

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

на правах рукописи



Корниенко Елена Игоревна

Получение и свойства комплексов протеолитических ферментов
тромболитического действия микромицетов *Arthrobotrys longa* и
Sarocladium strictum

Специальности: 1.5.11. Микробиология

1.5.6. Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор Котова И.Б.

кандидат биологических наук Осмоловский А.А.

Москва 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	8
ВВЕДЕНИЕ.....	9
РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	19
1.1. Система гемостаза.....	19
1.1.1. Основные функции системы гемостаза	19
1.1.2. Система свертывания крови.....	19
1.1.2.1. Современная схема системы свертывания крови	23
1.1.3. Противосвертывающая система крови	25
1.1.3.1. Антикоагулянтное звено противосвертывающей системы	26
1.1.3.2. Фибринолитическое звено противосвертывающей системы. Ферментативный и неферментативный фибринолиз	26
1.2. Протеолитические ферменты. Протеолиз	30
1.2.1. Каскадные ферментные процессы системы гемостаза	30
1.2.2. Класс пептид-гидролаз	32
1.2.2.1. Сериновые протеазы.....	32
1.2.3. Протеолиз.....	34
1.2.3.1. Ограниченный и неограниченный протеолиз	35
1.3. Грибы – продуценты внеклеточных гидролаз со свойствами протеолитических ферментов системы гемостаза.....	37
1.3.1. Внеклеточные протеолитические ферменты грибов.....	37
1.3.2. Внеклеточные протеолитические ферменты грибов, со свойствами ферментов системы гемостаза	38
1.3.3. Триаза	42
1.3.4. <i>Arthrobotrys longa</i> – продуцент препарата Лонголитин.....	45
1.3.4.1. Открытие препарата Лонголитин.....	47
1.3.4.2. Фибринолитическая и антикоагулянтная активности Лонголитина в опытах <i>in vitro</i>	49
1.3.4.3. Тромболитические и антикоагулянтные свойства Лонголитина совместно с гепарином в опытах <i>in vivo</i> при различных способах введения препарата.....	49

1.3.4.4. Лонголитин — первый тромболитический препарат для наружного применения	51
1.3.4.5. Возможность использования Лонголитина как профилактического тромболитического средства	54
РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	56
2.1. Объекты исследований и их культивирование	56
2.2. Молекулярно-генетическая идентификация микромицета	57
2.3. Определение гидролитического потенциала микромицетов	58
2.4. Изучение биоритмов микромицетов в глубоинной культуре	58
2.4.1. Определение биомассы	58
2.4.2. Расчет удельных скоростей роста и синтеза ферментов.....	59
2.5. Световая и электронная микроскопия	59
2.6. Получение ферментного комплекса из культуральной жидкости микромицетов	60
2.7. Определение фибринолитической и активаторной к плазминогену активности методом фибриновых пластин	60
2.8. Определение общей протеолитической активности	61
2.9. Электрофоретические методы	62
2.9.1. Изоэлектрофокусирование.....	62
2.9.2. Денатурирующий электрофорез белков в полиакриламидном геле ..	63
2.9.3. Нативный электрофорез белков в полиакриламидном геле.....	63
2.10. Определение белка.....	64
2.10.1. Определение количества белка методом Бредфорд.....	64
2.10.2. Спектрофотометрическое определение количества белка	64
2.10.3. Определение количества белка с помощью бицинхониновой кислоты.....	64
2.11. Определение активности протеаз с хромогенными пептидными субстратами.....	65
2.12. Определение фибринолитической и фибриногенолитической активности.....	66
2.13. Тромболизис	66
2.14. Ингибиторный анализ.....	67

2.15. Измерение рН-стабильности и рН-оптимума ферментов.....	68
2.16. Измерение термостабильности и температурного оптимума работы ферментов	68
2.17. Определение гликопротеинового компонента с ШИК– реактивом методом дот-блоттинга.....	69
2.18. Хранение препаратов протеаз микромицетов.....	69
2.19. Определение фармацевтических характеристик комплексного препарата.....	70
2.19.1. Определение микробиологической чистоты препарата	70
2.19.2. Идентификация препарата	70
2.20. Обработка результатов и статистика	71
2.21. Опыты <i>in vivo</i>	71
2.21.1. Определение острой токсичности препарата.....	71
2.21.2. Определение аллергенности препарата	73
2.21.2.1. Активная кожная анафилаксия у мышей.....	74
2.21.2.2. Активный системный тест на анафилаксию у крыс.....	74
2.21.2.3. Воспалительная реакция у мышей, вызванная конканавалином А	75
2.21.2.4. Конъюнктивальный тест на кроликах	76
2.21.3. Определение иммунотоксичности препарата	76
2.21.3.1. Оценка клеточного иммунитета в тесте на гиперчувствительность замедленного типа.....	77
2.21.3.2. Оценка гуморального иммунитета в Т-клеточно-зависимом тесте	77
2.21.3.3. Фагоцитарная активность перитонеальных макрофагов.....	78
2.21.3.4. Анализ данных и статистика.....	78
2.21.4. Изучение активности фармацевтической субстанции в различных носителях	79
2.21.4.1. Изучение действия фармацевтической субстанции при поверхностном нанесении.....	80
2.21.4.1.1. Модель внутридермальной гематомы	80

2.21.4.2. Оценка эффективности фармацевтической субстанции в гелевой основе	81
2.21.4.3. Оценка эффективности фармацевтической субстанции в кремовой основе	81
2.21.4.4. Анализ данных и статистика.....	82
РАЗДЕЛ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	83
3.1. Морфо-физиологические особенности микромицета <i>Arthrotrys longa</i> в глубинной культуре	83
3.2. Свойства комплексного препарата Лонголитин, образуемого микромицетом <i>A. longa</i>	89
3.2.1. Разделение и фракционирование комплексного препарата протеаз, образуемого микромицетом <i>A. longa</i>	90
3.2.2. Тромболизис протеазами, образуемыми <i>A. longa</i>	94
3.2.3. Хранение препарата протеаз, образуемого микромицетом <i>A. longa</i> ..	95
3.3. Обнаружение и молекулярно-генетическая идентификация ассоцианта – микофила.....	97
3.4. Изучение активности экзопротеаз микромицета <i>Sarocladium strictum</i> 203	100
3.4.1. Гидролитический потенциал микромицета <i>Sarocladium strictum</i>	100
3.4.2. Протеолитическая активность микромицета <i>Sarocladium strictum</i> при росте на средах различного состава	102
3.4.3. Подбор оптимальных условий pH среды для образования внеклеточных протеаз микромицетом <i>S. strictum</i>	104
3.4.4. Динамика роста и накопления протеолитических ферментов микромицета <i>S. strictum</i>	107
3.4.5. Сравнение протеолитической активности микромицетов <i>A. longa</i> и <i>S. strictum</i>	111
3.4.6. Сравнение активности протеаз, образуемых микромицетами <i>A. longa</i> и <i>S. strictum</i> , по отношению к хромогенным пептидным субстратам	112
3.5. Биохимические свойства протеолитического комплекса, образованного микромицетом <i>S. strictum</i>	114
3.5.1. Сравнение очищенных препаратов протеаз, образуемых микромицетами <i>A. longa</i> и <i>S. strictum</i>	114

3.5.2. Изоэлектрофокусирование препарата протеаз микромицета <i>S. strictum</i>	115
3.5.3. Сравнение препарата протеаз <i>S. strictum</i> с коммерческими аналогами	118
3.5.4. Способность протеаз микромицета <i>S. strictum</i> к лизису тромба <i>in vitro</i>	122
3.5.5. Влияние ингибиторов протеолитических ферментов на протеазы, образуемые микромицетом <i>S. strictum</i>	124
3.5.6. pH-стабильность и pH-оптимум работы протеаз, образуемые микромицетом <i>S. strictum</i>	127
3.5.7. Термостабильность и температурный оптимум работы протеаз, образуемых микромицетом <i>S. strictum</i>	129
3.5.8. Содержание углеводного компонента во внеклеточных протеазах <i>S. strictum</i>	130
3.5.9. Электрофоретический анализ протеаз микромицета <i>S. strictum</i>	131
3.5.10. Ограниченный протеолиз плазминогена и расщепление фибриногена протеазами <i>S. strictum</i>	133
3.5.11. Хранение препарата Стриктолиазы	137
3.6. Оценка препарата, образуемого микромицетом <i>S. strictum</i> , в качестве фармацевтической субстанции	139
3.6.1. Определение чистоты и подлинности фармацевтической субстанции, образуемой микромицетом <i>S. strictum</i>	139
3.6.2. Аллергенность фармацевтической субстанции, образуемой микромицетом <i>S. strictum</i>	140
3.6.3. Иммунотоксичность фармацевтической субстанции, образуемой микромицетом <i>S. strictum</i>	143
3.6.4. Острая токсичность фармацевтической субстанции, образуемой микромицетом <i>S. strictum</i>	145
3.6.5. Проведение опытов <i>in vivo</i> и апробация мази для наружного применения на основе фармацевтической субстанции образуемой микромицетом <i>S. strictum</i>	147
ВЫВОДЫ	151
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	153
Приложение 1	156

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	158
------------------------------------	-----

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

aПC – активированный протеин C

AЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время

ИЭФ – изоэлектрофокусирование

КФ – классификация ферментов

ЛФ – лекарственная форма

НФ – неферментативный фибринолиз

ПААГ – полиакриламидный гель

ППС – противосвертывающая система крови

ПC – протеин C

n-ХМБ – пара-хлормеркурийбензоат

СС – система свертывания крови

Трис – трис-оксиметиламинометан

ТФ – тканевый фактор

ТХУ – трихлоруксусная кислота

ФС – фармацевтическая субстанция

ФФ – ферментативный фибринолиз

ФфВ – фактор Виллебранта

ХПС – хромогенный пептидный субстрат

Ip – внутрибрюшинное введение

Iv – внутривенное введение

pNA – пара-нитроанилин

t-PA – тканевый активатор плазминогена

RMSF – фенилметилсульфонилфторид

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы работы и степень ее разработанности

Сердечно-сосудистые заболевания и их осложнения (тромбозы) в XXI веке стали серьезной проблемой, затронувшей все цивилизованные страны. По данным ВОЗ они уносят более 26 млн. жизней в год, что сравнимо с потерями во время пандемии «испанки» в начале XX века или людскими жертвами в Первой мировой войне (Kotb, 2013). В такие времена человечеству одинаково необходимо знать и природу такой эпидемии, и причины её возникновения, а также одновременно вооружаться средствами лечения уже заболевших.

Современная медицина сделала свой выбор в пользу препаратов-активаторов плазминогена, которые активно применяются при лечении инфарктов миокарда, инсультов и тромбоза легочной артерии. Такие препараты лизируют тромбы, активизируя собственную систему тромболизиса пациента, и в значительной степени сокращают количество обычных осложнений консервативного лечения: кровотечений и ретромбозов (Панченко, 2001; Константинова и др., 2006).

Однако, препаратов-активаторов тромболизиса крайне мало. В России для борьбы с тромботическими осложнениями сердечно-сосудистых заболеваний используют лишь несколько импортных препаратов: стрептокиназу из гемолитического стрептококка, урокиназу и альтеплазу (рекомбинантный препарат тканевого активатора плазминогена человека). Они, к сожалению, не лишены многих недостатков и к тому же чрезвычайно дороги (700 - 1000 \$ за дозу), а потому не могут находиться в арсенале врачей скорой помощи. Между тем, последствия крайне опасных «ишемических ударов» можно устранить только проводя внутривенную тромболитическую терапию в первые 3-4 часа после установления диагноза.

Поиск новых более эффективных лечебных средств борьбы с тромбозами остается по-прежнему актуальной задачей современной науки.

Многие исследователи полагают, что будущее за использованием активных и экономически выгодных ферментных препаратов микроорганизмов, а не дорогостоящих генно-инженерных аналогов физиологических активаторов (таких как тканевой активатор и урокиназа). Многообразие осложнений сердечно-сосудистых заболеваний и индивидуальных особенностей пациентов примиряет оба эти мнения. Становится очевидно, что тромболитических препаратов должно быть много и разных.

Весьма перспективным источником для поиска новых лечебных препаратов-тромболитиков по-прежнему остаются протеазы грибов со свойствами ферментов гемостаза (Егоров, 1979; Ali Muhammed Moula Ali et al., 2020; Umay et al., 2023). К тому же современная микробиология, используя методы молекулярной биологии, биохимии и генетики существенно расширила диапазон знаний в этой области. Это дает возможность не только находить новые объекты для исследования, но и с большей эффективностью использовать уже существующие. Примером наиболее удачной отечественной разработки в этой области является препарат Лонголитин, представляющий собой комплексный тромболитический препарат экзопротеаз анаморфного гриба *Arthrobotrys longa* Mecht. 1 с активностью активатора плазминогена. В опытах на животных при внутривенном и наружном применении Лонголитина отмечается отсутствие аллергенных свойств, низкая токсичность, противовоспалительное действие и высокая тромболитическая активность в отношении стабилизированных тромбов (Подорольская и др., 2014). Однако, остались полностью неисследованными биохимические свойства Лонголитина. Изучение физико-химических свойств комплекса, а также закономерностей роста и выработки ферментов его продуцентом является важным дополнением к уже имеющимся данным.

Стремление к диверсификации тромболитических препаратов делает актуальным поиск новых продуцентов и изучение их протеаз. Детальное изучение новых протеолитических препаратов позволит смоделировать

механизм их действия *in vitro*. Обнаруженный новый продуцент - штамм *Sarocladium strictum* 203 обладает выраженной фибринолитической активностью, что обуславливает его возможное применение в составе терапевтических средств. Знание природы активности изучаемых протеаз позволит расширить сферу применения препаратов в области диагностики и лечения тромботических осложнений сердечно-сосудистых заболеваний.

Объектами исследования являлись штаммы микромицетов *Arthrobotrys longa* Mecht. 1 и *Sarocladium strictum* 203, а также полученные при их культивировании препараты внеклеточных протеаз с фибринолитической активностью.

Предметом исследования являлись свойства комплексов протеолитических ферментов тромболитического действия микромицетов *Arthrobotrys longa* Mecht. 1 и *Sarocladium strictum* 203. Для этого в работе были применены различные микробиологические, биотехнологические и физиологические способы оценки фибринолитического потенциала микромицетов и образуемых ими протеаз для создания высокоэффективных и безопасных фибринолитических препаратов.

Цель и задачи работы

Целью настоящей работы было изучение нового перспективного продуцента фибринолитических ферментов *Sarocladium strictum* 203 и образуемого им комплекса экзопротеаз и сравнение его с *Arthrobotrys longa* Mecht. 1.

В настоящей работе проведено исследование нового перспективного штамма *Sarocladium strictum* 203 - продуцента фибринолитических ферментов с активностью активатора плазминогена, схожих с перешедшим на этап доклинических испытаний продуктом Лонголитином запатентованного микромицета *Arthrobotrys longa* Mecht. 1 (патенты: RU 2182596 C2; RU

2332450 C1).

Ранее для продуцента фибринолитических ферментов *Arthrobotrys longa* Mecht. 1 сотрудниками лаборатории антибиотиков и лаборатории ферментативного фибринолиза биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова была выявлена способность штамма образовывать в глубинной культуре фибринолитические экзопротеазы. Был подобран оптимальный состав среды для получения протеаз и получен комплекс протеолитических ферментов Лонголитин (Шаркова, 1999). Также были изучены фибринолитическая и антикоагуляционная активности Лонголитина в опытах *in vitro*, и тромболитические и антикоагулянтные свойства препарата в опытах *in vivo* (Цыманович, 1992; Подорольская, 2013; Шаркова, 2013).

Для более детального изучения ранее запатентованного продуцента *Arthrobotrys longa* Mecht. 1 в настоящей работе была поставлена задача выявить особенности морфологии и физиологии микромицета *A. longa* Mecht. 1 при росте в глубинных условиях, а также изучить активность комплексного препарата Лонголитин по отношению к различным белкам, а также субстратам со свойствами белков системы гемостаза.

Для детального изучения нового выделенного продуцента фибринолитических ферментов были поставлены следующие задачи:

1. Установить гидролитический потенциал микромицета *S. strictum* и провести молекулярно-генетическую идентификацию выделенного организма.

2. Подобрать оптимальные условия культивирования нового продуцента такие как: состав и pH среды, а также выявить особенности морфологии и накопления протеолитических ферментов в глубинной культуре.

3. Сравнить активности протеаз микромицетов *S. strictum* и *A. longa*, а также сравнить препарат, выделенный из культуральной жидкости *S. strictum* (в дальнейшем Стриктолиаза), с коммерческими аналогами и с препаратами грибного происхождения.

4. Изучить особенности препарата Стриктолиаза путем расщепления им различных субстратов, а также тромбов *in vitro*, провести фракционирование препарата методом изоэлектрофокусирования, установить класс протеаз и их молекулярную массу, определить рН стабильность и рН оптимум, а также термостабильность и температурный оптимум работы протеаз. Установить температуру и срок хранения препарата Стриктолиазы для его дальнейшей коммерциализации в качестве фармацевтической субстанции.

Провести начальные этапы доклинических исследований препарата Стриктолиазы, таких как аллергенность, токсичность и острая токсичность, и подобрать оптимальный носитель для его использования в качестве наружного средства для устранения гематом.

Научная новизна работы

В представленной работе проведен широкий спектр исследований по изучению двух препаратов с выраженной фибринолитической активностью. Так, для препарата Лонголитин впервые показано выраженное действие по отношению к урокиназному хромогенному пептидному субстрату, а также изучено его воздействие на модель тромба *in vitro*. Методом изоэлектрофокусирования обнаружено три активных протеазы, входящих в данный комплексный препарат, и изучен вклад каждой составляющей в активность препарата Лонголитин.

При изучении особенностей роста исследованных микромицетов и накопления ими экзопротеаз было обнаружено наличие внутренних биоритмов культур и смена фаз генераций, что коррелировало с выходом ключевых протеаз в среду. Впервые показано, что при массовом прорастании спор у исследуемых продуцентов происходит выброс экзопротеаз в окружающую среду.

В работе впервые представлено комплексное исследование нового продуцента фибринолитических протеаз *S. strictum*, в результате которого

было установлено наличие внутренних биоритмов культуры и связанные с ним пики активности, а также образование экзопротеаз при росте на агаризованных средах, содержащих в качестве субстратов: казеин, желатин, крахмал, эластин. Проведено исследование как комплексного препарата Стриктолиазы, так и входящих в него компонентов, обладающими специфическими активностями, которые подтверждены результатами гидролиза как нативных белков, так и хромогенных пептидных субстратов со свойствами белков системы гемостаза, а также методом гидролиза тромба *in vitro*.

Проведено сравнение препарата Стриктолиаза с коммерческими аналогами, а также с различными препаратами грибного происхождения, что дает возможность рассматривать его применение в качестве медицинского препарата или использовать в составе диагностикумов наравне с известными аналогами.

Для каждого компонента комплекса определены оптимальные условия работы, такие как рН и температурный оптимум работы протеаз, а также показатели стабильности данных протеаз по тем же параметрам, установлен класс и молекулярная масса входящих в комплекс протеаз и впервые продемонстрирован активирующий эффект при добавлении в реакцию смесь гепарина, что существенно увеличивало активность компонентов. Полученные данные дают возможность существенно повышать эффективность Стриктолиазы в комплексе с гепарином. Также при длительном хранении препарата происходят незначительные потери в активности, что дает возможность его длительного использования, а также транспортировки в отдаленные регионы.

Впервые проведены начальные доклинические исследования Стриктолиазы, показавшие, что данный препарат не обладает аллергическими и цитотоксическими свойствами, что делает его безопасным для пациентов, а проведенные исследования на модели внутридермальной гематомы у крыс показали его высокую эффективность в качестве средства

для устранения гематом. При высокой фибринолитической эффективности данного препарата в кремовом носителе у модельных животных полностью отсутствовали раздражения и аллергия на компоненты применяемого крема.

В результате полученных данных можно говорить, что препарат Стриктолиаза является высокоэффективным быстродействующим фибринолитиком, который не оказывает пагубного воздействия на организм. Полученные результаты делают данную разработку уникальной и высоко востребованной в области медицины и косметологии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретический вклад данной работы заключается в обобщении и систематизации полученных данных, а также в изучении нового продуцента протеолитических ферментов с более выраженной фибринолитической и активаторной к плазминогену активностью. В работе представлен комплексный подход для изучения как продуцентов – микромицетов, так и образуемых ими комплексов ферментов, что дает возможность расширить имеющиеся данные в этой области, особенно касающиеся оценки фибринолитической активности протеаз.

Практическая значимость заключается в получении и изучении нового препарата, который благодаря своим свойствам может быть востребованным для медицины и косметологии, особенно в условиях импортозамещения. Очищенные протеиназы нового продуцента, обладающие ярко выраженной активаторной к плазминогену активностью по урокиназному типу, могут быть использованы в составе диагностического набора.

Методология и методы исследования

Автором выполнен анализ отечественной и зарубежной научной литературы по тематике работы. Проведение экспериментальной части работы проходило с привлечением системного подхода и включало в себя современные методы исследования в области микробиологии, молекулярной

биологии, биохимии, биотехнологии и физиологии животных.

Положения, выносимые на защиту

1. При росте в глубинных условиях микромицет *A. longa* Mecht. 1 развивается с эндогенным биоритмом с периодом в 72 часа. Данный биоритм соответствует максимумам выхода фибринолитических экзопротеаз в среду.

2. Смена генераций мицелия микромицета *S. strictum* 203 в глубинных условиях составляет 96 часов и так же, как у штамма *A. longa* Mecht. 1, соотносится с максимумами выхода протеаз. Максимальные фибринолитические активности совпадают с моментом массового прорастания спор в жидкой среде.

3. В состав комплексных препаратов, образованных микромицетами *A. longa* Mecht. 1 и *S. strictum* 203 входят минимум по три протеазы, обладающие как общей протеолитической, так и активаторной к плазминогену активностью по урокиназному типу.

4. Комплексный фибринолитический препарат, образованный микромицетом *S. strictum* 203, не оказывает аллергического и цитотоксического эффекта в экспериментах на животных.

5. При аппликации в составе крема препарата, образуемого микромицетом *S. strictum* 203, на внутридермальную гематому происходит заметное уменьшение пораженного участка с 4-ых суток наблюдения.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов определяется проведением достаточного количества повторностей экспериментов и их воспроизводимостью. Использование в работе различных микробиологических, биохимических, физиологических, статистических и биоинформатических методов и подходов позволяет всесторонне изучить поставленную задачу. Достоверность результатов также подтверждается публикациями в высокорейтинговых рецензируемых международных

журналах.

Структура диссертации

Работа состоит из следующих разделов: Список сокращений, Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы, Приложение, Список цитируемой литературы. Работа изложена на 172 страницах, содержит 18 таблиц, 54 рисунков и 139 литературных источника, 64 - на русском и 75 - на английском языке.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы опубликованы в высокорейтинговых журналах, а также запатентованы. Автором были сделаны доклады на российских и зарубежных конференциях: «Leiden International Medical Student Conference ‘Key to the Future’» (Нидерланды, 2017); «International Conference on Advances in Biomedicine and Biomedical Engineering 2017 & 6th International conference on Biotechnology and Bioengineering» (Германия, 2017); «Annual Conference 2018 of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM)» (Германия, 2018); «XVII International Congress of Medical Sciences» (Болгария, 2018); «18th European Congress on Biotechnology» (Швейцария, 2018); «13th Young European Scientist Meeting» (Португалия, 2018); Всероссийская конференция с международным участием «Микология и альгология в России. XX – XXI век: смена парадигм» (Россия, 2018); «3RD International Conference» (Литва, 2019); «26th International Student Congress Of (bio)Medical Sciences University Medical Center Groningen» (Нидерланды, 2019); «PhD Scientific Days 2020» (Венгрия, 2020); «3rd Joint Meeting of the International Society of Fibrinolysis and Proteolysis and the Plasminogen Activation Workshop» (Франция, 2022).

