

УДК 577.157.2

МИКРОБИОЛОГИЯ

Н. С. ЕГОРОВ, В. И. УШАКОВА

ОБРАЗОВАНИЕ НЕПАТОГЕННЫМИ ПЛЕСНЕВЫМИ ГРИБАМИ РОДА *ASPERGILLUS* КОАГУЛАЗ, СВЕРТЫВАЮЩИХ ПЛАЗМУ И КРОВЬ ЧЕЛОВЕКА

(Представлено академиком С. Е. Севериным 5 I 1973)

В настоящее время хорошо известно, что протеазы многих микроорганизмов, подобно протеолитическому ферменту крови фибринолизину, обладают способностью лизировать фибрин, проявляя в ряде случаев высокую тромболитическую активность *in vitro* и *in vivo* (¹⁻³).

Большой научный и практический интерес представляют также работы по направленному поиску ферментов микробного происхождения противоположного фибринолизину действия, т. е. ферментов, обладающих свойством коагулировать плазму и кровь человека путем воздействия на факторы свертывания крови аналогично тромбину или тромбопластину.

Как установлено, конверсия протромбина, при которой образуется тромбин, и превращение фибриногена в фибрин с участием тромбина, имеющие место в процессе нормального свертывания крови, представляют собой явления ограниченного протеолиза (^{4, 5}).

Актуальность исследований по изучению способности микроорганизмов различных систематических групп образовывать коагулазы, свертывающие кровь человека и животных, не вызывает сомнений.

В литературе достаточно широко обсуждаются сведения по коагулазам стафилококков, дифтерийных и коклюшных палочек, синегнойных и чумных бактерий (⁸⁻¹⁰). При этом, учитывая способность патогенных микроорганизмов к образованию веществ, свертывающих плазму и кровь, делаются попытки найти корреляцию между этиологией и патогенезом, с одной стороны, и способностью к выработке коагулаз, с другой.

Целью настоящей работы явилось определение коагулазной активности в отношении плазмы и крови человека у различных видов непатогенных грибов рода *Aspergillus*.

Обнаружение свертывающих агентов среди продуктов жизнедеятельности непатогенных микроорганизмов открывает новые возможности использования физиологически активных веществ микробного происхождения в качестве гемостатических веществ.

В качестве объектов исследования были взяты 22 культуры плесневых грибов, относящихся к 21 виду рода *Aspergillus*. Изучаемые грибы культивировали поверхностным методом на сусле 6° Бал. и на синтетической среде Стефанини (%): глюкоза 0,36; сахара 0,72; $MgSO_4$ 0,123; KH_2PO_4 1,362; KNO_3 0,2; pH 6,8-7,0. Среды разливали по 20 мл в конические колбы на 50 мл. Время инкубации 7 суток при 28°.

Коагулазную активность культуральной жидкости определяли по времени свертывания цитратной плазмы человека, взятой без разведения и при разведении 1:2 и 1:5. В пробирки с 0,5 мл плазмы добавляли 0,1 мл культуральной жидкости (pH 7,0), после чего их помещали в термостат на 37°. Образцы периодически в течение первых 6 час., а затем через 24 часа просматривали с целью обнаружения образования тромбов. Те образцы, которые к концу 24 часа показывали отрицательную реакцию, исследовались на содержание способного к свертыванию фибриногена путем добавления тромбина. Это необходимо делать для того, чтобы избежать оши-

Коагулазная активность (максимальные значения) некоторых плесневых грибов рода *Aspergillus* при развитии на двух средах: сусле (1) и среде Стефанини (2)

Культура гриба	Среда	рН	Вес пленки гриба, мг	Протеолитическая активность, ед/мл		Время свертывания плазмы, часы		
				фибринолитическая	казеинолитическая	развед. 1:5	развед. 1:2	без разведения
<i>Asp. alliaceus</i>	1	5,5	334	560	9,3	4	6—24	6—24
<i>Asp. oryzae</i> МГУ	2	6,1	99	783	1,4	Нет св.*	6	6—24
<i>Asp. sclerotiorum</i>	1	6,7	271	333	15,5	2	4	6—24
<i>Asp. species</i> № 1	1	5,0	170	Следы	0	2	2	4
<i>Asp. species</i> № 2	1	4,9	284	3020	18,6	Нет св.*	4	4
<i>Asp. tamarii</i>	1	6,4	317	348	3,1	6—24	6—24	6—24
<i>Asp. terricola</i>	2	6,1	38	606	0	Нет св.*	6—24	6—24
<i>Asp. amsterodami</i>	1	4,7	83	0	1,5	4	Нет св.	Нет св.
<i>Asp. flavipes</i>	2	6,0	80	0	0,9	2	» »	» »
<i>Asp. lutescens</i>	2	5,6	75	0	1,9	4	» »	» »
<i>Asp. regulosus</i>	1	6,4	299	752	6,2	6—24	» »	» »
<i>Asp. terreus</i>	1	4,3	229	420	13,9	2	» »	» »
<i>Asp. sulfureus</i>	1	5,2	199	333	7,7		4—24	» »

* При добавлении тромбина также не происходит образования тромба.

