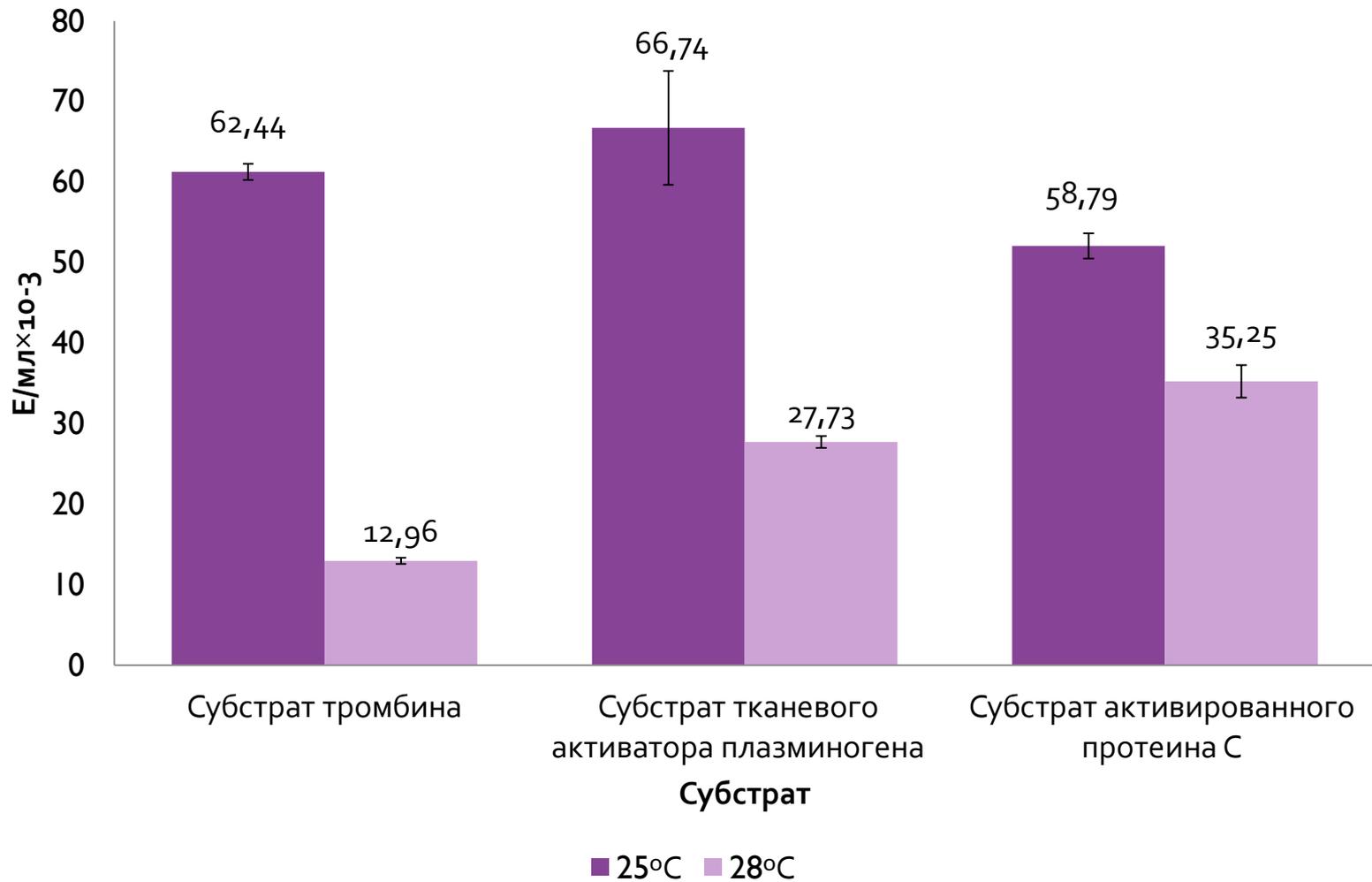
28°С



- ◆ Субстрат тромбина
- Субстрат тканевого активатора плазминогена
- ▲ Субстрат активированного протеина С

Активности протеаз *P. lilacinum* с ХПС

13 сутки



ВЫВОДЫ

- Проведен скрининг среди 9 штаммов микроскопических грибов отдела Ascomycota (*Aspergillus sclerotiorum* х1, *Aspergillus nidulans* х2, *Beauveria bassiana* хк1, *Purpureocillium lilacinum* хк 2, *Paecilomyces carneus* хк3, *Tolyposcladium sp.* хк4, *Tolyposcladium cylindrosporum* аз0-8-СА-4, *Tolyposcladium cylindrosporum* аз1-8-СА-4, *Tolyposcladium inflatum* к1) на способность образования ими протеаз с активностями белков системы гемостаза.
- Установлено, что штамм имеет максимальную линейную скорость роста при 28°C.
- Штамм *P. lilacinum* хк 2 отобран как наиболее перспективный продуцент протеаз с активностями белков системы гемостаза тромбина, тканевого активатора плазминогена и активированного протеина С.
- Изучение динамики накопления внеклеточных протеаз штаммом *P. lilacinum* хк 2 с активностями тромбина, тканевого активатора плазминогена и активированного протеина С показало, что максимальных значений они достигают на 13 сутки, при 25° С.

ПРИМЕЧАНИЕ

- Результаты работы были представлены на XXII международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2015» (Стендовый доклад, подсекция «Микробиология»).
- Экспериментальные данные были опубликованы в сборнике тезисов XXII международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2015», секция «Биология» и журнале «Успехи медицинской микологии».
- Библиографические данные:
 1. Бобровская А.А. *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson, - продуцент протеаз с активностями ферментов системы гемостаза человека. // XXII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2015". Секция "Биология". 13-17 апреля 2015 г. Тезисы докладов. — МАКС Пресс Москва, 2015. — С. 210-211.
 2. Бобровская А.А., Осмоловский А.А., Звонарева Е.С., Крейер В.Г., Куаков А.В.. Протеиназы микромицетов с активностями ферментов системы гемостаза человека. *Успехи медицинской микологии*. 2015. Т. 14, с. 414–416

Спасибо за внимание!