Личный вклад автора

Автором были самостоятельно получены и обработаны все изложенные

результаты, представленные в работе, также проведен анализ научной литературы в изучаемой области и опубликованы результаты проведенной работы.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 4 печатные работы, среди которых 4 опубликованы в базах Web of Science и/или Scopus. Также получен патент РФ на продуцента фибринолитических ферментов *S. strictum* 203. В статьях, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность к.б.н. Осмоловскому Александру Андреевичу и д.б.н. Котовой Ирине Борисовне за помощь, поддержку и чуткое руководство на протяжении всей работы, всему научному коллективу группы по изучению протеолитических ферментов микромицетов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ, а также к.б.н. Шарковой Тамаре Сергеевне за помощь в освоении темы и ценные рекомендации.

РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. 1. Система гемостаза

1.1.1. Основные функции системы гемостаза

Гемостаз – это комплекс процессов, протекающих в организме, в результате которых происходит остановка кровотечений, репарация поврежденных сосудов и восстановление кровотока. Реакции гемостаза в совокупности являются жизненно важной защитной системой организма. Все ее компоненты образуют сложную многоступенчатую систему (сеть) и организованы в каскады последовательных реакций. Система гемостаза отвечает за поддержание постоянной вязкости крови, предупреждение и купирование кровотечений, а также восстановление кровотока путем удаления кровяных сгустков после восстановления сосудов.

Регуляция гемостаза осуществляется сложными нейрогуморальными механизмами. Основные подсистемы гемостаза (Северин, 2004):

1. Система свертывания: первичный и вторичный гемостаз.
2. Противосвертывающая система:
 - а) антикоагуляционное звено;
 - б) фибринолитическое звено: ферментативный и неферментативный фибринолиз.

В здоровом организме все эти системы связаны. Изменение функционального состояния одной из них сопровождается компенсаторным сдвигом деятельности другой.

1.1.2. Система свертывания крови

Свертывание крови или тромбообразование – это процесс превращения растворимого белка фибриногена в фибрин, которое происходит под действием сериновой протеазы тромбина.

Физиологически активные вещества, принимающие участие в свертывании крови и находящиеся в плазме, называются плазменными факторами крови. Они обозначаются соответствующими названиями или римскими цифрами в хронологическом порядке. Насчитывается 13 факторов свертывания. Шесть из них являются проферментами сериновых протеаз (факторы II, VII, IX, X, XI, XII). Три являются кофакторами протеаз (факторы III, V, VII). Фактор XIII относится к трансклутаминазе (табл. 1).

Таблица 1.

Плазменные факторы свертывания крови (Шмидт, 2005).

Номер фактора	Название фактора	Функции
I.	Фибриноген	Под действием тромбина фибриноген превращается в нерастворимый в крови фибриллярный белок — фибрин, основное вещество тромба (сгустка крови).
II.	Протромбин	Полимеризуется в тромбин, активирует факторы V, VIII, XIII, стимулирует противосвертывающую систему.
III.	Тромбопластин	Кофактор фактора VII.
IV.	Ионы Ca ²⁺	Участвует в активации и агрегации тромбоцитов, полимеризации фибриногена, стабилизации фибрина. Связывает факторы протромбинного комплекса с фосфолипидами.
V.	АС-глобулин	Регуляторный белок, активирует фактор X.
VII.	Проконвертин	Активирует фактор X, ускоряет превращение протромбина в тромбин.
VIII.	Антигемофильный глобулин	Кофактор фактора X.

IX.	Кристмас-фактор	Участвует в качестве катализатора, активирует фактор X в комплексе с фактором VIII и IV.
X.	фактор Стюарта-Прауэра	Участвует в образовании протромбиназы, превращающей протромбин в тромбин.
XI.	Предшественник тромбопластина	Участвует в активации факторов VIII и IX.
XII.	фактор Хагемана	Участвует в активации фактора XI, превращении прекалликреина в калликреин.
XIII.	Фибрин-стабилизирующий фактор	Стабилизирует фибрин, участвует в формировании плотного сгустка.
Витамин К-зависимые факторы: II, VII, IX, X.		
Чувствительные к тромбину факторы: I, V, VIII, XIII.		
Факторы контакта: XII, XI, высокомолекулярный кининоген, прекалликреин.		
Факторы-сериновые протеазы: XII, XI, X, IX, X, VII, II, плазмин.		

Тромбин – гликопротеин с молекулярной массой 39 кДа, образуется в крови из неактивного предшественника протромбина. Протромбин (70 кДа) синтезируется в печени, и содержит остатки γ -карбоксиглутаминовой кислоты. Тромбин путем ограниченного протеолиза превращает фибриноген в фибрин (Веремеенко и др., 1988).

Фибриноген – это гликопротеин с молекулярной массой 340 кДа, который синтезируется в печени (рис. 1). Молекула фибриногена состоит из шести полипептидных цепей, которые связаны друг с другом дисульфидными связями. Эти цепи обозначают, соответственно, как $A\alpha_2$, $B\beta_2$, γ_2 . Заглавные буквы соответствуют тем участкам, которые отщепляются под действием тромбина при превращении фибриногена в фибрин. Фрагменты А и В содержат большое количество остатков аспартата и

глутамата, что создает сильный отрицательный заряд на N-концах молекул фибриногена и препятствует их агрегации (Северин, 2004).

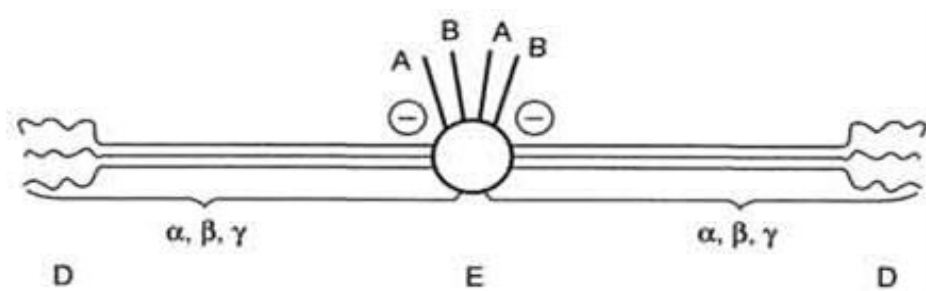


Рис. 1. Строение фибриногена (Северин, 2004).

Образование фибринового тромба проходит в 4 этапа (рис. 2):

- 1) Превращение фибриногена в мономер фибрина путем отщепления отрицательно заряженных фрагментов А и В;
- 2) Образование нерастворимого геля фибрина в результате взаимодействия центров связывания домена Е одной молекулы с комплементарными им участками на доменах D других молекул;
- 3) Стабилизация геля фибрина за счет образования амидных связей между двумя молекулами фибрина;
- 4) Ретракция или сжатие фибринового сгустка - обеспечивается актомиозином тромбоцитов (Северин, 2004).

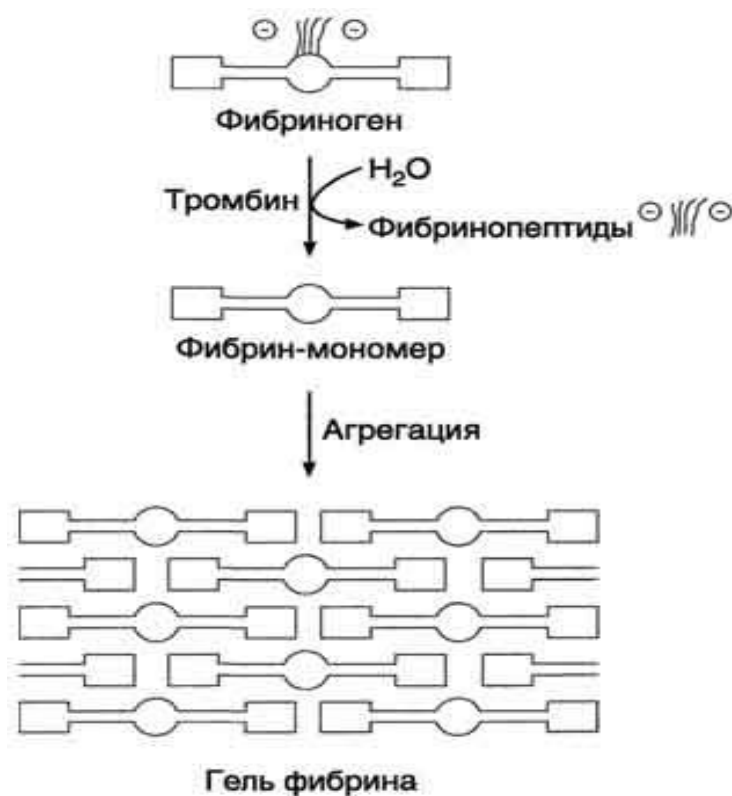


Рис. 2. Образование геля фибрина (Северин, 2004).

1.1.2.1. Современная схема системы свертывания крови

В настоящее время, благодаря более детальному изучению и развитию новых представлений о механизмах гемостаза и тромбообразования, открыли новые ингибиторы каскада свертывания, новое семейство рецепторов, активируемых факторами свертывания крови, новые функции известных адгезивных белков (Струкова и др., 2002).

Современная (или клеточная) схема тромбообразования включает в себя 3 стадии: инициацию, усиление и распространение (рис. 3).

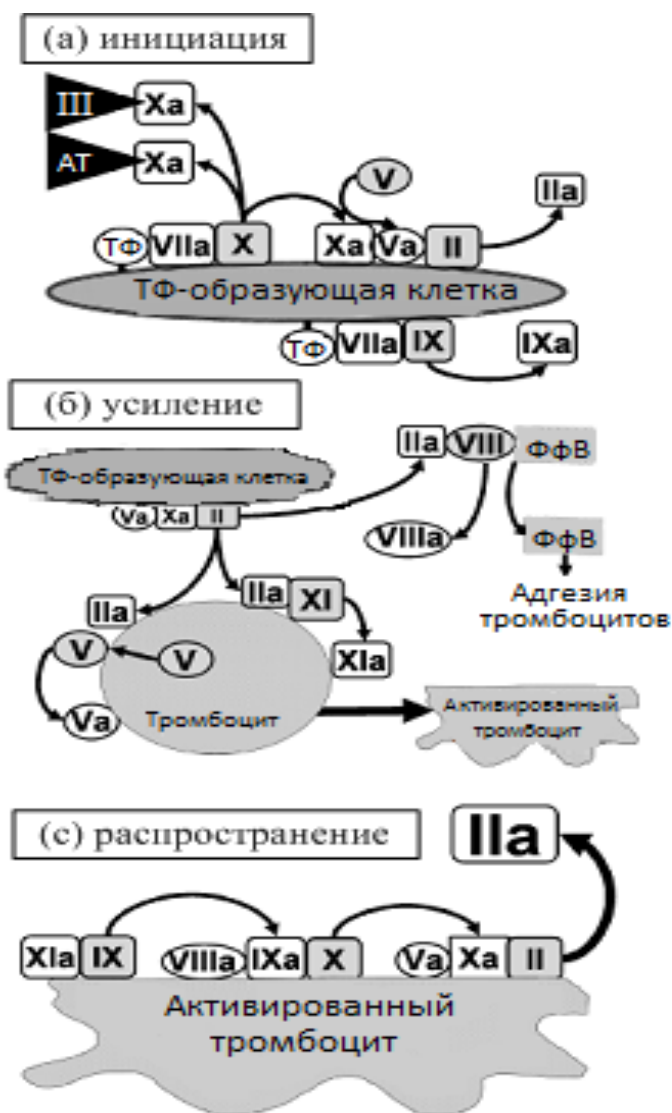


Рис. 3. Клеточная схема свертывания крови (Wolberg et al., 2012).

Римские цифры – номера факторов свертывания, ТФ – тканевый фактор, ФфВ – фактор Виллебранта.

На первом этапе (этап инициации) на поверхности поврежденного сосудистого эндотелия (травма, образование свободных радикалов, возникновение эндотоксинов и др.) возникают прокоагулянтные и адгезивные белки, с которыми контактируют тромбоциты.

Тканевый фактор и фактор VIIa активируют факторы IX и X, образуя небольшое «запальное» количество тромбина. Поврежденная поверхность сосуда закрывается распластанными тромбоцитами (адгезия), собранными в агрегаты. Образуется непрочный рыхлый тромб («первичный гемостаз»). Он

обеспечивает остановку кровотечения в мелких сосудах. Также этот процесс является обратимым.

На втором этапе (этап усиления) под влиянием тромбина на тромбоцитах в нарастающем количестве накапливаются комплексы, включающие факторы Va, VIIIa и IXa. Активация тканевых и плазменных факторов свертывания крови приводит к образованию тромбина, а затем фибрина, что в свою очередь ведет к формированию вторичного стабильного фибринового тромба. Это необходимо для остановки кровотечения в крупных сосудах, чтобы фибриновый тромб выдерживал высокое давление и не вымывался.

В третью фазу (фаза распространения) на поверхности активированных тромбоцитов формируются теназные (фактор VIIIa/ фактор IXa) и протромбиназные (фактор Va/ фактор Xa) комплексы.

Эти комплексы обеспечивают лавинообразное нарастание уровня тромбина. Тромбин переводит фибриноген (фактор I) в фибрин (фактор Ia), а также активирует фактор XIII, обеспечивающий стабилизацию фибриновых нитей и образование множества ковалентных перекрестных связей между ними.

Таким образом, по современным представлениям процесс свертывания крови *in vivo* является единым и связан с гемостатическими реакциями тромбоцитов. Благодаря сложному рецепторному аппарату кровяных пластинок, они не только участвуют в активации коагуляционных факторов, но и выполняют функцию регуляции всего процесса свертывания крови. Взаимосвязь тромбоцитов, факторов свертывания крови и сосудистой стенки постоянно уточняется (Hoffman et al., 2001; Smith et al., 2009; Wolberg et al., 2012).

1.1.3. Противосвертывающая система крови

Противосвертывающая система крови имеет рефлекторно-гуморальную природу, установлен триггерный механизм ее действия. Свертывание крови происходит и при незначительных порезах, однако при тяжелом

кровотечении оно становится доминирующей защитной реакцией.

1.1.3.1. Антикоагулянтное звено противосвертывающей системы

Физиологические первичные антикоагулянты образуются независимо от протеолиза. К ним относятся такие ингибиторные факторы, как гепарин, протеин С, протеин S и тромбомодулин.

Гепарин представляет собой мукополисахарид с молекулярной массой от 3 до 43 кДа, и, в силу своих структурных особенностей, в свободном виде не существует, а сразу же образует комплексы с различными компонентами крови.

Гепарин тормозит процесс образования протромбиназы, блокирует превращение протромбина в тромбин, препятствует взаимодействию тромбина с фибриногеном. Антикоагулянтный эффект объясняется его способностью образовывать комплексные соединения с тромбогенными белками – протромбином, тромбином, фибриногеном (Смирнов и др., 2002).

Тромбомодулин — высокоаффинный рецептор тромбина. Тромбомодулин связывает и инактивирует свертывающую активность тромбина и повышает антикоагулянтный потенциал сосудистой стенки. Он совместно с тромбином активирует протеин С, чему способствует также протеин S. При возникновении комплекса тромбомодулина с тромбином образование активированного протеина С ускоряется в 20 тысяч раз. Активированный ПС (аПС), действуя каталитически, прерывает каскад гемокоагуляции. Протеин S – витамин К-зависимый белок системы противосвертывания - ускоряет инактивацию этих факторов аПС. Это ограничивает генерацию тромбина на периферии тромба, где эндотелий не поврежден.

1.1.3.2. Фибринолитическое звено противосвертывающей системы.

Ферментативный и неферментативный фибринолиз

Ферментативный фибринолиз (ФФ) — это растворение тромбов под действием плазмина, расщепляющего фибрин. Основные компоненты фибринолиза — плазминоген, плазмин, а также их активаторы и ингибиторы (рис. 4). Активация данной системы приводит к образованию плазминогена — мощного протеолитического фермента, обладающего разнообразным действием *in vivo* (Шиффман и др., 2001).

Внешний, наиболее важный, путь активации ФФ происходит под влиянием тканевого активатора плазминогена (t-РА) - сериновой протеазы, имеющей большое сродство к фибрину. Тканевый активатор плазминогена соединяется с фибрином и превращает связанный с фибрином плазминоген в плазмин.

Плазминоген — это одноцепочечный гликопротеид, состоящий из 791 аминокислотного остатка, образуется в почках, печени и костном мозге. Он превращается в активную протеазу (плазмин) путем разрыва одной пептидной связи между остатками Arg560 и Val561. В N-концевой части молекулы плазминогена (и плазмина) находятся высокоаффинные лизинсвязывающие участки, которые обеспечивают взаимодействие с фибрином.

Помимо тканевого активатора (t-РА) существуют и другие активаторы плазминогена - одноцепочечные и двухцепочечные урокиназы.

Одноцепочечная урокиназа высвобождается эндотелиальными клетками только в ответ на сильные стимулы. Под действием плазмина она превращается в активную двухцепочечную форму и вызывает дальнейшую трансформацию плазминогена в плазмин. Урокиназа фиксируется на поверхности клеток, имеющих рецепторы для плазминогена. Это ведет к образованию активного плазмина на эндотелии и различных форменных элементах крови, участвующих в формировании тромба.

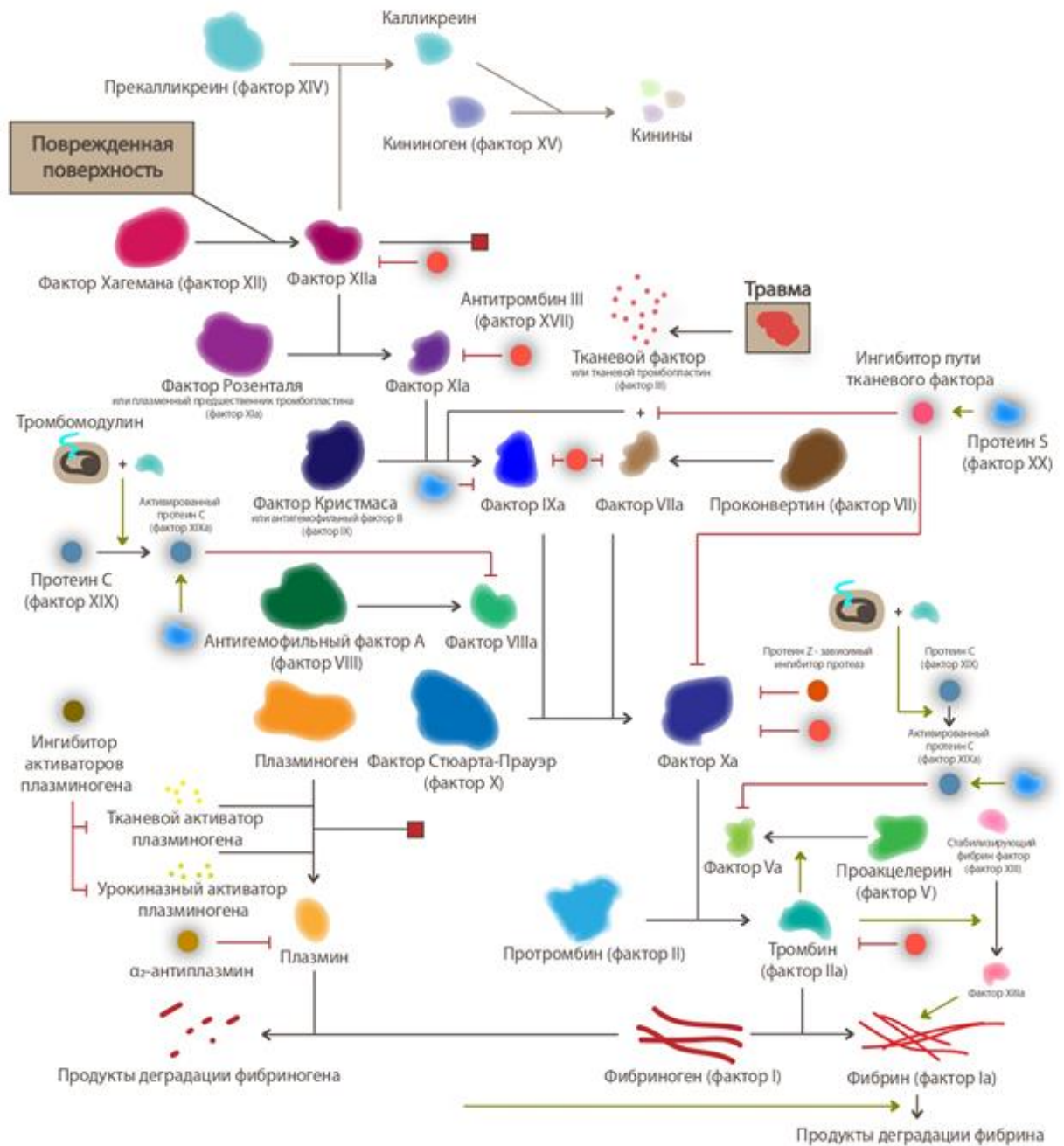
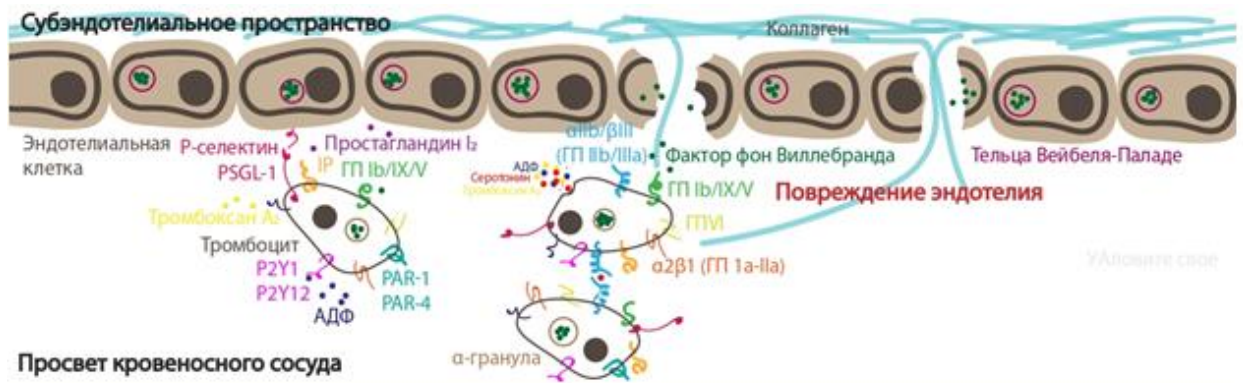


Рис. 4. Схема двухфазной активации системы свертывания крови с параллельной активацией фибринолитической системы.

Внутренний путь стимуляции ФФ осуществляется плазменными активаторами и подразделяется на Хагеман-зависимый и Хагеман-независимый. Он сводится к активности фактора XII (фактор Хагемана) и протеолитической калликреин-кининовой системы. Образующийся калликреин не только участвует в генерации кининов, но и способствует превращению плазминогена в протеолитический фермент плазмин. Фактор Хагемана оказывается связующим звеном между процессами воспаления и свертывания крови (Смирнов и др., 2002; Шиффман и др., 2001; Струкова и др., 2001; Ляпина и др., 2012; Herrewegen et al., 2012).