бочных, отрицательных результатов, обусловленных активностью протеолитических (фибринолитических) ферментов. Реакция сопровождалась контролем на способность к спонтанному свертыванию плазмы.

Определение коагулазной активности в неочищенных препаратах, полученных из культуральной жидкости некоторых грибов путем высаливания сернокислым аммонием с последующим диализом и лиофилизацией, проводили по описанной выше методике, добавляя к субстрату 0,1 мл раствора препарата коагулазы различной концентрации.

Таблица 2

Время свертывания плазмы и крови человека препаратами коагулаз, выделенными из культуральной жидкости *Asp. sclerotiorum* и *Asp. species* № 1

Количество препарата, вызывающее образование тромба, μ г	Плазма	Кровь
500	40 м.	28 м.
	10 м.	10 м.
250	1 ч. 25 м.	40 м.
	40 м.	20 м.
125	2 ч. 35 м.	1 ч. 25 м.
	1 ч. 15 м.	40 м.
63	3 ч. 30 м.	1 ч. 25 м.
	1 ч. 55 м.	1 ч. 15 м.
31	—	2 ч. 30 м.
	4 ч. 50 м.	3 ч. 25 м.

Примечание. Цифры над чертой — данные для *Asp. sclerotiorum*, цифры под чертой — для *Asp. species* № 1.

Результаты определений коагулазной активности культуральной жидкости изучаемых грибов показали (табл. 1), что из всех обследованных нами аспергиллов 13 культур плесеней (около 59%) обладают способностью свертывать человеческую плазму, взятую при разведении 1:5 или 1:2. При этом только 7 культур грибов или 32% имеют свойство коагу-

лизовать плазму без разведения, т. е., очевидно, коагулазы различных аспергиллов неодинаково чувствительны к ингибиторам плазмы.

Из полученных результатов следует также, что способность к образованию коагулаз у изучаемых видов грибов различна. При этом у одних аспергиллов для этой цели наиболее благоприятна среда с суслом, для других — синтетическая среда. У некоторых грибов, активных по коагулазе, например у *Asp. species* № 1, не обнаружено корреляции между величиной протеолитической (фибринолитической и казеинолитической) активности и способностью к свертыванию плазмы, хотя у других изученных грибов такая связь, очевидно, существует.

Высокое образование фибринолитических ферментов, обнаруженное нами у большинства из обследованных грибов, затрудняет в ряде случаев выявление коагулазной активности вследствие лизиса способного к свертыванию фибриногена плазмы.

Далее из культуральной жидкости *Asp. sclerotiorum* и *Asp. species* № 1 были получены препараты свертывающих агентов, которые были проверены на способность коагулировать неразведенную плазму и свежую цитратную кровь человека (табл. 2). Как видно из представленных данных, препараты коагулаз *Asp. sclerotiorum* и *Asp. species* № 1 вызывают свертывание плазмы и крови человека, при этом кровь свертывается почти со всеми взятыми навесками препаратов в два раза быстрее, чем плазма. Коагулазная активность неочищенного препарата, выделенного из культуральной жидкости *Asp. species* № 1, значительно выше активности препарата *Asp. sclerotiorum*. Видно также, что время появления тромба зависит в указанных пределах от концентрации препарата коагулазы.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
29 XII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Н. М. Марин, М. Stefanini et al., J. Zab. and Clin. Med., 58, 1, 41 (1961).
² М. Karaca, М. Stefanini, R. Mele, J. Zab. and Clin. Med., 59, 5, 799 (1962).
³ Н. С. Егоров, В. И. Ушакова, Прикл. биохим. и микробиол., 2, 595 (1966).
⁴ Н. А. Андреева, В. И. Ушакова, Н. С. Егоров, Микробиология, 41, 417 (1972).
⁵ А. А. Имшенецкий, С. З. Бродская, Микробиология, 38, 1043 (1969).
⁶ Б. А. Кудряшов, Проблемы свертывания крови и тромбообразования, М., 1960.
⁷ Г. В. Андреев, Фибринолиз. Химия и физиология процесса, М., 1967.
⁸ E. D. Beesley, R. R. Brubaker et al., J. Bacteriol., 94, 19 (1967).
⁹ G. Torgowski, Folia Med. Cracow, 10, 161 (1968).
¹⁰ И. В. Домарадский, Г. А. Яромюк и др., Бюлл. экп. биол. и мед., № 7, 79 (1963).