Помимо ферментативной фибринолитической системы в организме существует система неферментативного фибринолиза (НФ), который осуществляется комплексными соединениями гепарина с адреналином, фибриногеном, плазмином и другими веществами крови. Комплексы гепарина с тромбогенными белками крови и другими активными веществами тормозят свертывание крови и очищают сосудистое русло от фибрин-мономеров и нестабилизированных тромбов. При этом совершаются конформационные изменения в молекуле фибрина-S (Кудряшов и др., 1977).

Помимо комплексных соединений гепарина неферментативным фибринолитическим действием обладают и естественные продукты гидролиза коллагена и эластина - короткие пролинсодержащие пептиды (глипролины Pro-Gly, Pro-Gly-Pro и их производные) (Гаврилов и др., 1985).

Неферментативный фибринолиз играет важную роль в регуляции жидкого состояния крови и естественной профилактики тромбоза. Его компоненты ингибируют ранние стадии фибринообразования. Интересно и то, что НФ способствует поддержанию жидкого состояния крови и предупреждению тромбообразования при стрессовых ситуациях, поскольку он трансформирует адреналин из фактора риска в компонент противосвертывающей системы (Куприна и др., 2004).

1.2. Протеолитические ферменты. Протеолиз

1.2.1. Каскадные ферментные процессы системы гемостаза

Системы свертывания крови и фибринолиза — это многокомпонентные ферментные системы организма, в которых продукт предыдущей реакции служит ферментом для следующей. Такие каскадные механизмы протеолиза обеспечивают быстрое накопление больших количеств активной формы последнего фермента цепи. Большинство ферментов системы фибринолиза являются протеолитическими. Для этих ферментов характерна быстрота и высокая экономичность регуляторного действия (Antonov et al., 1991).

Протеолитическими ферментами (протеазами) называют ферменты, катализирующие гидролиз пептидных связей в белках. Число таких ферментов весьма велико, и они чрезвычайно разнообразны, что может быть обусловлено разнообразием функций, обладаемых протеолитическими ферментами, и множественностью субстратов, последовательно образующихся при расщеплении компактной глобулы белка до коротких пептидов, а затем – до аминокислот (Степанов и др., 2005).

Протеолитические ферменты встречаются во всех без исключения живых организмах, начиная от вирусов и заканчивая человеком (Antonov et al., 1991). Протеазы играют важную роль в таких жизненно важных физиологических процессах как гемостаз, апоптоз, дифференциация тканей.

Протеазы имеют широкое коммерческое значение, они используются как в промышленности, так и в медицине. Поэтому в биотехнологии особое внимание уделяется источникам их получения. Так как продуктивность животных и растительных источников протеаз невелика, все больший интерес вызывают протеолитические ферменты микробного и грибного происхождения (рис. 5). Товарооборот микробных энзимов в мире составляет 1 млрд \$, а объем продаж - около 60% от мирового объема промышленных ферментов (Neurath et al., 1989; Meenu et al., 2000).

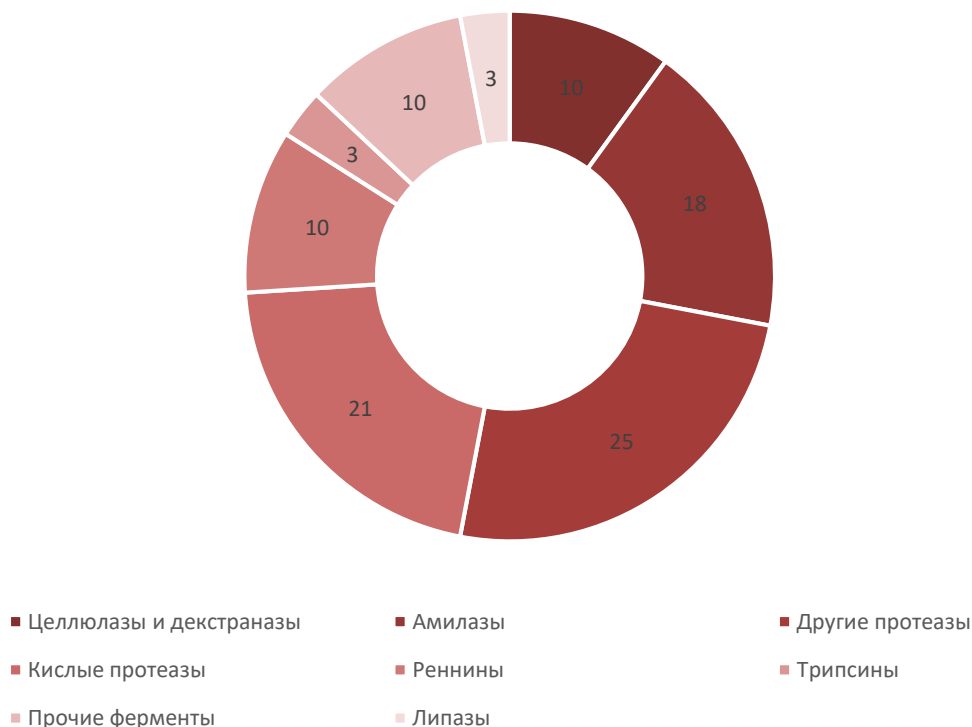


Рис. 5. Объемы продаж (%) протеолитических ферментов микробного и грибного происхождения на 2023 г¹.

В соответствии с прогнозами, рынок протеаз будет расти на 5.8% ежегодно в период до 2027 года. Экономический кризис, а также пандемия COVID-19 существенно повлияли на мировой рынок протеаз. Протеолитические препараты показали высокую эффективность в качестве терапевтического противовирусного средства. Таким образом, потребительский спрос на данные ферменты существенно возрос. Также Азиатско-Тихоокеанский рынок протеаз переживает быстрый рост в связи с возрастающим спросом на переработанные продукты питания и корма для животных и считается самым быстроразвивающимся в данной области регионом.¹

¹ Анализ размера и доли рынка протеаз - тенденции роста и прогнозы (2023 - 2028 гг.) <https://www.mordorintelligence.com/ru/industry-reports/proteases-market>

1.2.2. Класс пептид-гидролаз

Согласно иерархической классификации ферментов (КФ), по типу катализируемых реакций протеазы относятся к ферментам 4 группы 3 класса (гидролазам). Класс пептид-гидролаз (КФ 3) подразделяется на два подкласса: экзопептидазы (КФ 3.4.11-19) и эндопептидазы, или протеазы (КФ 3.4.21-24).

Экзопептидазы гидролизуют белки, отщепляя аминокислоты от конца полипептидной цепи: карбоксипептидазы - от С-конца, аминопептидазы - от N-конца, дипептидазы расщепляют дипептиды, дипептидилпептидазы – дипептиды либо с N-, либо с С-конца полипептидной цепи (Мосолов и др., 1971; Павлюкова и др., 1998).

Эндопептидазы (протеазы) обычно классифицируют на основе строения их каталитического центра и последовательности аминокислот, которые входят в состав фермента. Протеазы делятся на 7 семейств: сериновые, аспартатные, цистеиновые (тиоловые), металлопротеазы, глутаминовые, треониновые и аспарагиновые. Отдельную группу составляют протеазы с неизвестным типом катализа (Немова и др., 2008., Мацелюх и др., 2012).

1.2.2.1. Сериновые протеазы

Сериновые протеазы (КФ 3.4.21) обнаружены в организме эукариот и прокариот, а также у вирусов (Lokesh et al., 2008). Для всех ферментов этой группы характерно наличие в активном центре остатков Ser195, His57, Asp102. У сериновых протеаз выявлено высокое сходство пространственных структур, несмотря на то что только в 40% из них содержатся идентичные аминокислоты.

Подавляющее большинство факторов системы гемостаза представлены сериновыми протеазами. Они циркулируют в крови в виде проферментов и активируются по мере необходимости (Зубаиров и др., 2000; Немова и др., 2008; Северин, 2014).

В процессе активации нативных белков сериновые протеазы гидролизуют одну или две специфические пептидные связи из сотен связей, имеющих в белковом субстрате (Северин, 2014). Каталитический механизм протеолиза складывается из двухэтапной реакции гидролиза (ацилирования и дезацилирования), в котором интермедиат (комплекс фермент-субстрат) теряет остаток аминокислоты или целый пептидный фрагмент. Остаток серина представляет собой нуклеофил в реакции протеолиза и ацилируется, атакуя карбоксильную группу гидролизующейся пептидной связи. Донором протона для освобождения NH- группы является остаток гистидина.

Согласно базе данных протеолитических ферментов MEROPS², сериновые протеазы представлены 55 семействами (подподклассами). Одним из наиболее многочисленных является семейство химотрипсинов (S1). Оно включает в себя множество сериновых протеаз животных, в том числе трипсин, эластазу, тромбин, плазмин, тканевые сериновые протеазы. У прокариот трипсиноподобные белки участвуют в процессах лизиса клеточной стенки, ответа на температурный шок, токсинообразования и т.д. (Степанов и др., 2005; Tripathi and Sowdhamini, 2008).

Семейство субтилизинов (S8) является вторым по численности и содержит в себе тиолзависимые сериновые протеазы, внутриклеточные сериновые протеазы бацилл, а также субтилизинподобные протеазы из различных таксономических групп – архей и грибов, в том числе дрожжей. Большинство ферментов этой группы проявляют широкую субстратную специфичность. Они участвуют в процессах питания прокариот, внедрения их в организм хозяина, способствуют образованию бактериоцинов и т.д. (Руденская и др., 1994; Tripathi and Sowdhamini, 2008).

Эти два семейства не похожи ни по аминокислотной последовательности, ни по общей форме, и даже принадлежат к разным структурным классам. Они имеют одинаковую конфигурацию лишь

² База данных по пептидам и их ингибиторам MEROPS
<https://www.ebi.ac.uk/merops/>

ключевых аминокислотных остатков в каталитическом центре, причем не всех остатков, а лишь функционально важных. Однако они не имеют одинаковой конфигурации остатков в субстрат-связывающем домене (Северин, 2014).

Все сериновые протеазы чувствительны к специфическим ингибиторам, взаимодействующим с каталитически активным остатком серина: диизопропилфторфосфату (DFP), фенилметилсульфонилфториду (PMSF) и некоторым ингибиторам микробного, животного и растительного происхождения (Antonov et al., 1991).

Сериновые протеазы в основном активны при нейтральных и щелочных значениях pH, с оптимумом действия между pH 7.0 и 10.0. Их молекулярная масса колеблется от 15 до 35 кДа, но есть и исключения. Например, молекулярная масса протеазы *Blakeslea trispora* составляет 126 кДа (Мацелюх и др., 2012).

Мишенями сериновых протеаз обычно являются пептидные связи, образованные остатками положительно заряженных аминокислот лизина и аргинина, а также эфиры и амиды этих аминокислот (Фершт, 1980).

1.2.3. Протеолиз

Протеолиз — это ферментативный гидролиз амидных связей в белках и пептидах. Химический механизм протеолиза сходен для всех протеолитических ферментов. Эти механизмы можно свести к двум типам: нуклеофильному (ковалентному) катализу, осуществляемому группировками самого фермента, и общему основному катализу расщепления амидной группы под действием связанной с ферментом молекулы воды. Различие здесь не очень существенное: в первом случае нуклеофилом является группа белка, в другом случае — молекула воды. Более того, второй тип катализа осуществляется и в первом случае на более поздних стадиях (Antonov et al., 1991). Таким образом, различие в катализе разрыва пептидной связи у разных

структурных типов протеаз заключается лишь в том, какая группировка молекулы играет роль нуклеофила. Протеолиз является древним механизмом, который развился, чтобы управлять бесчисленными клеточными процессами у всех форм жизни.

1.2.3.1. Ограниченный и неограниченный протеолиз

Неограниченный, или исчерпывающий, протеолиз сводится к полной деструкции белка – то есть к распаду молекулы на отдельные аминокислотные остатки. Однако исчерпывающий гидролиз белковых субстратов, при всей его значимости, никак не является единственной функцией системы протеолитических ферментов. Чрезвычайно важные функции в организме выполняют реакции ограниченного протеолиза, которые регулируют активность многих белков, а также играют чрезвычайно ответственную физиологическую роль (Степанов, 2005; Финкельштейн, 2012).

Ограниченным протеолизом называют разрыв одной или нескольких строго определенных связей в молекуле белка. Он ведет к активации неактивных форм ферментов и является важнейшим регуляторным механизмом, который может способствовать возникновению новых физиологических функций или регулировать уже существующие (рис. 6). Реакции ограниченного протеолиза участвуют в процессе образования и инактивации практически всех ферментов, гормонов и других биологически активных белков и пептидов, и, следовательно, в контроле активности основных биорегуляторов человеческого организма. Это объясняет повышенный интерес исследователей к изучению ферментов, осуществляющих селективный протеолиз белковых молекул.

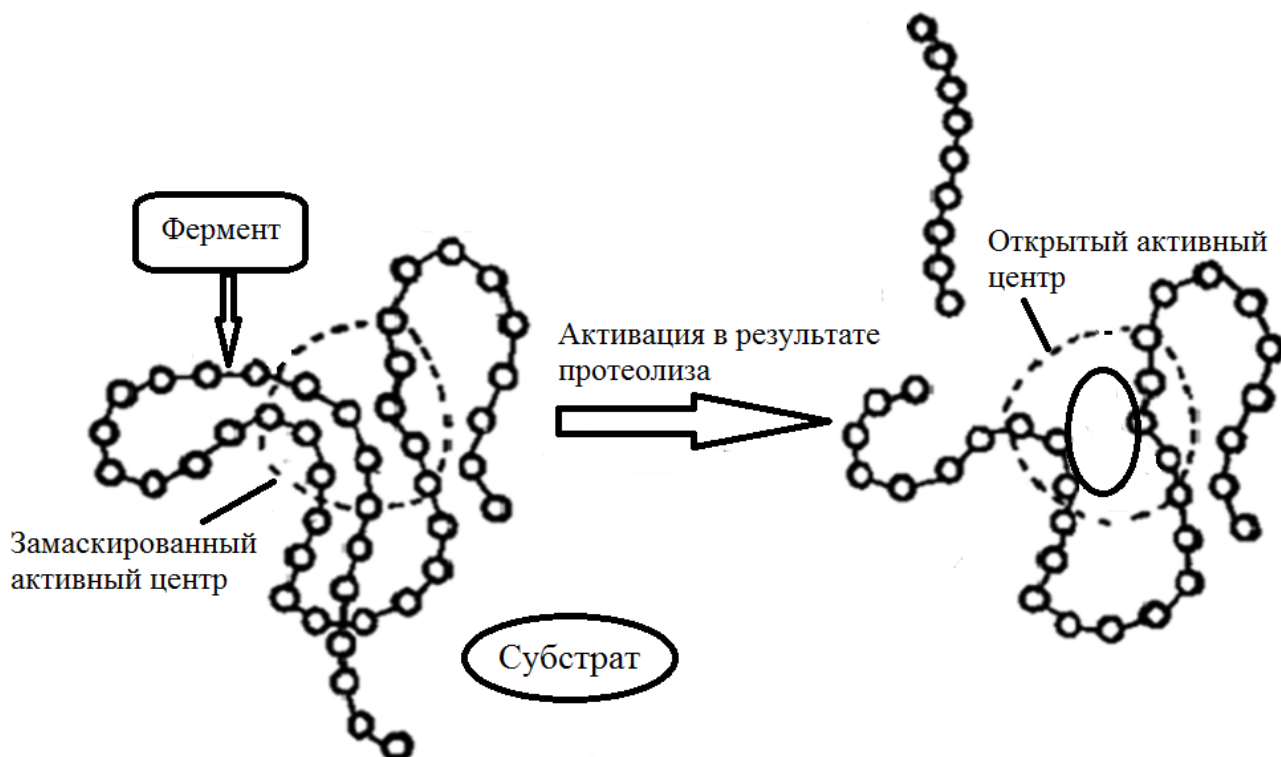


Рис. 6. Механизм ограниченного протеолиза.

Реакции ограниченного протеолиза в большинстве случаев осуществляются при помощи каскадного механизма (например, процесс свертывания крови и фибринолиза). На каждом этапе такого процесса из соответствующего зимогена образуется протеолитический фермент, катализирующий следующую реакцию. Обычно пептидная связь расщепляется на поверхности молекулы предшественника, а не на внутренних участках (Веремеенко и др., 1988; Antonov et al., 1991; Финкельштейн, 2012).

1.3. Грибы – продуценты внеклеточных гидролаз со свойствами протеолитических ферментов системы гемостаза

1.3.1. Внеклеточные протеолитические ферменты грибов

Грибы представляют собой гетеротрофные эукариотные организмы. По общей численности среди всех организмов грибы занимают второе место после насекомых, хотя предполагается, что описано лишь 5% существующих видов. Биомасса грибов в почве составляет около 90% массы всех организмов, включая беспозвоночных животных. В качестве источников пищи и энергии они способны утилизировать сложные органические соединения, которые вследствие большой молекулярной массы не могут проходить через клеточную мембрану. Вегетативное тело большинства грибов представляет собой мицелий, состоящий из ветвящихся гиф с апикальным ростом.

Отличительной чертой грибов является осмотрофный способ питания. Мицелий поглощает питательные вещества из субстрата всей поверхностью, и это предполагает выделение грибным мицелием в субстрат многочисленных внеклеточных ферментов, способных разрушать высокомолекулярные полимеры до олиго- и мономеров (Гарибова и Лекомцева, 2005; Дьяков, 2008).

Особое место среди грибных экзоферментов занимают протеолитические ферменты. Они чрезвычайно разнообразны, обладают как широкой, так и узкой субстратной специфичностью, способностью к ограниченному протеолизу и устойчивостью в экстремальных условиях. Это обуславливает высокие адаптивные способности грибов и их возможность осваивать уникальные экологические ниши (Беккер и др., 1988; Павлюкова и др., 1998; Намазов и др., 2010). Протеолитические ферменты играют важную роль в физиологии и развитии грибов. Внешний гидролиз белковых субстратов внеклеточными протеазами необходим для выживания и роста как сапротрофных, так и патогенных видов. Протеолитические ферменты грибов-

патогенов способствуют воспалению путем взаимодействия с кининовой системой, а также участвуют в коагуляции и фибринолитических процессах.

Протеазы микромицетов широко используются в биотехнологии, в основном в пищевой, кожевенной промышленности, производстве моющих средств, в экологических процессах биоремедиации и получении терапевтических пептидов. Участие грибных протеаз в различных патологических механизмах делает их потенциальными биомаркерами для различных заболеваний (Мосолов и др., 1971; Rao et al., 1998).

1.3.2. Внеклеточные протеолитические ферменты грибов со свойствами ферментов системы гемостаза

Способность протеолитических ферментов грибов к селективному протеолизу компонентов плазмы крови определила направление работ многих исследователей-микробиологов, занятых поисками препаратов для лечения и диагностики нарушений системы гемостаза (Батомункуева и Егоров, 2001; Peng et al., 2005; Ali Muhammed Moula Ali et al., 2020).

Свойство микромицетов коагулировать плазму и кровь человека, воздействуя на факторы крови подобно тромбину, впервые была обнаружена Н.С. Егоровым и сотрудниками на кафедре микробиологии Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова. Наиболее активные культуры были выявлены среди грибов родов *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* и *Alternaria* (Егоров и Ушакова, 1973; Zhang et al., 2007; Yike et al., 2011; Rashmi et al., 2013).

Почти одновременно японские ученые установили, что протеазы микромицетов рода *Cephalosporium* (современное название этого рода - *Acremonium*) обладают как свойствами ферментов фибринолиза, так и особенностями протеолитических ферментов системы свертывания (Pisano et al., 1963; Toshio Satoh et al., 1977).

На кафедре микробиологии Московского университета у экзопротеаз

микробицета *Aspergillus ochraceus* была впервые обнаружена активность активатора протеина С и получен лиофилизированный комплексный препарат этих белков (Ландау и др., 1998; Батомункуева и Егоров, 2001; Егоров и др., 2009).

Идея использования ферментов грибов для ликвидации тромбозов и эмболии принадлежит М. Стефанини, получившему в 1958 г. первый инъекционный препарат такого типа: «Аспергиллин О» из *Aspergillus oryzae*. Препарат представлял собой нейтральный белок, осаждающийся солями тяжелых металлов (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}). Почти одновременно сотрудниками МГУ Б.А. Кудряшовым, Н.С. Егоровым с коллегами и С.М. Струковой был получен препарат-тромболитик из *A. oryzae* штамм МГУ – «аспергиллин М» (Беккер, 1988; Stefanini and Adamis, 1959)

К сожалению, первые препараты-тромболитики («аспергиллин О», «аспергиллин М», террилитин, браназа), непосредственно действующие на фибрин, не нашли широкого применения в клинике. Это связано с тем, что они не полностью соответствовали требованиям, которые предъявляются к медицинским препаратам. Применение их часто осложнялось кровотечениями у больных. Между тем, тромболитические препараты должны быть не только эффективными, специфичными и резистентными к ингибиторам плазмы крови, но и не должны вызывать геморрагических осложнений, токсических и аллергических реакций.

В настоящее время поиски продуцентов фибринолитических ферментов с тромболитической активностью ведутся среди грибов различных трофических групп: сапротрофов, фитопатогенных форм, возбудителей заболеваний человека, немато- и энтомофагов (табл. 2).

Таблица 2.

Продуценты фибринолитических ферментов из различных систематических и трофических групп грибов и свойства их протеаз.

Продуцент	Активность	Класс семейства	Мол. масса (кДа)	Опт. t °С	Опт. рН	Ссылка
<i>p. Arthrobotrys</i> <i>p. Trichothecium</i> (нематофаги)	фибринолитическая	–				Степанова и др., 2001
<i>Fusarium</i> sp. BLB (патоген)	фибринолитическая и тромболитическая	Сериновая трипсиноподобная	27	50	9.5	Sugimoto. et al., 2007; Ueda et al., 2007
<i>Fusarium</i> sp. CPCC480097 (патоген)	фибринолитическая и тромболитическая	химотрипсиновая	28.0	45	8.5	Wu et al., 2009
<i>Cordiceps sinensis</i> (паразит членистоногих)	фибринолитическая	Сериновая	31	40	7.0	Li et al., 2007
<i>Rhizopus chinensis</i> 12 (выделен из тофу)	фибринолитическая	Hydrosulfuril-Металлпротеаза	16.6-18.0	45	10.5	Xiao-Ian et al., 2005;
<i>Oidiendron flavum</i> , <i>Humicola grisea</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Teratomyces lanuginosus</i> (термофилы)	фибринолитическая	–	–	–	–	Tharwat, 2006
<i>Scedosporium aprospermum</i> (патоген)	фибринолитическая	Сериновая, субтилизиновая	33	37-50	9.0	Larcher et al., 1996
110 штаммов <i>pp. Arthrobotrys</i> , <i>Nematophagus</i> , <i>Candelabrella</i> , <i>Golovina</i> , <i>Dactylella</i> , <i>Dactylario psis</i> , <i>Dactylaria</i> (нематофаги)	фибринолитическая и тромболитическая	–	–	–	–	Касумова и др., 2009
<i>Penicillium chrysogenum</i> SGAD12 (сапротроф)	фибринолитическая	–	–	–	–	Gopinath et al., 2011

<i>Schizophyllum commune</i> (дереворазрушающий)	фибринолитическая	металлопротеаза	17	45	4.0-6.0	Park et al., 2010 (по E. Kotb, 2013)
<i>Armillaria mellea</i> (дереворазрушающий)	фибринолитическая и фибриногенолитическая	металлопротеаза	21	33	5 - 8	Lee et al., 2005

Новым источником продуцентов фибринолитических ферментов в последнее время стали блюда традиционной национальной кухни многих стран Азии, приготовленных из ферментированных бобов и морепродуктов. С древних времен было известно, что употребление таких продуктов заметно улучшало состояние больных с заболеваниями сосудов. В Китае изготавливают сырообразный деликатес, используя для этого соевые бобы и некоторые виды муконовых грибов (Liu et al., 2006).

Японская кухня знаменита блюдом под названием «Натто». Его получают из соевых бобов, сброженных грибами и бактериями, среди которых *Aspergillus oryzae* и *Bacillus subtilis natto*. В 1987 г. на основе протеазы, выделенной из «Натто», был получен препарат Наттокиназа (Sumi et al., 1987; Fujita et al., 1993; Ero et al., 2013).

Характерным элементом традиционной индонезийской кухни является продукт под общим названием «Темпе». Это арахисовые и соевые лепешки, обросшие грибами рода *Rhizopus* и *Fusarium*. Они содержат до 40% белка и напоминают по вкусу мясо. Известно, что водные растворы «Темпе» обладают высокой тромболитической активностью (Sugimoto et al., 2007).

Важным событием в истории тромботерапии стало открытие микробного препарата стрептокиназы из гемолитического стрептококка, способного активировать пламиноген. Стрептокиназа была первым медицинским микробным препаратом, подобным физиологическим активаторам (урокиназе, тканевому активатору), который нашел применение в клинике (Brogden et al., 1973).

В 70-80 гг. XX века сотрудниками лаборатории антибиотиков и лаборатории ферментативного фибринолиза биологического факультета Московского университета впервые были получены ферментные препараты активаторы пламиногена грибного происхождения - трихолизин (триаза) и Лонголитин. Их продуценты - *Trichothecium roseum* и *Arthrobotrys longa* — являются физиологически и морфологически близкими грибами, которые могут существовать в природных условиях как сапротрофы и нематофаги (Степанова и др., 2001).

В экологическую группу хищных грибов-нематофагов объединяют грибы, способные поймать, убить и использовать в пищу микроскопических животных - нематод, в этом акте принимают участие внеклеточные протеолитические ферменты, коллагеназы и хитиназы (Yang et al., 2007, Намазов и др., 2010).

1.3.3. Триаза

Триаза (трихолизин) является препаратом-активатором пламиногена из анафорного гриба *Trichothecium roseum*, который был выделен в лаборатории антибиотиков МГУ в середине 70-х гг. XX века. Отличительной особенностью данного препарата, полученного из культуральной жидкости *T. roseum*, является его способность активировать пламиноген человека и животных в опытах *in vitro* и *in vivo* (Пленина и др., 2006).

В настоящее время известно, что трихолизин имеет широкий спектр действия. Он гидролизует фибрин, фибриноген, оказывая при этом большее сродство к фибрину, удлиняет время свертывания крови (т.е. действует как антикоагулянт), активировать пламиноген, превращая его в активный фермент плазмин (Серебрякова и др., 1977).

Первично, методом фракционирования препарата на КМ-сефадексе С-50, было получено шесть компонентов, различающихся по уровню биологической активности. Две из этих фракций обладали высокой

фибринолитической, эстеразной и низкой казеинолитической активностями (Степанова и др., 1976). В дальнейшем физико-химические исследования показали, что комплекс фибринолитических ферментов *T. roseum* представлен пятью белками с изоэлектрическими точками в широком диапазоне рН от 3,0 до 8,4. В его состав входят 17 аминокислот, преобладают нейтральные аминокислоты (глицин, серин, треонин, аланин, валин и др.). Сходство кинетических свойств отдельных ферментов суммарного препарата и его фракций с трипсином свидетельствуют о трипсиноподобной природе ферментов *T. roseum*.

Фракционирование на СФ-сефадексе С-50 дало возможность выделить индивидуальные ферменты. Было обнаружено, что одни фракции имеют более выраженные активаторные свойства, другие – фибринолитические, и все фракции обладают слабой казеинолитической и высокой эстеразной активностью. Наиболее активная фракция имела молекулярную массу 26.5 кДа с оптимумом активности при температуре 37 °С и рН 7.0 (Серебрякова и др., 1977).

Свойства триазы изучали путем моделирования тромбоза у подопытных животных - крыс, кроликов и собак. Полное или частичное растворение тромбов наблюдали в течение 3-6 часов. При этом не было отмечено токсического действия препарата. Совместное введение триазы и гепарина повышало тромболитический эффект: растворение экспериментальных тромбов ускорялось в 2-3 раза в зависимости от их величины.

В 1985 г. была разработана полупроизводственная схема получения фибринолитического препарата триазы и проведено сравнительное изучение фибринолитической активности стрептазы (стрептокиназа фирмы «Behring-Werk»), урокиназы (Ленинградский институт переливания крови) и триазы на фибриновых пластинах по методу Аструпа – Мюллерца (Astrup and Mullertz, 1952). Эти исследования показали, что активность триазы аналогична и выше, чем у препаратов стрептазы и урокиназы, применяемых в клинике для лечения тромбозов (рис. 7, Гаврилов и др., 1985).

Наилучший лечебный эффект достигался при совместном применении трихолизина и гепарина: полный лизис тромбов отмечался у 99% животных в течение 1 ч после введения препаратов, повышалось литическое действие эуглобулиновой фракции, увеличился неферментативный и ферментативный фибринолиз.

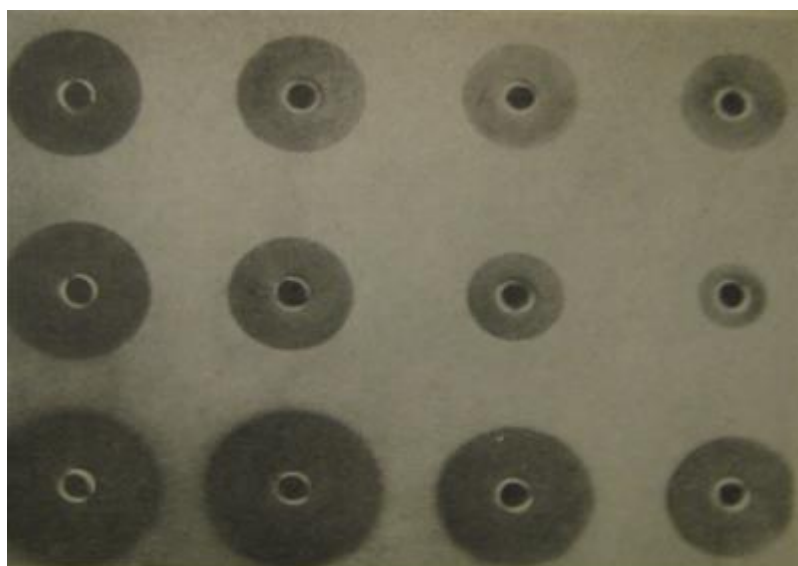


Рис. 7. Фибринолитическое действие стрептазы (верхний ряд), урокиназы (средний ряд) и триазы (нижний ряд), (Гаврилов и др., 1985).

В производственных условиях триаза была получена в Белоруссии на фирме «Диалек». Она успешно прошла клинические испытания и была рекомендована в качестве инъекционного препарата для лечения тромбозов глубоких вен и артерий (Евразийский патент № 002561, 2002).

В ходе первой фазы клинических испытаний препарат был введен 24 больным с диагнозом острого тромбоза нижних конечностей и инфаркта миокарда. Проведение тромболитической терапии не сопровождалось увеличением числа тромбоцитов и изменением значений активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). Сохранялась концентрация фибриногена и растворимых комплексов фибрин-мономера, что свидетельствовало об отсутствии в кровотоке пациента активного тромбиногенеза. Изменение фибринолитической активности проявлялось в

ускорении лизиса сгустка из эуглобулиновой фракции. При лечении у пациентов не наблюдали аллергических реакций. Отмечалась положительная динамика как у больных с тромбофлебитами (уменьшение площади уплотнения и болезненности в области тромбированных вен), так и у больных с инфарктом миокарда. Таким образом, полученные данные показывают эффективность триазы при лечении тромбозов различной этиологии (Пленина и др., 2006).

1.3.4. *Arthrobotrys longa* – продуцент препарата Лонголитин

Лонголитин является комплексным протеолитическим препаратом, полученным из культуральной жидкости почвенного микромицета *Arthrobotrys longa*.

Штамм *Arthrobotrys longa* Mecht. 1 представляет из себя несовершенный гриб-нематофаг, который был выделен из почв Новосибирской области. Со временем, при выращивании и хранении в лабораторных условиях, этот штамм утратил способность образовывать двуклетные вегетативные конидии (рис. 8) и ловчие гифы. При его культивировании на тонких гифах постоянно образуются одноклеточные микроконидии размером 3-5 мкм, которые прорастают молодыми гифами, давая начало новым мицелиальным поколениям. Это обусловило полициклический характер его развития в глубинной культуре, где постоянно присутствуют 2 фазы: споровая и мицелиальная.

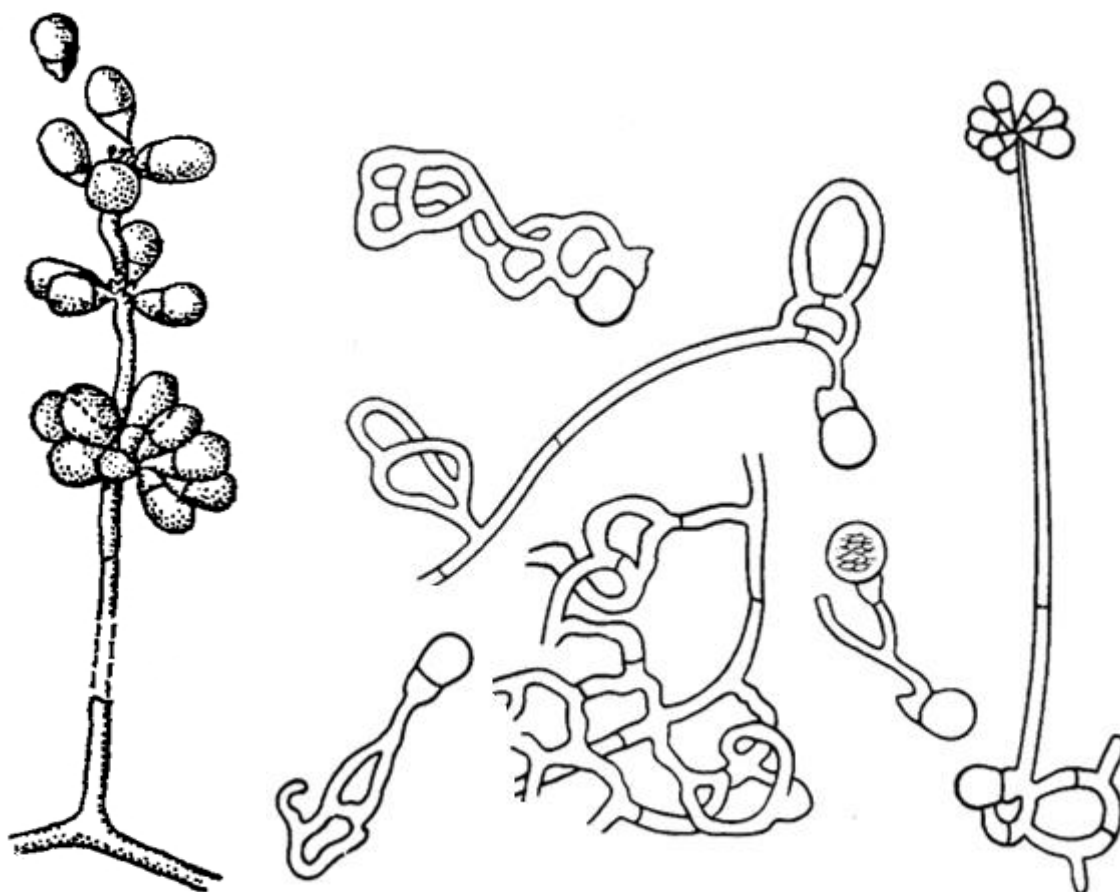


Рис. 8. Макроконидиальное спороношение и специализированные гифы для захвата и удержания нематод *A. longa* (Lopez-Llorca, 2008).

На агаризованной среде Чапека штамм *A. longa* Mecht. 1 образует широкорастающие приподнятые бесцветные пушисто-тяжистые, иногда розовеющие с возрастом, колонии с ровным краем. Обратная сторона колонии бывает с радиальными складками и слабой оранжевой пигментацией. В центре колонии обычно находится пучок вертикальных столонов (плотных пучков из более длинных и менее ветвящихся гиф). Нередко отмечается зональность колоний, обозначенная высотой мицелия и его пигментацией. Она просматривается и с обратной стороны. Также при культивировании отмечается полиморфизм колоний одного возраста (размер, структура) (Шаркова Т.С., Максимов В.Н. 1999).

1.3.4.1. Открытие препарата Лонголитин

В конце 70-х годов XX века сотрудниками лаборатории антибиотиков и лаборатории ферментативного фибринолиза была выявлена способность штамма *A. longa* Mecht. 1 образовывать в глубинной культуре фибринолитические экзоферменты с активностью активатора плазминогена, способные лизировать тромбы в опытах *in vitro* (Андреевко и др., 1981; Максимова и др., 1980).

Вскоре из культуральной жидкости был получен второй после триазы ферментативный препарат грибного происхождения с фибринолитической, тромболитической, эстеразной, небольшой протеолитической и активаторой по отношению к плазминогену активностями. Он был назван Лонголитином. Также было установлено, что Лонголитин ингибируется фенилметилсульфонилфторидом, то есть он относится к классу сериновых протеаз (Цыманович и др., 1992).

Для получения препарата экзопротеаз микромицет *A. longa* Mecht. 1 авторы выращивали в глубинной культуре на синтетической среде, оптимизированной методами математического планирования. Белки осаждали из культурального фильтрата двукратным объемом ацетона, охлажденного до -20°C .

Были изучены свойства осадка белка (табл. 3), высушенного в вакуум-эксикаторе над концентрированной серной кислотой (препарат №1), диализованного и лиофильно высушенного осадка (препарат №2), растворенного в воде белка, не подвергнутого диализу и высушиванию (препарат №3). Для характеристики препаратов определяли белок, фибринолитическую, активаторную, эстеразную и казеинолитическую активности. За единицу фибринолитической активности принимали зону лизиса в 10 мм^2 , которая образовывалась за 5 часов инкубации при 37°C при нанесении 1 мл фермента на фибриновую пластину. Удельную ФА рассчитывали на 1 мг белка.

Таблица 3.

Фибринолитическая и активаторная активность препарата Лонголитин на различных стадиях очистки ферментативного комплекса Лонголитин (Андреевко и др., 1981).

Показатели фибринолитической активности (ФА)	Условия обработки			
	Культуральная жидкость	Осаждение ацетоном при -20°C		
		Без удаления примесей (№1)	Удаление примесей без охлаждения (№2)	Удаление примесей с охлаждением (№3)
Удельная ФА, усл. ед./мг белка	541	2395	1061	4925
Активаторная активность, %	38	24	22	62

Фибринолитическая активность препарата №3 оказалась в 2.4 раза выше, чем у препаратов 1 и 2 и в 9 раз превосходила активность культуральной жидкости. Активаторная активность была в 2.5 -2.8 раз выше, и в 1.6 раз больше, чем у культуральной жидкости.

Вследствие достаточно высокой активности и удобства получения и применения в дальнейших экспериментах использовался препарат №1.

При изофокусировании Лонголитина было выявлено 6 белковых фракций, и только одна фракция оказалась фибринолитически активной. Она имела рI 3.68 – 3.74. Молекулярная масса этой фракции равнялась 28.6 ± 1.1 кДа. Фермент проявлял оптимальную активность при рН 6.0-9.0 и температуре 37°C. По действию ингибиторов фермент был предварительно отнесен к протеазам серинового типа, реализация функций которого зависит от присутствия тиоловых групп (Цыманович и др., 1992).

1.3.4.2. Фибринолитическая и антикоагулянтная активности

Лонголитина в опытах *in vitro*

В опытах *in vitro* при инкубации Лонголитина (препарат №1) с плазмой животных происходило заметное изменение всех показателей фибринолиза. Фибринолитическая активность на фибриновых пластинах и в цельной плазме возрастала соответственно в 2.0 и 1.5 раза. Количество активатора плазминогена превышало исходный уровень в 1.3 раза, а плазминовая активность - в 2.5 раза и сохранялась в течение часа (Андреевко и др., 1981; Серебрякова и др., 1985).

Рост фибринолитической активности не вызывал резкого падения концентрации фибриногена. Этот факт свидетельствовал о выраженном сродстве препарата к фибрину, основному веществу тромбов, что, к сожалению, отсутствует у таких признанных лечебных препаратов как стрептокиназа. Показатели тромбозластограммы позволили графически зарегистрировать процесс свертывания и фибринолиза и смоделировать модель *in vitro*. Результаты данного эксперимента свидетельствовали, что при инкубации плазмы с Лонголитином время свертывания удлинялось в 1.2 раза, а индекс коагуляции снижался в 1.7 раза. Это указывало на то, что Лонголитин одновременно может действовать и как фибринолитик, и как антикоагулянтный агент (Андреевко и др., 1981).

1.3.4.3. Тромболитические и антикоагулянтные свойства

Лонголитина совместно с гепарином в опытах *in vivo* при различных способах введения препарата

В настоящее время широко рассматриваются различные аспекты развития тромбозов (клинический, физиолого-биохимический, генетический, эколого-эпидемический и даже психосоциальный). Однако наиболее важным по-прежнему остается изучение самого тромбообразования на

экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo*. Это позволяет получить более полную информацию о сложных процессах формирования тромба, тромболизиса и способах воздействия на них.

Лучше всего разработаны модели экспериментального тромбоза с целью проверки препаратов для внутривенного введения. Это обусловлено тем, что немногочисленные тромболитики традиционно применяются внутривенно, но это вызывает некоторые осложнения у пациента. Однако существуют и другие способы их применения, такие как пероральный, внутрибрюшинный или внутримышечный.

Внутривенное введение Лонголитина повышало фибринолитические и активаторные свойства плазмы экспериментальных животных. Увеличение количества пламина в крови животных, получивших высокие дозы препарата, показывало способность препарата активировать плазминоген (Андреевко и др., 1981; Серебрякова и др., 1985).

При введении препарата с высокой активностью фибринолитические свойства плазмы крови превышали исходный уровень в 5 раз. У животных, получавших менее активный препарат, все показатели фибринолиза, за исключением активности активатора плазминогена, превышали исходный уровень почти в 4 раза.

В отличие от трихолизина (триазы) процесс активации протекал не мгновенно и не в течение 10-15 мин, а через 60 мин (Андреевко и др., 1981). Эти данные свидетельствуют о возможности использования препарата Лонголитин для тромболитической терапии.

Согласно рекомендациям ВОЗ, все тромболитические препараты (стрептокиназа, альтеплаза, урокиназа и др.) для профилактики ретромбозов - распространенного осложнения тромботерапии, вводятся больным совместно с гепарином. Поэтому дальнейшее изучение свойств Лонголитина проводили при совместном применении препарата с небольшими дозами гепарина.

Опыты *in vitro* и *in vivo* показали, что гепарин в сочетании с Лонголитином не только проявляет свойственную ему антикоагулянтную

активность, но и ускоряет время тромболизиса. А сам Лонголитин, кроме фибринолитического действия, обладает широким спектром антикоагулянтной активности, во-первых, снижая агрегацию тромбоцитов *in vitro* и *in vivo*, во-вторых, ингибируя гемостаз в плазме *in vivo* в присутствии гепарина (Шаркова и др., 2014).

1.3.4.4. Лонголитин — первый тромболитический препарат для наружного применения

Несомненный интерес представляет возможность использования препаратов-тромболитиков в качестве наружных средств для лечения тромбозов поверхностных и глубоких вен конечностей, которые могут осложняться инфарктом миокарда и тромбоэмболией легочной артерии. Лонголитин был впервые предложен как тромболитический препарат для лечения тромбофлебитов и флеботромбозов, благодаря его способности проникать через эпидермис и подлежащие мягкие ткани в систему микроциркуляции и системный кровоток и вызывать адекватные физиологические и биохимические реакции (Подорольская и др., 2002).

Для изучения возможности использования Лонголитина отдельно и в смеси с гепарином при наружном нанесении была разработана модель тромбоза краевой вены уха кролика (рис. 9, 10). Этот крупный выпуклый сосуд легко просматривается через тонкую прослойку хряща и эпителия.

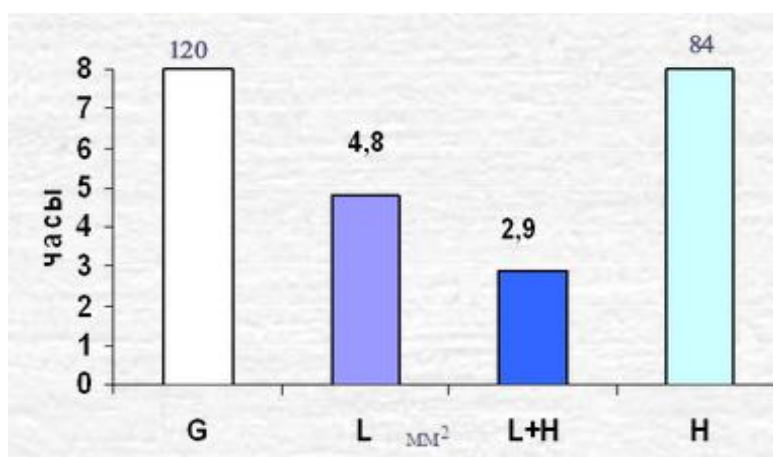


Рис. 9. Минимальное время растворения тромбов у кроликов при наружном применении Лонголитина и смеси Лонголитина с гепарином (Поддорольская и др., 2006). Обозначения: G – глицерин; L – Лонголитин; L+H – Лонголитин с гепарином; H – гепарин.

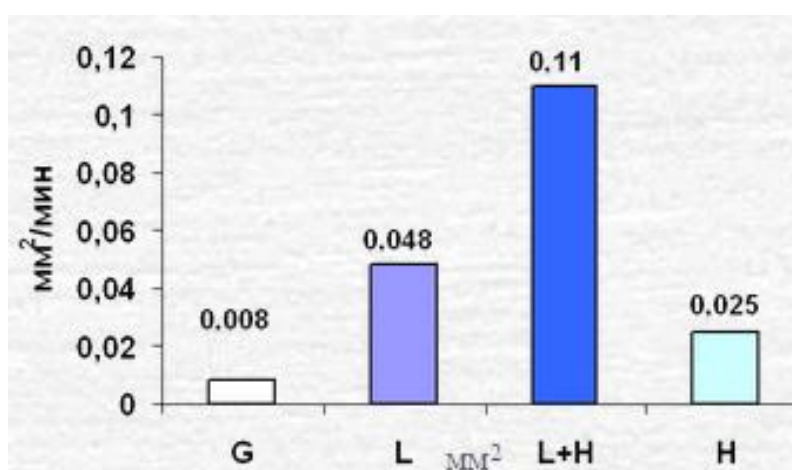


Рис. 10. Скорость растворения тромбов у кроликов при наружном применении Лонголитина и смеси Лонголитина с гепарином (Поддорольская и др., 2006). Обозначения см. рис. 9.

Исследования показали, что при наружном применении Лонголитин индивидуально или в смеси с гепарином (в сравнении с контролем – глицерином) вызывает значительное ускорение тромболизиса, действуя локально на структуры тромба, и не влияет на гемостаз. Гепарин значительно ускорял процесс растворения тромбов, но только при совместном применении его с Лонголитином. Так Лонголитин в 2 раза уменьшал время

растворения тромба и в 4-4.5 раза увеличивал скорость тромболитика. Гепарин так же потенцировал процесс, как и при стандартном внутривенном введении тромболитика.

Еще показательней были результаты в опытах с крысами (рис. 11, 12). Скорость лизиса экспериментальных тромбов, образованных в яремной вене крыс, при смазывании Лонголитином была в 13 раз выше, чем в контроле (глицерин). Совместное применение Лонголитина и гепарина увеличивало ее в 30 раз по сравнению с контрольной группой.

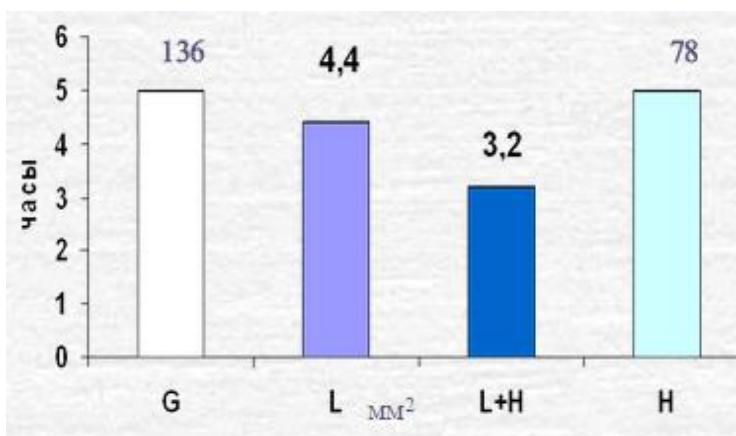


Рис. 11. Минимальное время растворения тромбов у крыс при наружном применении Лонголитина и смеси Лонголитина с гепарином (Подорольская и др., 2006). Обозначения см. рис. 9.

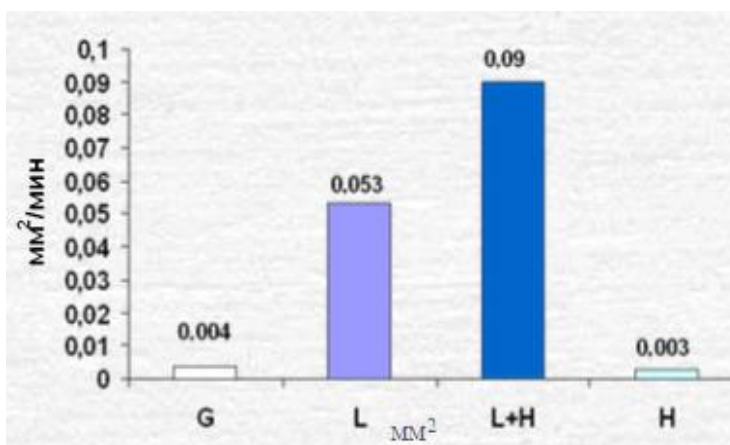


Рис. 12. Скорость растворения тромбов у крыс при наружном применении Лонголитина и смеси Лонголитина с гепарином (Подорольская и др., 2006). Обозначения см. рис. 9.

И в опытах с крысами, и в опытах с кроликами большие тромбы растворялись с большей скоростью, чем маленькие. Это, возможно, объясняется высоким сродством Лонголитина к фибрину. Большая поверхность тромба адсорбирует большее количество Лонголитина, соответственно увеличивая скорость тромболизиса.

Биохимические показатели гемостаза (содержание фибриногена, фибринолитическая активность, время рекальцификации) практически не изменялись в процессе тромболизиса как в опыте, так и в контроле. Это указывает на специфичность и селективность Лонголитина, который локально действует на структуру тромба.

На основании полученных экспериментальных данных была разработана гелевая лекарственную форма препарата для наружного применения - нетоксичная и не вызывающая аллергических реакций. Это дает возможность предположить, что практическая медицина найдет применение Лонголитину, как средству лечения тромбофлебитов и флеботромбозов (Патент РФ на изобретение № 2322232, 2007).

1.3.4.5. Возможность использования Лонголитина как профилактического тромболитического средства

В последние годы на Востоке, особенно в Китае и Японии, интенсивно изучаются протеолитические ферменты, которые продуцируются широко распространенными сапротрофными или хищными грибами и которые оказывают тромболитическое и фибринолитическое действие при необычном неинвазивном и безопасном введении – *per os* (Cha et al., 2010).

Введение Лонголитина в полость желудка и в полость рта белым крысам также продемонстрировало эффект достоверного увеличения фибринолитической и антикоагулянтной активности крови животных. Полученный эффект оказался пролонгированным, сохраняясь ещё неделю после отмены препарата и создавая в организме животных (крыс)

благоприятный противотромботический фон, в отличие от свойственного внутривенному введению торможению фибринолиза по окончании курса применения. Также различий между введением препарата в желудок и в ротовую полость не наблюдали. Это дает возможность предполагать, что Лонголитин может быть использован не только в лечебных, но и в профилактических целях (Подорольская и др., 2014).

Возможность приема фибринолитических препаратов *per os* является очень важной частью терапии тромбозов. Такое применение не решает острую проблему их устранения, но способно предотвратить её появление. Профилактика тромбозов является важной частью терапии.

Таким образом, для более детального изучения механизмов действия препарата Лонголити на процессы лизиса тромба было необходимо подробно изучить специфические активности протеаз, входящих в данный комплекс. В связи с этим мы поставили себе цель с помощью комплекса методов определить характер этих активностей и оптимизировать процесс выхода конечного препарата.

РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Объекты исследований и их культивирование

В исследованиях использовали микромицеты *Arthrobotrys longa* Mecht. 1 депонированный штамм из коллекции кафедры микробиологии МГУ имени М.В. Ломоносова и *Sarocladium strictum* 203.

Arthrobotrys longa Mecht. 1 - почвенный гриб-нематофаг, известный продуцент препарата Лонголитин.

Sarocladium strictum 203 - гриб-микофил, выделенный нами из культуры *Arthrobotrys longa* Mecht. 1 и исследованный в рамках данной работы.

Культуры выращивали в пробирках со скошенной агаризованной средой Чапека-Докса в течении 7 суток и хранили в холодильнике при 4 – 6 °С.

Среда Чапека-Докса содержала (в г/л): NaNO_3 – 3, KH_2PO_4 – 1, KCl – 0.5, MgSO_4 – 0.5, сахароза – 25, агар-агар - 30

В условиях глубинного культивирования микромицеты выращивали в два этапа в колбах на качалке (280 об/мин) при 28 °С.

Микромицеты на первом этапе переседали со скошенной среды Чапека в посевную среду и выращивали посевной мицелий (48-72 часа), на втором этапе часть биомассы (10%) переносили в ферментационную среду, в которой происходил собственно биосинтез фибринолитических ферментов (96-120 час).

Среда для биосинтеза содержала (в г/л):

K_2HPO_4 – 4.4;

NaNO_3 - 19;

KNO_3 – 2.5;

Сахароза - 40;

pH 6.5. Вода - водопроводная.

Среда для посевного мицелия была составлена из тех же компонентов, но концентрация их была уменьшена в 2 раза.

2.2. Молекулярно-генетическая идентификация микромицета

Для уточнения систематического положения, исследуемого микромицета, осуществляли молекулярно-генетическую идентификацию. Для работы брали небольшой фрагмент мицелия микромицета, выращенного на среде Чапека–Докса, и растирали с жидким азотом в стерильной керамической ступке. Выделение ДНК проводили с использованием СТАВ буфера (0.5 М NaCl, 10 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 10 мМ ЭДТА, 2% СТАВ) по стандартному протоколу экстракции (Griffith and Shaw, 1998). Для амплификации рДНК, включающей фрагмент гена 18S, внутренний транскрибируемый спейсер ITS1, ген 5.8S, внутренний транскрибируемый спейсер ITS2 и фрагмент гена 28S, были использованы универсальные праймеры ITS1 и ITS4 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG/TCCTCCGCTTATTGATATGC) с применением стандартных ПЦР-протоколов (White et al., 1990).

ПЦР проводили на готовых наборах “PCR core” компании Изоген. Режим амплификации: 96°C – 3 мин, 30 циклов: 1) 94°C – 30 с, 2) 55°C – 30 с, 3) 72°C – 30 с; 72°C – 3 мин. Хранение материала осуществлялось при 4°C. Разделение фрагментов ДНК, полученных в результате амплификации, проводили стандартным электрофорезом в 1.5%-м агарозном геле с добавлением EtBr. В качестве буферной системы использовали Трис-борат-ЭДТА-буфер (ТВЕ). После электрофореза гели анализировали в УФ-свете. Ампликон экстрагировали из геля с помощью набора CleanUp компании “Евроген”. Секвенирование последовательностей ДНК проведено компанией “Евроген”. Секвенировали с использованием набора реактивов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, США) на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 × 1 (Applied Biosystems, CA, США). Полученные последовательности нуклеотидов использовали для поиска соответствия в GenBank для видового определения с использованием программы BLASTn.

2.3. Определение гидролитического потенциала микромицета

Для выявления гидролитического потенциала микромицета *S. strictum* были использованы среды следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 0,5, MgSO_4 – 0.25, пептон – 5.0, казеинат натрия/ желатин/ крахмал/ целлюлоза/ эластин – 10.0, агар – 15.0. Посев был произведен уколом в центр чашки, измерения диаметров зон гидролиза и колоний проводили через 7 суток. Энзиматический индекс (EI) рассчитывали по следующей формуле: $\text{EI} = (\text{D} + \text{d}) / \text{D}$, где D – диаметр колонии в мм, а d – диаметр зоны гидролиза в мм.

2.4. Изучение биоритмов микромицетов в глубинной культуре

Данный метод позволяет обнаружить полицикличность образования продуктивного мицелия в культурах высокоактивных продуцентов (Беккер, 1978). Для изучения биоритмов каждые 24 часа производили отбор проб.

В отобранных пробах измеряли целевую активность, биомассу и рассчитывали удельную скорость роста.

2.4.1. Определение биомассы

Биомассу, отделенную от культуральной жидкости центрифугированием (6000 об/мин, 20 мин), несколько раз промывали физиологическим раствором, повторно центрифугировали в тех же условиях, переносили в керамические тигли и высушивали до постоянного веса при температуре 86 °С. Вес сухой биомассы определяли по формуле:

$$M = [(A - B) \times 1000] / V,$$

где M – вес сухой биомассы (г/л), A – вес тигля с осадком (г), B – вес тигля без осадка (г), V – объем культуральной жидкости (мл), взятой для центрифугирования.

2.4.2. Расчет удельных скоростей роста и синтеза ферментов

Удельную скорость роста микромицета (г/ч) вычисляли по формуле Иерусалимского:

$$\mu = (\ln M_1 - \ln M_0) / (t_1 - t_0),$$

где M – вес биомассы в определенный период времени t (Иерусалимский, 1963).

Удельную скорость синтеза протеаз рассчитывали по формуле (Ландау и др., 2000):

$$E = (\Delta E \times x) / \Delta t,$$

где x – биомасса (г/мл), ΔE – прирост активности (ед./мл) за промежуток времени Δt (ч).

2.5. Световая и электронная микроскопия

Для подтверждения полицикличности каждой культуры и сопоставления ее морфологического состояния с динамикой накопления протеолитических ферментов осуществляли микроскопический контроль с помощью препаратов «раздавленная капля».

Микроморфологию микромицета изучали с помощью световой микроскопии при увеличении $\times 40$, $\times 100$. Для этого объект выращивали на овсянном агаре, а затем отобранные ежесуточные пробы прижизненно окрашивали красителем нейтраль-рот (1:2000).

Для детального ознакомления со строением гиф и конидий была проведена электронная микроскопия на микроскопе JSM-6380LA (Thermo Fisher Scientific, США). Для этого вырезали фрагмент агаризованной среды с участком колонии и фиксировали в 2.5% глутаровом альдегиде на фосфатном буфере pH 7.5-7.6 в течении 1 часа. Затем фиксированный образец отмывали в буфере и в дистиллированной воде 2 раза по 10 минут. Для дегидратации образец проводили через ряд растворов с постепенно повышающейся концентрацией этанола (30, 50, 70, 96 %) и выдерживали в каждом по 20 минут. Затем проводили замещение этанола на ацетон путем проведения

через растворы (этанол:ацетон): 2:1, 1:1, 1:2, после чего образец помещали в ацетон, а затем высушивали. Микроскопию проводили на микроскопе JSM-6380LA (JEOL Ltd., Япония) в Лаборатории электронной микроскопии ЦКП МГУ имени М.В. Ломоносова.

2.6. Получение ферментного комплекса из культуральной жидкости микромицетов

Для получения ферментного комплекса культуральную жидкость микромицета отделяли от мицелия центрифугированием при 15000 об/мин в течение 15 мин при +4 °С. Осаждение белков из культуральной жидкости проводили двукратным объемом ацетона, охлажденным до -20 °С. Полученную смесь держали 1 час при +4 °С до выпадения осадка, а затем фильтровали. Отфильтрованный гомогенный осадок высушивали над серной кислотой в вакуум-эксикаторе в течение 3 суток.

Полученный препарат представлял собой гомогенный порошок желтовато-белого цвета без запаха, хорошо растворимый в воде.

2.7. Определение фибринолитической и активаторной к плазминогену активности методом фибриновых пластин

Фибринолитическую и активаторную по отношению к плазминогену активность определяли на фибриновых пластинках по методу Аструпа – Мюллерца – Лассена (Astrup and Mullertz, 1952; Lassen, 1952). Для приготовления фибриновых пластин смешивали 900 мкл 3% раствора бычьего фибриногена в физиологическом растворе (0.5 М NaCl), добавляли 200 мкл раствора тромбина (2 мг/мл физ. раствора), аккуратно перемешивали и переносили раствор в чашки Петри (d = 9 см).

Образование фибринового геля происходило при комнатной температуре в чашках с открытыми крышками. Уплотнение геля продолжалось в таких условиях в течение 1 - 3 часов. После этого часть

чашек с закрытыми крышками прогревали при температуре 86 °С 30 минут, тем самым инактивируя плазминоген.

Прогретые и непрогретые чашки с фибриновыми пластинами хранили в холодильнике с вложенными под крышки бумажными фильтрами, для предохранения геля от действия капель конденсата.

Для измерения фибринолитической (ФЛ) и активаторной к плазминогену активности (АА) на пластины наносили по 30 мкл пробы и помещали чашки в термостат на 4 часа (рис. 13). По истечении указанного времени на пластинах измеряли площадь зоны лизиса в мм². Разность в размерах зон на непрогретых и прогретых чашках служила показателем способности фермента не только к прямой фибринолитической активности, но и его способности активировать плазминоген. Для дальнейшего использования полученных результатов данные выражали в усл. ед./мл. За 1 усл. ед. принимали количество фермента, вызывающего зону гидролиза фибриновой пластины в 1 мм².

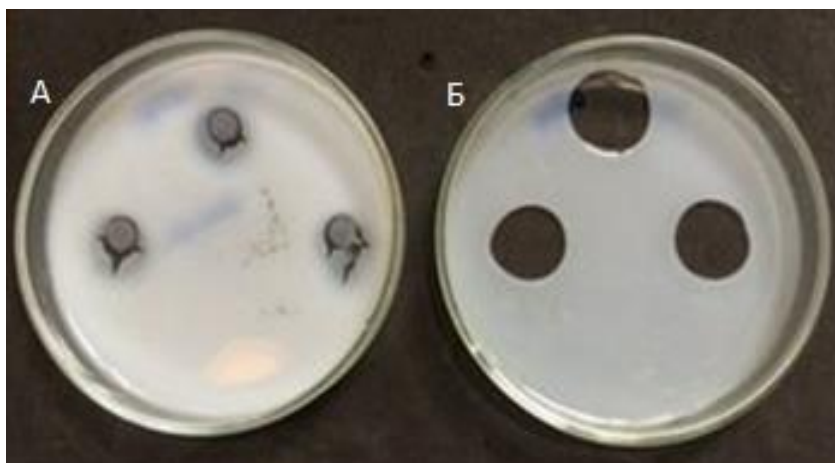


Рис. 13. Фибриновые пластины: А – прогретая; Б – непрогретая.

2.8. Определение общей протеолитической активности

Общую протеолитическую активность определяли модифицированным методом Ансона – Хагихары (Anson, 1935; Hagihara et al., 1958). Суть

данного метода состоит в том, что в ходе ферментативного гидролиза происходит отщепление тирозина от молекулы казеина, а оставшийся непрореагировавший белок в дальнейшем осаждается ТХУ. После центрифугирования полученной реакционной смеси, определяют количество отщепившегося тирозина.

Для определения активности препарата и полученных фракций брали 200 мкл пробы и добавляли 400 мкл 1 % - ого раствора казеина по Хаммерштайну в 0.1 М Трис-НСl буфере с рН 8.2. Реакционную смесь выдерживали в термошейкере BioSan TS-100 («Biosan», Латвия) при температуре $37 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ в течении 10 минут. После чего реакцию останавливали добавлением 600 мкл 10% раствора ТХУ. Полученную реакционную смесь выдерживали 10 минут при комнатной температуре для формирования осадка, после чего центрифугировали в центрифуге BioSan Microspin 12 («Biosan», Латвия) в течение 10 минут при 14 000 об/мин. Затем отбирали супернатант и определяли количество отщепившегося тирозина на спектрофотометре Eppendorf BioSpectrometer® («Eppendorf», Германия) при длине волны 275 нм. Активность выражали в мкмоль тирозина, образующегося в инкубационной смеси за 1 минуту в расчете на 1 мл пробы (Осмоловский и др., 2016).

Для расчета строили калибровочную кривую по тирозину для дальнейшего определения его в пробе. Определение проводили в интервале 0.2-1 мкмоль Туг/мл.

2.9. Электрофоретические методы

2.9.1. Изоэлектрофокусирование

Для разделения белков, входящих в препарат, использовали изоэлектрофокусирование (ИЭФ) по методу Вестерберга (Vesterberg, 1972).

ИЭФ проводили при 4 °С в широком градиенте рН амфолинов (рН 3.0 – 10.0) и градиенте сахарозы 0-40 % в колонке объемом 110 мл фирмы LKB (Швеция) при напряжении 800В в течение 36 часов.

После ИЭФ содержимое колонки с помощью коллектора фракций собирали по фракциям объемом 1.5 – 2 мл на холоду.

В полученных фракциях измеряли рН, содержание белка, общую протеолитическую активность и активность с хромогенными пептидными субстратами.

2.9.2. Денатурирующий электрофорез белков в полиакриламидном геле

Денатурирующий электрофорез белков проводили в 10%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия по методу Лэммли (Laemmly, 1970) при силе тока в 100 мА. Для определения молекулярной массы фермента использовали набор метчиков Unstained Protein Molecular Weight Marker («Thermoscientific», USA).

Фиксацию проводили в растворе (на 100 мл) уксусной кислоты (10 мл) и изопропанола (30 мл) в дистиллированной воде в течении 30 минут.

Окрашивание проводили в растворе Кумасси R-250 (0,25 г) в уксусной кислоте (25 мл) и изопропанола (125 мл) в дистиллированной воде (100 мл) в течение 35 минут.

Гель отмывали в 7% растворе уксусной кислоты.

2.9.3. Нативный электрофорез белков в полиакриламидном геле

Нативный электрофорез белков в ПААГ проводили по методу Дэвиса в Трис-глициновом буфере, рН 8.3 (Davis, 1964) с концентрацией акриламида в верхнем геле 6,0% и в нижнем – 7,5%. Разделение белков проводили при силе тока 50 мА. Прокраску геля осуществляли 0,08% раствором Кумасси

бриллиантового голубого G-250 в 3,5% хлорной кислоте (Holbrook and Leaver, 1976) в течение 40 мин. Для отмывки геля от красителя использовали 7%-ную уксусную кислоту.

2.10. Определение белка

2.10.1. Определение количества белка методом Бредфорд

Определение концентрации белка в культуральной жидкости определяли методом Бредфорд (Bradford, 1976; Holbrook, 1976). Для этого к 50 мкл пробы добавляли 950 мкл реактива Кумасси (Coomassie Brilliant Blue G-250) и измеряли оптическую плотность при длине волны 595 нм.

Для приготовления реактива Кумасси 10 мг красителя G-250 растворяли в 50 мл этанола, добавляли 10 мл фосфорной кислоты, затем доводили до 100 мл и фильтровали полученный раствор.

2.10.2. Спектрофотометрическое определение количества белка

Концентрацию белка во фракциях, полученных после изоэлектрофокусирования определяли на основе поглощения исследуемого раствора при A_{280} нм на спектрофотометре Eppendorf BioSpectrometer® («Eppendorf», Германия). Такое прямое определение концентрации белка путем измерения оптической плотности при 280 нм основано на наличие в белке остатков тирозина и триптофана. Единица оптической плотности соответствует концентрации белка 1 мг/мл (Gertler and Trop, 1971).

2.10.3. Определение количества белка с помощью бицинхониновой кислоты

Метод основан на биуретовой реакции и выявляет только наличие пептидных связей (Redinbaugh et al., 1986). В щелочной среде происходит восстановление белком Cu^{2+} до Cu^{+} , что сопровождается образованием

комплекса с двумя молекулами бицинхониновой кислоты (БХК), который окрашен в пурпурный цвет.

Использовали следующие растворы.

Раствор А: последовательно растворяют в 50 мл дистиллированной воды: 1,0 г бицинхониновой кислоты; 2,0 г $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times \text{H}_2\text{O}$; 0,16 г тартрата натрия; 0,4 г NaOH; 0,95 г NaHCO_3 . Доводят объём до 100 мл и устанавливают pH 11,25 с помощью 1 М NaOH.

Раствор Б: 1,0 г $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ растворяют в дистиллированной воде до 25 мл.

Раствор В: смешивают растворы А и Б в соотношении 50:1 по объёму.

Раствор А и Б хранят при комнатной температуре, раствор В готовят непосредственно перед его использованием.

Для проведения анализа содержания белка в пробах с различными разведениями препаратов смешивали 50 мкл пробы и 950 мкл раствора В. Далее смесь инкубировали 30 минут при 37 °С и измеряли поглощение при 562 нм относительно раствора, не содержащего белка на спектрофотометре Eppendorf BioSpectrometer® («Eppendorf», Германия).

2.11. Определение активности протеаз с хромогенными пептидными субстратами

Активность препарата и послефокусировочных фракций определяли по гидролизу хромогенных пептидных субстратов (ХПС), имеющих в качестве хромофора *n*-нитроанилидную группу (-pNA) (Осмоловский, 2014).

Тромбиноподобную и плазминоподобную активность определяли с субстратами Tos-Gly-Pro-Arg-pNA (Chromozym TH) и H-D-Val-Leu-Lys-pNA (S-2251), соответственно, урокиназную и тканевого активатора с субстратами

pGlu-Gly-Arg-pNA (S-2444) и H-D-Ile-Pro-Arg-pNA (S-2288). Также использовали субстрат Ха фактора Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA (S-2765).

Для проведения реакции смешивали 100 мкл пробы, 150 мкл 0,05М Трис-HCl-буфера, pH 8.2 и 100 мкл 0,05%-ного раствора соответствующего субстрата. Смесь инкубировали в течение 5 мин при 37°C, после чего реакцию останавливали добавлением 200 мкл 50%-ной уксусной кислоты. Измерение оптической плотности проводили при 405 нм на спектрофотометре Eppendorf BioSpectrometer® («Eppendorf», Германия). За единицу активности (Е) во всех случаях принимали количество мкмоль отщепившегося *n*-нитроанилина за 1 мин.

2.12. Определение фибринолитической и фибриногенолитической активности

Фибринолитическую активность препаратов (и их фракций) определяли с использованием 1% раствора бычьего фибрина. Реакцию проводили с 200 мкл пробы и 400 мкл фибрина (Осмоловский и др., 2017). Инкубировали 30 мин при 37 °С, после чего останавливали реакцию 600 мкл 10% ТХУ. Полученные пробы центрифугировали и измеряли оптическую плотность при 275 нм на спектрофотометре Eppendorf BioSpectrometer® («Eppendorf», Германия).

Фибриногенолитическую активность измеряли тем же методом с использованием бычьего фибриногена.

За единицу активности принимали количество отщепившегося тирозина (μмоль) в 1 мл пробы за 1 минуту.

2.13. Тромболизис

Для приготовления тромбов в предварительно взвешенных эппендорфах смешивали 200 мкл плазмы и 20 мкл 0.1% тромбина и оставляли на 30 минут

при 37°C, после чего повторно взвешивали со стабилизированным тромбом. Затем добавляли 250 мкл пробы и инкубировали в термошейкере про 250 об/мин при 37°C 30, 60 и 90 минут. Наблюдали частичное разжижение тромба и отделение его от стенок эппендорфа. Лизат аккуратно убирали при помощи фильтровальной бумаги и взвешивали сухой остаток вместе с эппендорфом. Эффективность расщепления тромба определяли измерением разницы масс между исходным тромбом и остаточным. Полученные результаты отображали в % остаточного тромба.

2.14. Ингибиторный анализ

Для изучения воздействия ингибиторов на активность протеаз, образуемых *A. longa* и *S. strictum*, использовали следующие соединения:

- ингибиторы металлопротеаз - этилендиаминтетраацетат (ЭДТА, 1.1 мг/мл) и о-фенантролин (0.5 мг/мл)
- ингибитор цистеиновых протеаз – п-хлормеркурийбензоат (п-ХМБ, 0.5 мг/мл)
- ингибитор сериновых протеаз – фенилметилсульфонил фторид (PMSF, 0.3 мг/мл)
- ингибитор химотрипсиноподобных протеаз – тозилфенилаланилхлорметилкетон (TPCK, 0.4 мг/мл)
- ингибитор трипсиноподобных протеаз – тозиллизилаланилхлорметилкетон (TLCK, 0.4 мг/мл)
- соевый ингибитор трипсина (1.1 мг/мл)

Было исследовано действие ингибиторов в молярном соотношении фермент : ингибитор 1:10 и 1:100 (Крейер и др., 1983). Начальную и остаточную активность, по отношению к урокиназному ХПС, фермента определяли при 37°C после его преинкубации с ингибитором в течение 120 мин при 25°C, как описано выше, и выражали в процентах от контроля (без ингибитора).

Также был изучен ингибиторный и активаторный эффект по отношению к полученным протеазам со следующими соединениями: ϵ -аминокапроат; аскорбат; гепарин.

2.15. Измерение рН-стабильности и рН-оптимума ферментов

Для измерения рН-стабильности и оптимума работы ферментов использовали набор буферов с соответствующими рН: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и 11.

Для определения рН-стабильности брали 100 мкл пробы и 150 мкл буфера и инкубировали 3 часа при 25 °С. Затем добавляли 100 мкл урокиназного хромогенного субстрата и инкубировали еще 5 минут при 37 °С. Реакцию останавливали 200 мкл уксусной кислоты и измеряли поглощение на спектрофотометре при 405 нм.

Для определения рН оптимума брали 100 мкл пробы, 150 мкл буфера и 100 мкл урокиназного хромогенного субстрата и инкубировали 5 минут при 37 °С. Затем добавляли 200 мкл уксусной кислоты и измеряли на спектрофотометре при 405 нм.

2.16. Измерение термостабильности и температурного оптимума работы ферментов

Для измерения термостабильности фермента брали 50 мкл пробы и 200 мкл буфера и инкубировали полученную реакционную смесь при 25, 30, 37, 45, 55 и 65 °С 3 часа. Затем добавляли 100 мкл урокиназного хромогенного субстрата и инкубировали 5 минут при 37°С. Реакцию останавливали добавлением 200 мкл уксусной кислоты.

Для измерения температурного оптимума работы брали 50 мкл пробы, 200 мкл буфера и 100 мкл урокиназного хромогенного субстрата и инкубировали 5 минут при соответствующей температуре. Затем добавляли 200 мкл уксусной кислоты и измеряли поглощение на спектрофотометре при 405 нм.

2.17. Определение гликопротеинового компонента с ШИК– реактивом методом дот-блоттинга

Для выявления содержания углеводного компонента выделенных протеаз проводили качественную реакцию на определение гликопротеинов с помощью периодной кислоты и реактива Шиффа (фуксинсернистой кислоты) методом дот-блоттинга на нитроцеллюлозных мембранах (Thronton et al., 1996).

Использовали следующие реактивы:

1. Окисляющий реактив (А): 1% HIO_4 в 3% уксусной кислоте;
2. Восстанавливающий реактив (В): 0.1% $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ в 10 ммоль HCl ;
3. Реактив Шиффа: 0.2 г фуксина + 200 мл $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист}}$ (40°C) + 2 г NaHSO_3 + 2 мл $\text{HCl}_{\text{конц}}$. Полученный раствор перемешивали в течение 25-30 мин и обесцвечивали активированным углем, затем фильтровали через стеклянный фильтр.

Для проведения эксперимента проводили подготовку нитроцеллюлозной мембраны, промывая ее в дистиллированной воде в течении 5 минут с последующим высушиванием на фильтровальной бумаге. Далее наносили образцы объемом 5 – 10 мкл по каплям и сушили на воздухе.

Мембраны с образцами инкубировали 30 минут в реактиве А, затем промывали $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист}}$ по 5 минут 2 раза. Далее промывали в реактиве В также по 5 мин 2 раза. Инкубировали 15 минут в реактиве Шиффа и промывали реактивом В по 5 минут 2 раза. Отмытые мембраны сушили на воздухе.

В качестве положительного контроля использовали инвертазу дрожжей, а в качестве отрицательного – бычий сывороточный альбумин (БСА).

2.18. Хранение препаратов протеаз микромицетов

Высушенные над серной кислотой и расфасованные по эппендорфам препараты – сырцы были заложены на хранение при различных температурах (-80 , -20 , $+4$, $+25$, $+37^\circ\text{C}$) на разные временные интервалы (неделя, месяц, 3 месяца, 6 месяцев, 9 месяцев, 1 год). Затем препараты растворяли в 0,05М

Трис-НСI-буфера, рН 8.2. Для оценки стабильности препаратов проводили определение следующих параметров:

1. Содержание белка при A_{280}
2. Урокиназную активность с ХПС
3. Фибринолитическую и активаторную активность методом фибриновых пластин

Исходная концентрация препаратов составляла 20 мг/мл.

2.19. Определение фармацевтических характеристик комплексного препарата

2.19.1. Определение микробиологической чистоты препарата

Для определения общего числа аэробных микроорганизмов в образцах крема осуществляли посев на агаризованные среды по методике, описанной в ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота»³ (Государственная фармакопея РФ).

Количественное определение аэробных микроорганизмов осуществляли поверхностным чашечным методом (для грибов использовали среду Сабуро с глюкозой, для бактерий – агаризованную питательную среду на основе гидролизата рыбной муки). Посевы инкубировали при 32°C (для выявления бактерий) и при 28°C (для выявления грибов). Промежуточные результаты отмечали ежедневно, окончательный результат был зафиксирован по прошествии 5 суток культивирования.

Для определения общего числа аэробных микроорганизмов, дрожжевых и плесневых грибов в 1 г субстанции использовали 1 г образца.

2.19.2. Идентификация препарата

Для идентификации препарата использовали абсорбционную спектрофотометрию в ультрафиолетовой области спектра на

³ Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 1. ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота».: <https://docs.ruclm.ru/feml/pharma/v14/vol1/1135/>.

спектрофотометре Eppendorf BioSpectrometer® («Eppendorf», Германия). Снятие спектра поглощения раствора препарата осуществляли в концентрации 5 мг/мл (в H₂O_{дист.}) при 20°C в кювете с толщиной 1 см в интервале длин волн от 250 до 320 нм. Раствором контроля выступала H₂O_{дист.}

Определение подлинности препарата проводили путём сравнения положения максимумов, минимумов, плеч и точек перегиба спектра поглощения исследуемого раствора.

2.20. Обработка результатов и статистика

Все представленные эксперименты проводили в трех повторностях, полученные данные рассчитаны с учетом стандартного отклонения и средним арифметическим значением. Обработку данных проводили в программе Microsoft Excel.

2.21. Опыты *in vivo*

2.21.1. Определение острой токсичности препарата

Определение острой токсичности проводили на крысах линии Вистар (возраст 10 недель, вес самцов 190-220 г, вес самок 180-200 г) и мышах C57Bl/6 (возраст 8 недель, вес 20-22 г) обоих полов. Исследование проводили в соответствии с принципами Хельсинкской декларации и по протоколу Комитета по биоэтике Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (протокол 16-1 от 14.05.2021).

Острую токсичность оценивали при внутрибрюшинном (ip) и внутривенном (iv) введении мышам C57Bl/6 обоих полов и крысам линии Вистар обоих полов.

Для внутривенного введения использовали 40 мышей и 40 крыс.

Мышей разделили на 4 группы по 10 животных в каждой и вводили препарат (в физрастворе), в дальнейшем фармацевтическая субстанция, в

боковую хвостовую вену в объеме 1 мл/кг. Первой группе препарат вводили в дозе 0.551 мг/кг, второй в дозе 1.102 мг/кг, третьей - в дозе 2.204 мг/кг и четвертой - в дозе 4.408 мг/кг.

Крыс разделили на 4 группы по 10 животных в каждой.

Всем животным вводили ФС в боковую хвостовую вену в объеме 1 мл/кг. Первой группе вводили в дозе 0.2755 мг/кг, второй - в дозе 0.551 мг/кг, третьей - в дозе 1.102 мг/кг. Четвертой группе вводили вещество в дозе 2.204 мг/кг.

Для введения ip использовали 40 мышей. Животных разделили на 4 группы по 10 животных в каждой, и каждое животное получало инъекцию ФС внутривенно в объеме 1 мл/кг. Первая группа получала инъекцию в дозе 0.551 мг/кг. Вторая группа получала инъекцию в дозе 1.102 мг/кг. Третья группа получала инъекцию в дозе 2.204 мг/кг. Четвертая группа получала инъекцию в дозе 4.408 мг/кг.

После внутривенного и внутривенного введения вещества за животными наблюдали в течение 14 дней. По истечении этого срока все животные были умерщвлены и проведено диагностическое вскрытие.

Непосредственно после введения препарата за животными непрерывно наблюдали в течение часа (регистрировались видимые отклонения от нормального поведения, признаки переносимой боли и дискомфорта), затем по 5 мин каждый час в течение восьми часов регистрировали признаки проявления интоксикации.

В последующие 13 дней животных осматривали ежедневно два раза в день.

В ходе исследования регистрировали следующие параметры: гибель животных — ежедневно в течение всего периода наблюдения; результаты визуального осмотра животных (ежедневно); результаты осмотра с элементами неврологического тестирования (не реже 1 раза в неделю); вес животных (не реже 1 раза в неделю); потребление пищи и воды (не реже 1

раза в неделю); макроскопическое исследование внутренних органов и гистологическое исследование органов с внешними патологиями в конце опыта.

Параметры общего состояния животных регистрировали визуально не реже одного раза в неделю.

Изучали следующие параметры: активность в клетке, наличие/отсутствие тремора, внешний вид животных (состояние шерсти, кожи, слизистых оболочек, доступных для наблюдения), параметры индивидуального эмоционального статуса (реакция на переезд в новую среду, прикосновение, наличие мочи, дефекация при осмотре), эмоциональное напряжение в клетке, простые рефлексy (вздрагивание, поворот, роговица, ухо). Вес животных и потребление воды и пищи регистрировали не реже одного раза в неделю.

Во время вскрытия исследовали: мышечную систему, внутренние поверхности, полость черепа и поверхность мозга, шею с органами и тканями, грудную, брюшную и тазовую полости с органами и тканями в них. Все отклонения от нормы были полностью описаны и задокументированы.

2.21.2. Определение аллергенности препарата

Определение аллергенности проводили на крысах линии Вистар (возраст 8-10 недель, масса самцов 190-220 г, масса самок 180-200 г) обоих полов; мышах линии СВА (возраст 6-8 недель, масса 20-22 г) обоих полов; мышах CD1 (возраст 6-8 недель, масса 20-22 г) обоих полов; кроликов породы советская шиншилла (2-2.2 кг) обоего пола. Исследование проводили в соответствии с руководящими принципами Хельсинкской декларации и одобрено Комитетом по биоэтике Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (протокол 16-1 от 14.05.2021).

Аллергенность фармацевтической субстанции изучали в четырех отдельных тестах на аллергенность: (1) активная кожная анафилаксия у

мышей; (2) тест на активную системную анафилаксию у крыс; (3) воспалительная реакция у мышей, вызванная конканавалином А; (4) конъюнктивальный тест у кроликов.

2.21.2.1. Активная кожная анафилаксия у мышей

Было проведено разделение животных на группы. В первую группу вошли 10 мышей CD1 (5 самцов и 5 самок), получавших инъекции физиологического раствора. Вторая группа включала 10 мышей CD1 (5 самцов и 5 самок), получавших инъекции препарата в физиологическом растворе, которое вводили в дозе 24 мг/кг. В третью группу вошли 10 мышей CD1 (5 самцов и 5 самок), получавших инъекции вещества, которое вводили в дозе 240 мг/кг.

Первую инъекцию проводили подкожно, вторую и третью инъекции проводили внутримышечно в четырехглавую мышцу бедра (0.2 мл/кг).

Тест на активную кожную анафилаксию проводили на 14-й день после последней инъекции вещества (Shimada et al., 2004; Makino et al., 2014).

На последний 14-й день мышам вводили вещество внутрикожно (20 мкл, 1 мг/кг и 10 мг/кг); тот же объем физиологического раствора вводили внутрикожно в другой участок кожи.

Для оценки реакции через 20 мин после внутрикожной инъекции животным внутривенно вводили раствор Эванса (голубой) (1%, 0.2 мл/кг). Средний диаметр и интенсивность 'вороненого' поражения вокруг мест инъекций оценивали через 30 минут.

2.21.2.2. Активный системный тест на анафилаксию у крыс

Крыс разделили поровну на три группы по 10 животных (5 самцов и 5 самок) в каждой группе и обрабатывали следующим образом: крысам первой группы вводили подкожно физиологический раствор в течение трех дней, второй и третьей группам вводили раствор овальбумина (0.012 мг/кг) в течение трех дней для стимуляции аллергической реакции.

На 12-й день после последней инъекции овальбумина крысам первой группы вводили внутривенно физиологический раствор (1 мл/кг) в течение четырех дней, второй группе вводили раствор вещества (12 мг/кг, 1 мл/кг) в течение четырех дней, третьей группе вводили физиологический раствор (120 мг/кг, 1 мл/кг) в течение четырех дней (Demidova et al., 2007; Danilets et al., 2008).

На 15-й день, через час после введения вещества, всем животным вводили раствор овальбумина (0.036 мг/кг). Через тридцать минут после инъекции овальбумина животных подвергали эвтаназии (вдыхание CO₂) и определяли вес их тонкой кишки. Затем тонкую кишку высушивали и снова определяли вес. Степень развития анафилаксии оценивали по выраженности отека тонкой кишки (по изменению общего содержания в ней воды путем высушивания до постоянной массы).

2.21.2.3. Воспалительная реакция у мышей, вызванная конканавалином

А

Мышей линии СВА разделили на три группы. В первую группу вошли 10 мышей (5 самцов и 5 самок), получавших подкожную инъекцию физиологического раствора. Во вторую группу вошли 10 мышей (5 самцов и 5 самок), получавших инъекцию вещества, которое вводили в дозе 24 мг/кг массы тела (0.2 мл). В третью группу вошли 10 мышей (5 самцов и 5 самок), получавших инъекцию вещества, которое вводили в дозе 240 мг/кг (0.2 мл).

Через час после введения вещества всем животным вводили раствор конканавалина А (20 мкл, 5 мг/мл) в подушечку левой задней лапы. Правая задняя лапа получила тот же объем физиологического раствора.

Через 1 час после инъекции конканавалина А животных умерщвляли (вводили CO₂), и определяли массу обеих лапок.

Индекс реакции рассчитывали по следующей формуле:

$$Ri = (W_{exp} - W_{cont}) / W_{exp} \times 100\%,$$

где R_i — индекс реакции, W_{exp} — вес экспериментальной лапы, W_{cont} — вес контрольной лапы.

2.21.2.4. Конъюнктивальный тест на кроликах

Кроликов породы советская шиншилла (2-2.2 кг) обоего пола разделили на две равные группы по 6 животных (3 самца и 3 самки) в каждой группе и обрабатывали следующим образом: кроликам первой группы подкожно вводили физиологический раствор в течение пяти дней, животным второй группы обрабатывали исследуемой фармацевтической субстанцией (0.5 мл, 6.5 мг / кг массы тела) в течение пяти дней.

Через четырнадцать дней после последнего введения вещества всех животных обрабатывали следующим образом: 1 каплю вещества (100 мг/мл) закапывали в левый глаз (в конъюнктивальный мешок), 1 каплю изотонического раствора хлорида натрия закапывали в правый глаз (в конъюнктивальный мешок).

Было проверено состояние склеры, роговицы и век. Реакцию определяли через 15 минут (быстрая реакция), 24 и 48 часов в соответствии со шкалой оценки офтальмологических показателей (Draize et al., 1944).

2.21.3. Определение иммунотоксичности препарата

Определение иммунотоксичности проводили на (C57Bl/6xDBA) мышах F1 (возраст 6-8 недель, вес 20-22 г). Исследование проводилось в соответствии с руководящими принципами Хельсинкской декларации и одобрено Комитетом по биоэтике Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (протокол 16-1 от 14.05.2021).

В рамках этой задачи были проведены три следующих эксперимента: (1) тест на гиперчувствительность замедленного типа; (2) Т-клеточно-зависимый тест; (3) фагоцитарная активность перитонеальных макрофагов. Для всех трех тестов использовали 90 мышей (по 30 мышей на тест).

Мышей разделили на три группы. В первую группу вошли 30 (15 самцов и 15 самок) мышей, получавших подкожную инъекцию физиологического раствора. Во вторую группу вошли 30 мышей (15 самцов и 15 самок), получавших инъекции фармацевтической субстанции, которую вводили в дозе 20 мг/кг массы тела (0.2 мл). В третью группу вошли 30 мышей (15 самцов и 15 самок), получавших инъекции фармацевтической субстанции, которую вводили в дозе 200 мг/кг (0.2 мл).

Вещество вводили подкожно ежедневно в течение пяти дней, после чего проводили следующие тесты.

2.21.3.1. Оценка клеточного иммунитета в тесте на гиперчувствительность замедленного типа

Для проведения теста на гиперчувствительность замедленного типа 30 мышам (5 самцам и 5 самкам из каждой группы) вводили раствор эритроцитов овец (SRBC) (5×10^7 SRBC на животное, 0.2 мл) подкожно у основания хвоста. Через 5 дней животным вводили SRBC (5×10^7 SRBC на животное, 50 мкл) в подушечку левой задней лапы. Правая задняя лапа получила тот же объем физиологического раствора.

Через 24 ч после инъекции животных подвергали эвтаназии (вдыханию CO_2) и определяли вес их лап. Индекс реакции рассчитывали таким же образом, как показано выше.

2.21.3.2. Оценка гуморального иммунитета в Т-клеточно-зависимом тесте

Для проведения теста, зависящего от Т-клеток, 30 мышам (5 самцам и 5 самкам из каждой группы) вводили SRBC внутрибрюшинно (5×10^7 SRBC на животное, 0.5 мл).

Через 5 дней после иммунизации мышей подвергали эвтаназии (вдыхание CO_2), оценивали и взвешивали селезенку, оценивали состояние иммунной системы, определяли количество антител-продуцирующих клеток

(APC) в селезенке с помощью анализа клеток, образующих бляшки, вычисляли индекс модуляции (иммунный ответ) по сравнению с контрольной группой (Jerne et al., 1963).

2.21.3.3. Фагоцитарная активность перитонеальных макрофагов

Для проведения этого теста 30 мышам (5 самцам и 5 самкам из каждой группы) внутрибрюшинно вводили 1 мл суспензии частиц чернил. Через десять минут мышей умерщвляли (вдыхание CO₂) и выделяли перитонеальный экссудат. Общее количество перитонеальных макрофагов в экссудате (1 мкл) и количество фагоцитарных клеток подсчитывали с помощью камеры Горяева.

Все грызуны были рождены в виварии МГУ имени М.В. Ломоносова и использовались для исследований *in vivo*. Животных содержали группами (по 5 животных на группу для мышей и по 2 животных на группу для крыс и по 1 кролику на группу) в условиях 12-часового цикла "свет-темнота" (освещение включалось в 08:00), относительной влажности 30-70% и при 20-24°C. Взрослые кролики обоего пола весом 1-1.5 кг были приобретены на местном рынке и содержались в виварии МГУ имени М.В. Ломоносова в течение одной недели для акклиматизации.

Содержание животных и все исследования с участием животных проводились в соответствии с правилами (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes). Вещество растворяли в физиологическом растворе (0.9% стерильный раствор NaCl) и готовили свежим перед введением.

2.21.3.4. Анализ данных и статистика

Для проведения статистического анализа использовали Statistica 7.1 (TIBCO Software Inc., Пало-Альто, Калифорния, США). Для анализа данных

использовали тест Крускала–Уоллиса ANOVA по ранксу. Результаты выражены как среднее значение данных. Во всех тестах $p < 0.05$ считался значимым.

2.21.4. Изучение активности фармацевтической субстанции в различных носителях

Эффективность выделенной фармацевтической субстанции для наружного применения против гематом была исследована в различных носителях, таких как кремовая и гелевая основа.

Состав кремовой основы в %:

Вода очищенная – 82.4

Воск эмульсионный – 4

Масло вазелиновое – 4

Глицерин – 4

Масло Жожоба – 2

Ланолин безводный – 1

Воск пчелиный – 1

Твин-80 – 1

Консервант бензоат натрия – 0.45

Консервант Нипагин (метилпарабен) – 0.1

Консервант Нипазол (пропилпарабен) – 0.05

Состав гелевой основы в %:

Вода очищенная – 73.4

Карбопол – 0.9

Натрия гидроксид 10 % водный раствор – 1.7

Консервант спирт этиловый 96.5 % - 20

Глицерин – 4

Для приготовления 8 мл образца с концентрацией комплекса 30 мг/мл использовали 0.24 г вещества, которое растворяли в 240 мкл дистиллированной воды, а затем диспергировали в 8 мл носителя. Перемешивание проводили с помощью вортекса (Vortex V-1 plus, «Biosan», Латвия) в течение 5 мин.

Для приготовления 8 мл образца с концентрацией комплекса 60 мг/мл брали 0.48 г вещества и растворяли в 480 мкл дистиллированной воды, а затем диспергировали в 8 мл носителя. Перемешивание осуществляли с помощью вортекса (Vortex V-1 plus, «Biosan», Латвия) в течение 5 мин.

Вещество растворяли в дистиллированной воде и вводили в носитель за два дня до первого нанесения.

2.21.4.1. Изучение действия фармацевтической субстанции при поверхностном нанесении

Исследование по оценке эффективности готовой гелевой и кремовой субстанции проводили на крысах линии Вистар (возраст 10 недель, масса самцов 190–220 г, масса самок 180–200 г) обоего пола на модели внутридермальной гематомы. Исследование проведено в соответствии с рекомендациями Хельсинкской декларации и одобрено Комитетом по биоэтике МГУ имени М.В. Ломоносова (протокол 16-1 от 14.05.2021).

2.21.4.1.1. Модель внутридермальной гематомы

Все процедуры проводили на изначально наркотизированных крысах линии Вистар: Золетил® 100 (2 мг на 100 мг веса; Virbac, Новая Зеландия) в сочетании с Ксилазин Био 2,0% (20 мг на 1 кг веса; Bioveta, Чехия).

Перед работой животных взвешивали и визуально осматривали, а затем хирургическим скальпелем выбривали небольшие участки в нижней части спины (около 3 см²). Кровь забирали из латеральной хвостовой вены крыс (в количестве 300 мкл) инсулиновым шприцем на 0.5 мл. Аликвоту крови (по 100 мкл на каждую гематому) сразу вводили в дерму с образованием

гематомы. В результате у каждого животного было по три гематомы на нижней части спины. Дальнейшее постпроцедурное наблюдение за животными продолжалось в течение 2 ч.

Апликацию кремовой и гелевой формы начинали через 6 ч после появления гематом и проводили один раз в сутки в течение восьми дней до полного восстановления кожного покрова.

Эффективность изучали в сравнении с плацебо, которое содержало основу с добавлением к ней в соответствующем количестве дистиллированной воды. Результаты эксперимента учитывали по скорости уменьшения площади гематом, оцениваемой перед каждым последующим нанесением образцов крема.

2.21.4.2. Оценка эффективности фармацевтической субстанции в гелевой основе

Животные были разделены на две группы по 10 крыс в каждой (5 самцов и 5 самок). Первая группа получала плацебо, второй наносили гель с препаратом в концентрации 30 мг/мл, который вводили в ориентировочной дозе 2.9 мг на гематому.

Пробы наносили на зоны гематом ежедневно через фиксированные промежутки времени один раз в сутки. Размеры гематом измеряли в двух направлениях. Площадь рассчитывали как площадь круга ($\pi d^2/4$) в квадратных единицах, где π равнялось 3.14, а d был средним диаметром между двумя измерениями значениями. Затем результаты, полученные во всех группах, проходили статистический анализ.

2.21.4.3. Оценка эффективности фармацевтической субстанции в кремовой основе

Животные были разделены на группы. В первую группу вошли 6 крыс (3 самца и 3 самки), получающих форму плацебо. Во вторую группу вошли 10 крыс (5 самцов и 5 самок), получающие крем с веществом в концентрации 30

мг/мл, который вводили в ориентировочной дозе 2.9 мг на гематому. В третью группу вошли 9 крыс (4 самца и 5 самок), получавших крем с веществом в концентрации 60 мг/мл, который вводили в ориентировочной дозе 5.7 мг на гематому.

Пробы наносили на зоны гематом ежедневно через фиксированные промежутки времени один раз в сутки. Размеры гематом измеряли в двух направлениях. Площадь рассчитывали как площадь круга ($\pi d^2/4$) в квадратных единицах, где π равнялось 3.14, а d был средним диаметром между двумя измеряемыми значениями. Затем результаты, полученные во всех группах, проходили статистический анализ.

2.21.4.4. Анализ данных и статистика

Для проведения статистического анализа использовали Prism® V. 5 (GraphPad Software Inc., Сан-Диего, Калифорния, США). Полученные экспериментальные данные анализировали с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Значение $p < 0.05$ указывало на то, что различия были статистически значимыми.

3.1. Морфо-физиологические особенности микромицета *Arthrobotrys longa* в глубинной культуре

⁴ Основные результаты, изложенные в данной главе, опубликованы в следующих научных статьях автора в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В.Ломоносова:

1. Alipkina S., **Kornienko E.**, Nalobin D., Osmolovskiy A. Acute toxicity, immunotoxicity and allergenicity of protease complex obtained from micromycete *Sarocladium strictum* // *Pharmaceutics*. 2021. Vol. 13, № 10, 1660. DOI: 10.3390/pharmaceutics13101660. IF (SJR) = 5,4. Вклад автора в печатных листах: (0,56/0,28) (здесь и далее в скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах).
2. **Корниенко Е.И.**, Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Котова И.Б., Егоров Н.С. Характеристика и свойства комплекса протеолитических ферментов тромболитического действия микромицета *Sarocladium strictum* // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2021. Т. 57, № 1, С. 46-53. DOI: 10.31857/S0555109921010293. IF РИНЦ = 1,053. [Kornienko E.I., Osmolovskiy A.A., Kreyer V.G., Baranova N.A., Kotova I.B., Egorov N.S. Characteristics and properties of the complex of proteolytic enzymes of the thrombolytic action of the micromycete *Sarocladium strictum* // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2021. Vol. 57, № 1, P. 57-64. DOI: 10.1134/S0003683821010129. IF (SJR) = 0,8]. (0,44/0,35)
3. **Корниенко Е.И.**, Кокаева Л.Ю., Биланенко Е.Н., Мокеева В.Л., Шаркова Т.С., Осмоловский А.А. *Sarocladium strictum* – перспективный продуцент протеолитических ферментов с выраженной фибринолитической активностью // *Микология и фитопатология*. 2020. Т. 54, № 3, С. 206-213. DOI: 10.31857/S0026364820030083. IF РИНЦ = 0,806. (0,44/0,35)
4. Шаркова Т.С., **Корниенко Е.И.**, Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Морфо - физиологические особенности микромицета *Arthrobotrys longa* – продуцента протеолитического комплекса тромболитического действия лонголитин // *Микробиология*. 2016. Т. 85, № 2, С. 171-176. DOI: 10.7868/S0026365616020178. IF РИНЦ = 1,052. (). [Sharkova T.S., Kornienko E.I., Osmolovskii A.A., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Morphological and physiological properties of the micromycete *Arthrobotrys longa*, a producer of longolytin, a proteolytic complex with a thrombolytic effect // *Microbiology*. 2016. Vol. 85, № 2, P. 180-184. DOI: 10.1134/S0026261716020168. IF (SJR) = 1,5]. (0,31/0,25)
5. **Патент РФ:**
Корниенко Е.И., Осмоловский А.А., Шаркова Т.С., Налобин Д.С., Кураков А.В. Штамм *Sarocladium strictum* - продуцент фибринолитических ферментов с активаторной к плазминогену активностью // Патент RU 2728456 С1. МПК С12N 1/14. С12N 9/68. С12R 1/645. Дата подачи 30.12.2019. № 2019144891. Опубликовано 29.07.2020. (0,5/0,4)

Изучение особенностей морфологии и физиологии микромицетов при их росте в глубинных условиях позволяет выявить взаимосвязь их развития с характером образования ферментов. Эта необходимость остается и для продуцентов, ферменты которых уже используются или находятся в разработке соответствующих препаратов. Не составляет исключения и *Arthrobotrys longa*, ранее не изученный в этом отношении.

Штамм *A. longa* секретирует протеазы при росте в глубинных условиях на простой синтетической среде. При его культивировании было отмечено, что на тонких гифах постоянно образуются одноклеточные микроконидии, которые прорастают молодыми гифами, давая начало новым мицелиальным поколениям. При определении протеолитической активности были отмечены ее колебания, связанные с морфологией растущего продуцента.

Изучение динамики роста и накопления протеолитических ферментов *A. longa* проводили в течение 216 часов (рис. 14). На протяжении первых двух суток биомасса микромицета активно нарастала, после чего начиналась стационарная фаза роста, на которую приходилось массовое образование протеаз с фибринолитической и активаторной к плазминогену активностью. Максимальные значения фибринолитической активности наблюдали на 96 и 192 ч культивирования – 977 и 992 усл. ед./мл, соответственно. Максимум активаторной к плазминогену активности не совпадал ни с одним из максимумов фибринолитической активности микромицета и соответствовал 120 ч культивирования; его значение составило 481 усл. ед./мл.

Динамика неспецифической протеолитической (казеинолитической) активности протеаз в культуральной жидкости *A. longa*, её максимум наблюдали на 144 ч культивирования (446 ммоль Туг/мл×мин), который также соответствовал стационарной фазе роста и не совпадал с пиками фибринолитической и активаторной к плазминогену активности (рис. 14).

Накопление протеаз с фибринолитической и активаторной к плазминогену активностью микромицета *A. longa* сопоставляли с его удельной скоростью роста (рис.15). Как видно из рисунка, удельная скорость

роста продуцента неравномерна, и при ее увеличении происходит возрастание удельной скорости синтеза протеаз.

Однако, удельные скорости синтеза протеаз, рассчитанные для обоих типов активности, указывают на отсутствие корреляции между их образованием, что, соответственно, может говорить об их принадлежности разным ферментам.

Полученные данные свидетельствуют о полицикличности в ростовом процессе культуры в глубинных условиях. Это подтверждается и данными световой микроскопии (рис. 16), с помощью которой контролировали состояние мицелия, количество микроконидий и образование на гифах специализированных структур - фиалид. Зависимость между морфогенезом и образованием протеаз является часто устанавливаемой закономерностью, при котором протеолиз тех или иных субстратов рассматривается как одна из контролирующих функций (Deshpande, 1992).

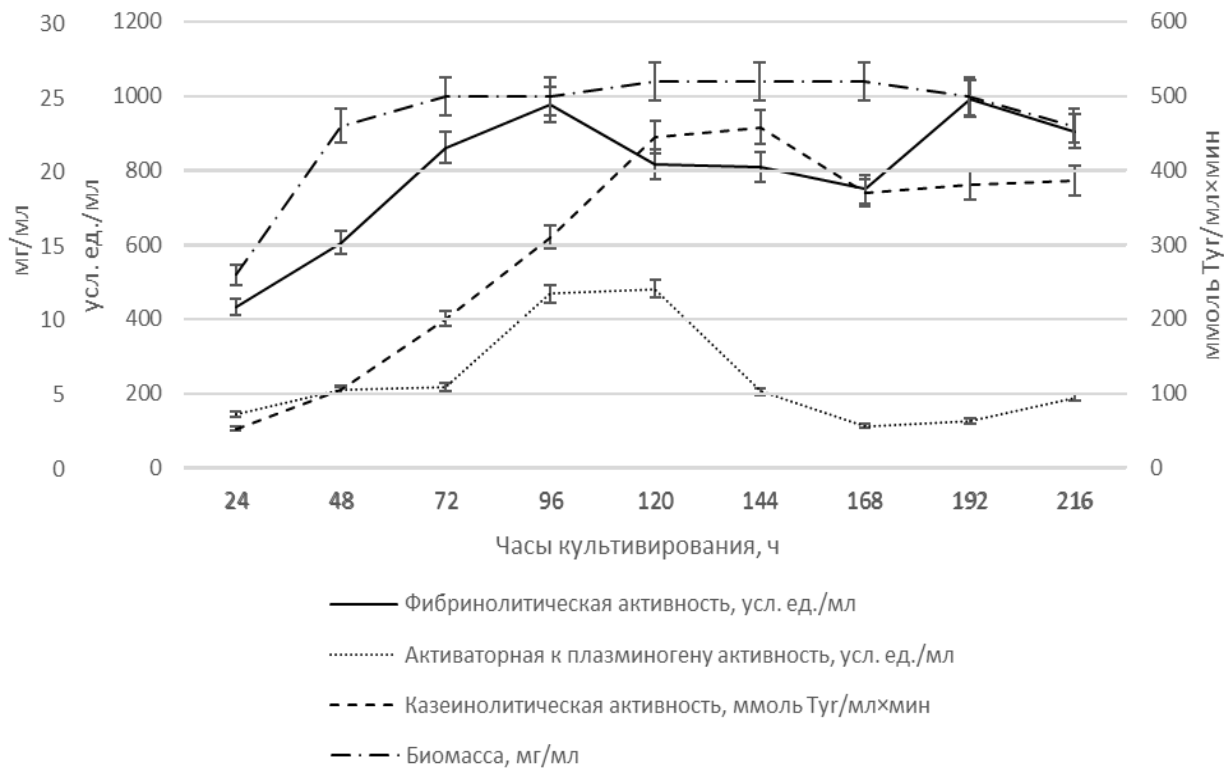


Рис.14. Динамика роста и накопления протеолитических ферментов микромицетом *A. longa*.

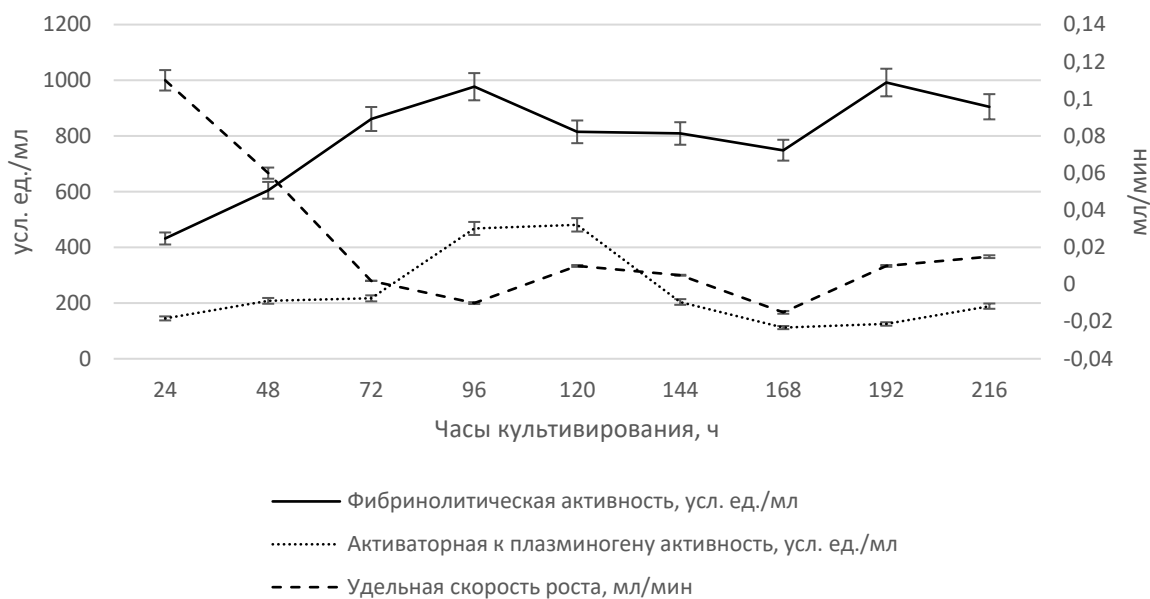


Рис.15. Динамика удельной скорости роста и протеолитической активности *A. longa*.

Изучение микроморфологии штамма на протяжении всего периода культивирования (включая получение посевного материала) показало, что посевной мицелий *A. longa* (72 ч) находился в споровой стадии развития (рис. 16, А), поэтому в течение первых двух суток споры активно прорастали, образуя молодой мицелий, тем самым давая начало мицелиальной стадии. Заметные изменения произошли на 3 сутки культивирования. При этом наблюдали синхронное интенсивное образование конидий и, соответственно, усиление микроконидиальной фазы (рис. 16, Б, Е). В последующий период (96 ч, 120 ч) происходил интенсивный рост новой генерации молодого мицелия (рис. 16, В) и прорастание его короткими гифами с фиалидами (рис. 16, Д), которое завершалось повторным массовым образованием спор (рис. 16, Г). К концу культивирования (168 ч, 192 ч) среди мицелия при прижизненной окраске стали заметны утолщенные гифы с вакуолями, содержащими крупные гранулы и прорастающие тонким мицелием с недифференцированной цитоплазмой (рис. 16, Ж). На 9 сутки (216 ч) наблюдалась некоторая тенденция к увеличению количества конидий (рис. 16, З).

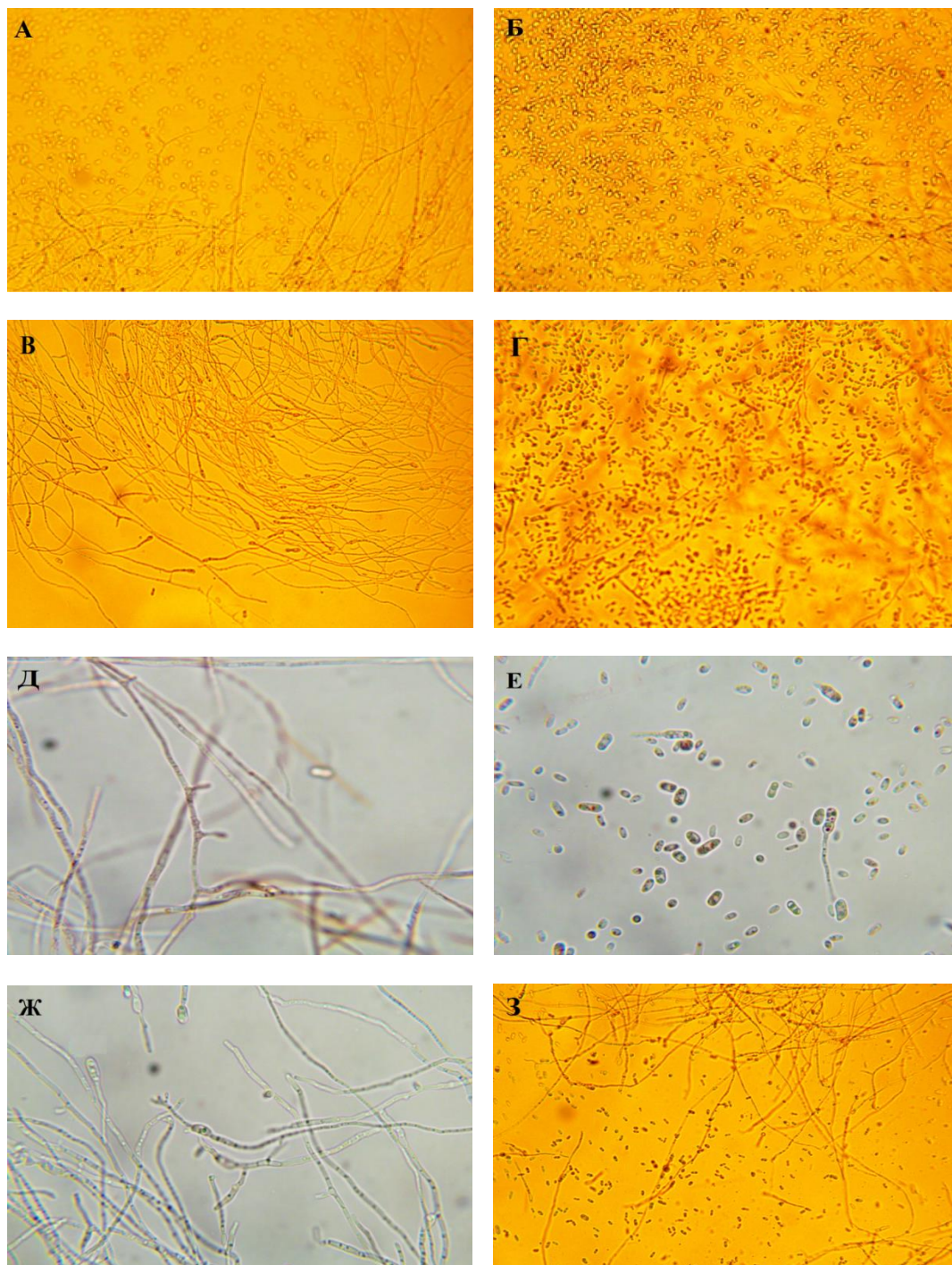


Рис. 16. Световая микроскопия глубинной культуры *A. longa*: А – посевной материал (400×); Б – 72 часа культивирования (400×); В – 96 часов культивирования (400×); Г – 144 часа культивирования (400×); Д – мицелий с фиалидами (1000×); Е – микроконидии и проростки на разных этапах развития (1000×); Ж – утолщенные гифы, прорастающие молодым мицелием (216 часов культивирования), (1000×); З – 216 часов культивирования (400×).

Таким образом, можно предположить наличие у *A. longa* 1 в глубинной культуре эндогенного биоритма спорообразования с периодом в 72 ч. Во всех случаях максимальное образование внеклеточных протеаз с активаторной к плазминогену активностью отмечалось в момент синхронного прорастания конидий и образования молодых генераций мицелия.

Также была изучена закономерность соотношения активаторной и фибринолитической активности микромицета *A. longa*. Как следует из полученных данных, активаторная к плазминогену активность протеаз, образуемых *A. longa* 1, составляет до 50% от фибринолитической активности (рис. 17), что значительно превышает данный параметр для других микромицетов этого рода.

Так, значения фибринолитической активности по отношению к активаторной составило 992.78 усл. ед./мл к 481.6 усл. ед./мл. Схожее распределение наблюдается и при расчете на биомассу: 38.48 усл. ед./мг биомассы – фибринолитическая и 19.51 усл. ед./мг биомассы – активаторная. Соотношение обоих типов активности с учетом содержания белка в пробах показало примерно равный вклад фибринолитической и активаторной активности (18.56 и 17.64 усл. ед./мкг белка, соответственно). Таким образом, микромицет *A. longa* способен образовывать комплекс высокоактивных протеаз с выраженной фибринолитической активностью, которая дополняется активаторной к плазминогену активностью.

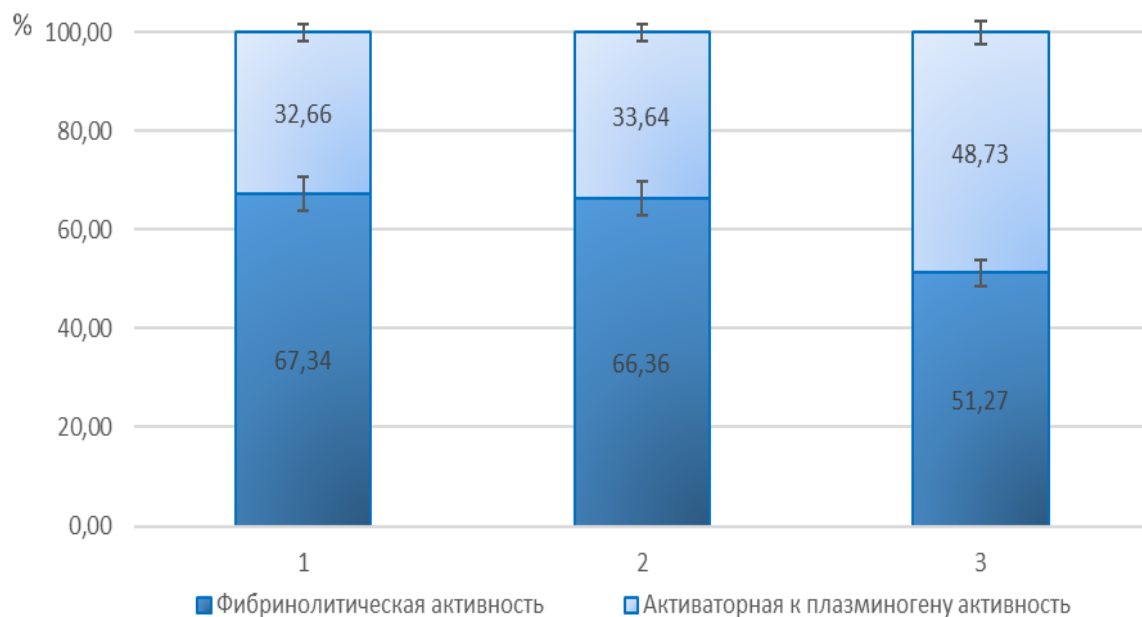


Рис. 17. **1** – соотношение активаторной и фибринолитической активностей микромицета *A. longa* в глубинной культуре (усл. ед./мл); **2** – соотношение активностей на мг биомассы (усл. ед./мг); **3** – соотношение активностей на мкг белка (усл. ед./мкг).

3.2. Свойства комплексного препарата Лонголитин, образуемого микромицетом *A. longa*

Для изучения комплексного препарата Лонголитин, образуемого микромицетом *A. longa*, был использован системный подход с применением различных биохимических методов. Основными задачами стали анализ активности и свойств как комплексного препарата, так и входящих в его состав протеаз.

3.2.1. Разделение и фракционирование комплексного препарата протеаз, образуемого микромицетом *A. longa*

Для дальнейшего изучения протеаз, образуемых микромицетом *A. longa*, были проведены получение и очистка комплекса протеолитических ферментов путем осаждения белков культуральной жидкости и их дальнейшим высушиванием над серной кислотой. Выделение комплекса проводили на шестые сутки культивирования продуцента в жидкой ферментационной среде. Препарат внеклеточных протеолитических ферментов, микромицета *A. longa* имеет название «Лонголитин» (патент: RU 2182596 С2).

Для выявления ранее неизученного механизма действия на белки плазмы крови протеаз, входящих в состав Лонголитина, проводили определение активности полученного препарата с хромогенными пептидными субстратами протеаз системы гемостаза – плазмина, тромбина, тканевого активатора плазминогена и урокиназы.

Лонголитин проявил плазминоподобную, тромбиноподобную активность и активность тканевого активатора плазминогена (табл. 4). Наличие тромбиноподобной активности протеаз, заведомо обладающих фибринолитическими свойствами, может быть вызвано тем, что плазмин и близкие к нему протеазы способны расщеплять субстраты тромбина. Интересно отметить, что наиболее ярко выраженной оказалась активность по отношению к урокиназному субстрату, величина которой составила 555.24 нмоль рНА/мг×мин. Таким образом можно выделить его направленное действие в отношении данного субстрата.

Урокиназа является одним из активаторов плазминогена в плазме крови. Данный путь запускает каскад реакций, приводящий к образованию плазмина, что способствует деградации образовавшегося тромбинового сгустка.

Таблица 4.

Субстратная специфичность комплексного препарата Лонголитин.

Активность	Значение удельной активности, нмоль рNA/мг×мин
Плазминоподобная, DVal-Leu-Lys-pNA	66.90 ± 9.7
Тромбиноподобная, Tos-Gly-Pro-Arg-pNA	237.49 ± 10.1
Активность тканевого активатора, H-D-Пе-Pro-Arg-pNA	279.86 ± 10.1
Урокиназная, pGlu-Gly-Arg-pNA	555.24 ± 10.3

При детальном изучении ранее неизвестных компонентов входящих в препарат Лонголитин было проведено разделение белков препарата методом изоэлектрофокусирования. Определение общей протеолитической активности во фракциях позволило обнаружить пик активности в щелочной области с pI 10.64 (рис. 18). Также было выявлено разделение по белку в нейтральной области pH.

Так как ранее в данной работе было показано, что выделенный фермент обладал выраженной активаторной к плазминогену активностью урокиназного типа, дальнейший анализ полученных послефокусировочных фракций проводили под контролем урокиназного хромогенного пептидного субстрата (pGlu-Gly-Arg-pNA). Были обнаружены две протеазы с данной активностью с pI 5.52 и 6.91.

Для дальнейшего обозначения активных белков были введены обозначения протеаз I, II и III.

Белки, обнаруженные в нейтральной области рН, проявляли ярко выраженную урокиназную активность, но имели крайне низкую общую активность с казеином. В то же время белок, обнаруженный при щелочном значении рН, проявлял высокую общую протеолитическую активность и незначительную урокиназную активность. Таким образом, данный комплексный препарат может быть применен не только в качестве лекарственного средства, но и, после соответствующей очистки, в качестве диагностикума.

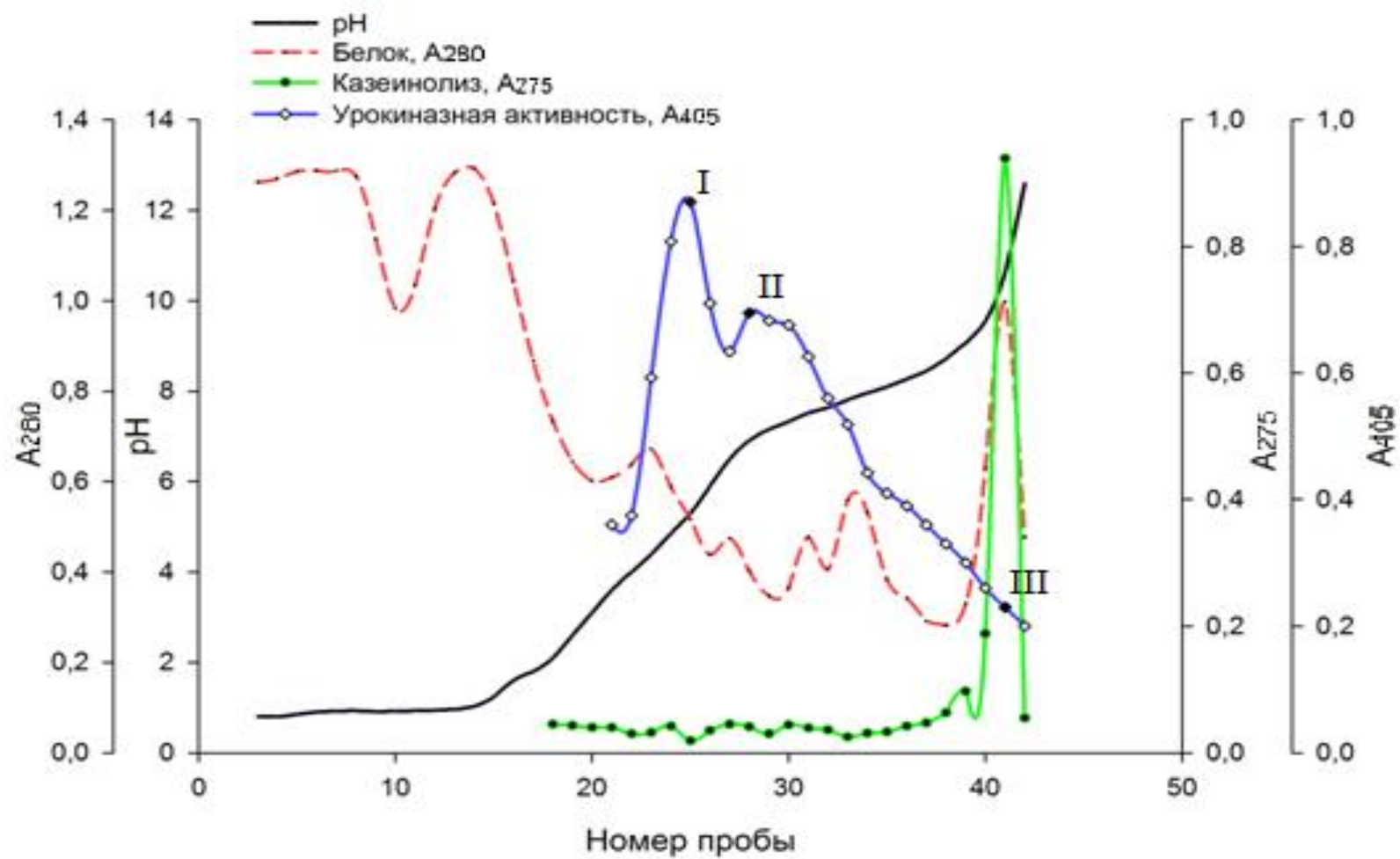


Рис. 18. Изоэлектрофокусирование препарата Лонголитин.

3.2.2. Тромболизис протеазами, образуемыми *A. longa*

Для качественного измерения фибринолитической активности протеаз, образуемых *A. longa*, проводили реакции лизиса тромбов *in vitro*. Для исследования были использованы послефокусировочные фракции, содержащие протеазы I, II и III.

Как видно из рис. 19, протеаза III обладала наибольшей скоростью тромболизиса и по прошествии 90 минут доля остаточного тромба составляла 37 %. Протеазы I и II лизировали тромб медленнее и доля остаточного тромба по прошествии 90 минут составляла 63 и 75 %, соответственно.

Исходя из полученных данных можно сделать вывод, что наибольший вклад в тромболизис вносит протеаза III, способная гидролизовать широкий круг субстратов, а наименьший - протеаза II.

Возможно, высокая фибринолитическая активность протеазы III обусловлена высокой общей протеолитической активностью, а также щелочным значением рI 10.64.

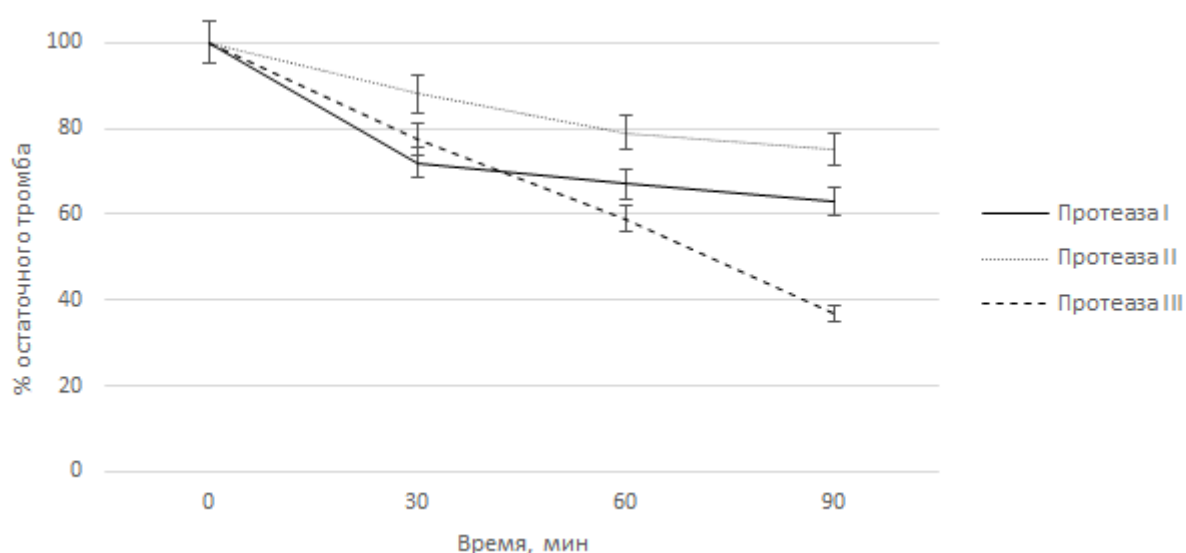


Рис. 19. Тромболизис *in vitro* протеазами, образуемыми *A. longa*.

3.2.3. Хранение препарата протеаз, образуемого микромицетом *A. longa*

Для определения сроков хранения комплексного тромболитического препарата Лонголитин образцы высушенного препарата были помещены в термостаты с температурами -20 , $+4$, $+25$ и $+37^{\circ}\text{C}$ сроком на неделю, месяц и полгода.

Результаты показали, что за неделю хранения при различных температурах снижения активности препарата от контроля (12.54 мкмоль рНА/мл \times мин) не произошло (рис. 20, 21). Спустя месяц появились незначительные изменения активности; особенно сильно оказалась заметна потеря активности при хранении образцов препарата при $+37^{\circ}\text{C}$ (10.19 мкмоль рНА/мл \times мин). Через полгода активность образцов препаратов, хранящихся при -20 и $+4^{\circ}\text{C}$ составляла около 70 % от исходного значения. Хранение при $+25^{\circ}\text{C}$ снизило активность на 55%, а при $+37$ - на 41%.

Таким образом, по результатам данного эксперимента можно заключить, что оптимальная температура хранения препарата протеаз Лонголитин составляет от -20 до $+4^{\circ}\text{C}$.

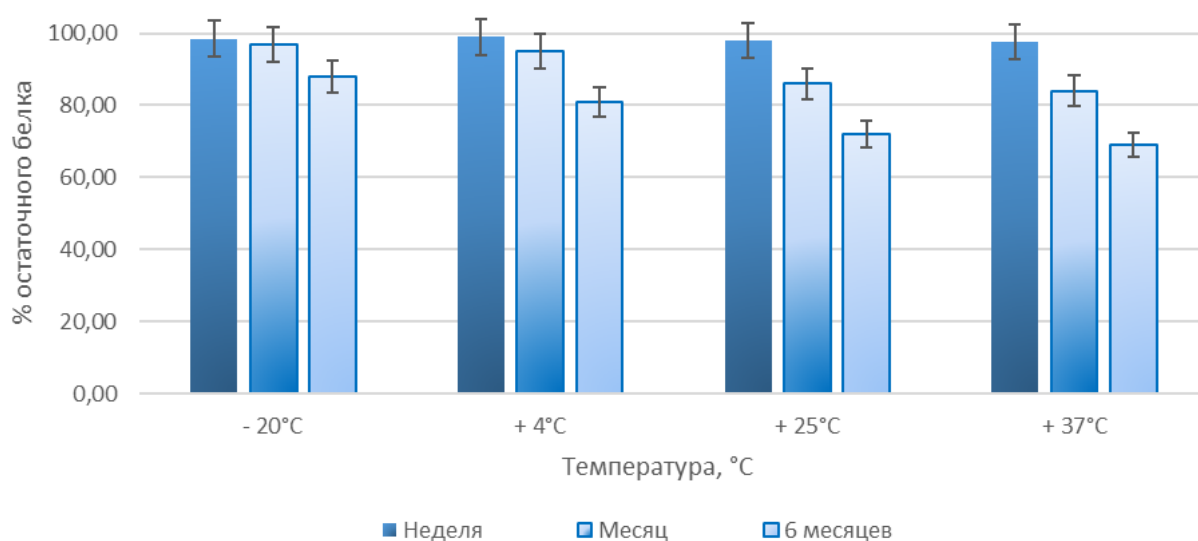


Рис. 20. Содержание белка в образцах препарата протеаз, образуемых микромицетом *A. longa*.

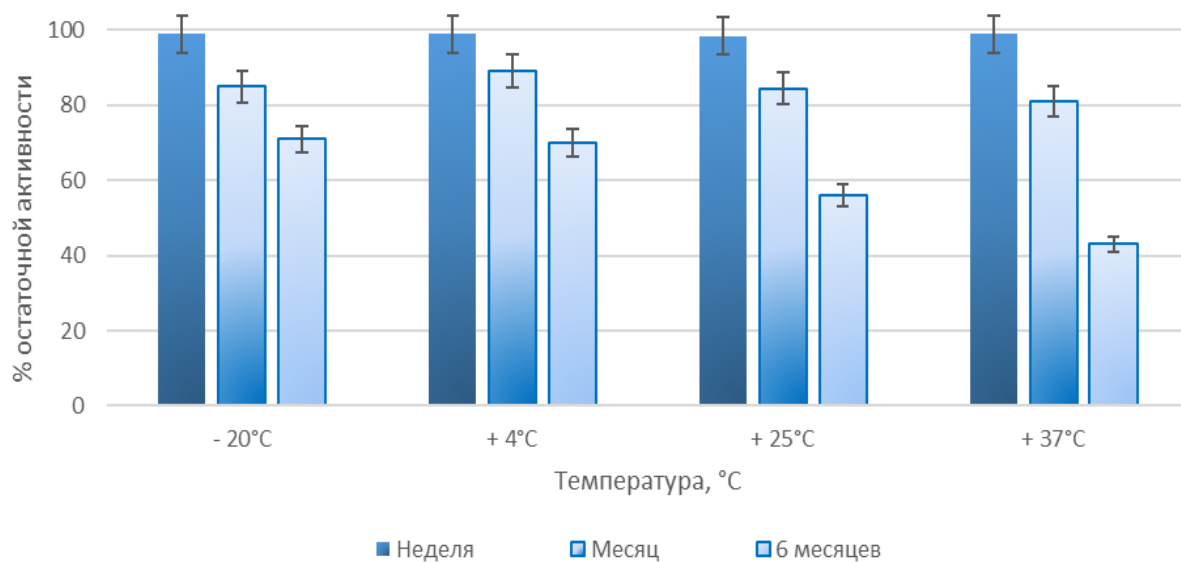


Рис. 21. Остаточная урокиназная активность протеаз, образуемых микромицетом *A. longa* при различных температурах хранения.

3.3. Обнаружение и молекулярно-генетическая идентификация ассоцианта – микофила

При работе с *Arthrobotrys longa* Mecht. на агаризованной среде Чапека–Докса нами был выделен неизвестный гриб-ассоциант, по всей видимости, проявляющий микофилию и также обладающий фибринолитической активностью. При изучении макро- и микроморфологии микромицета-микофила была установлена принадлежность данного гриба к роду *Sarocladium* (рис. 22, 23). Молекулярно-генетическая идентификация по участку нуклеотидной последовательности ITS1-5.8S-ITS2 рДНК позволила определить микромицет как *Sarocladium strictum* (рис. 24). Последовательность была депонирована в GenBank под номером MF192758.

Известно, что род *Sarocladium* включает виды, занимающие разные экологические ниши. В большинстве это патогены растений, которые были выделены из мест поражений, с поверхности живых или мертвых частей растений или из почвы. Вид *S. mycophilum* известен как единственный микопаразит в этом роде (Hoog et al., 2000).

Экологическая амплитуда *S. strictum* очень широка (Domsch et al., 2007; Summerbell et al., 2011). Известны изоляты вида, выделенные из почвы, с обработанной древесины, из ризосферы различных растений, со стен и других влажных поверхностей теплиц, с мертвых и живых растений, из пораженной волосистой части головы человека. Также этот гриб был обнаружен у пациентов с хроническими легочными заболеваниями (Gams et al., 1971; Hoog et al., 2000). По патогенным свойствам гриб относят к первому базовому уровню биобезопасности (BSL-1) и, по-видимому, он является участником инвазивной инфекции иммунодепрессивных пациентов (Hoog et al., 2000). Известны многочисленные случаи выделения *S. strictum* с грибов разных таксономических групп, как аско-, так и базидиомицетов – *Inonotus* (чага), *Hypoxylon*, *Fomitopsis*, *Microsphaera*, со склероциев *Botryotinia* (Domsch et al., 2007). Характер взаимоотношений *Sarocladium strictum* с

другими грибами точно не установлен и может быть различен – от сапротрофии до микопаразитизма.

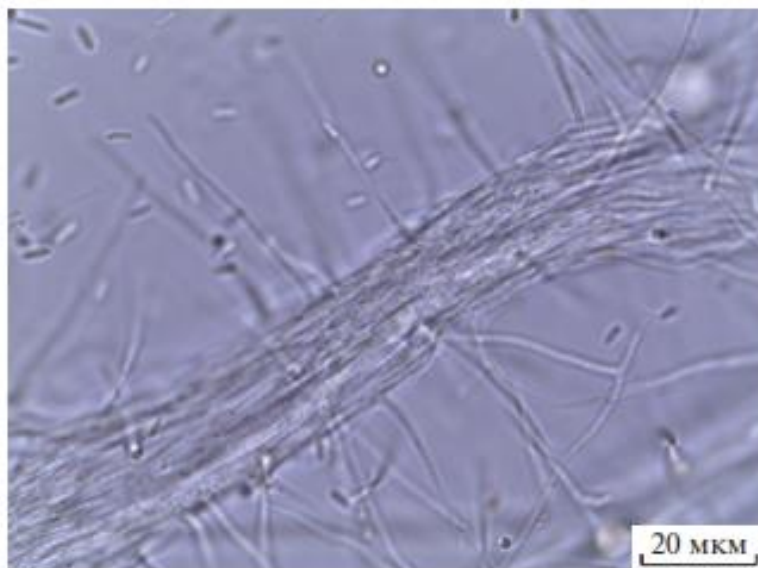


Рис. 22. *Sarocladium strictum*: фиалиды, отходящие от тяжёлой мицелия, палочковидные конидии (14 суток, культура на овсяном агаре, световой микроскоп)

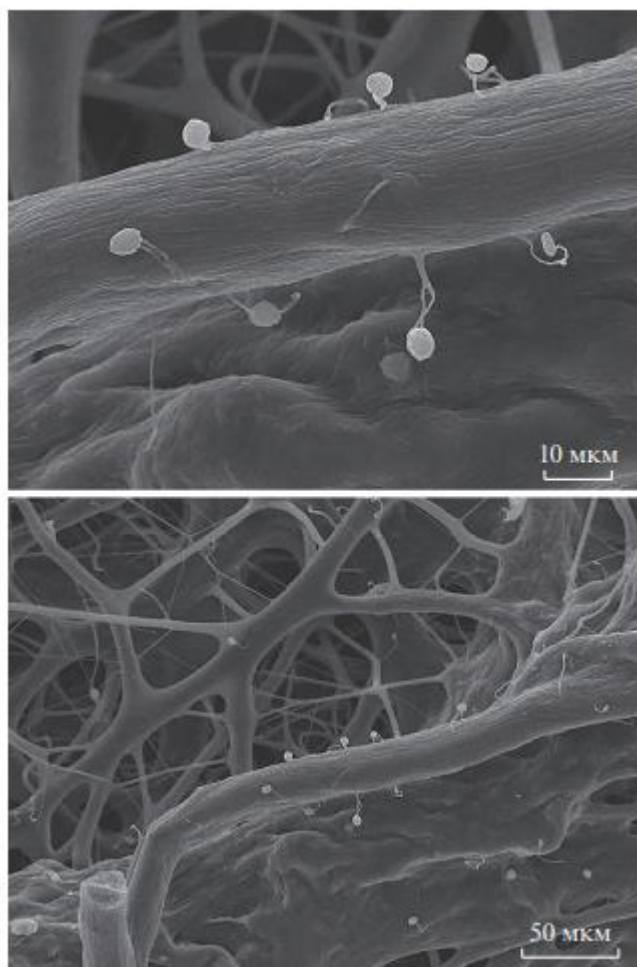


Рис. 23. *Sarocladium strictum*: фиалиды, отходящие от тяжелой мицелия, округлые головки конидий (5 суток, культура на среде Чапека–Докса, СЭМ).

```

TTGGGGGTTTCACGGCGTGGCCGAGCCGCTCTCCGGTGCGAGGTGTGCTACT
ACGCAGGGGAGGCTGCGGCGCGACCGCCACTCAATTTGGGGGACAGGGGCC
CGGAGGCCGCTGATCCCCAGCACCAGGTCCCCCCCCGAAAGGGGGTCTGAG
GGTTGAAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCGCCGAGTGCCGGCGGGCGCA
ATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAATTATC
GCATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAA
GTTTTGATTCATTTTGTTCGCGGGCTTCGCCCCCTCAGAGATTCACAATAAAATC
AGAGTTTGGTTGTCCCCGGCGGACGCCCGGAGCCCCGGAGGCACCGCGCGCT
GAGCCCGCCGAGGGAACGATAGGTATGTTTACAATGGGTTGGAGAGCCTAGG
GCACTCTGGTAATGATCCCTCCGCA

```

Рис. 24. Нуклеотидная последовательность участка гена ITS1–5.8S–ITS2 рДНК *Sarocladium strictum*.

3.4. Изучение активности экзопротеаз микромицета *Sarocladium strictum* 203

Для дальнейшей работы с новым перспективным штаммом *Sarocladium strictum* 203 был проведен анализ активности образованных им экзопротеаз как в глубинных условиях, так и при поверхностном росте на агаризованных средах.

3.4.1. Гидролитический потенциал микромицета *Sarocladium strictum*

Выявление способности выделенного микромицета к продукции внеклеточных ферментов на основе определения энзиматических индексов при росте на агаризованных средах с белками или углеводами в своем составе показало, что *Sarocladium strictum* проявляет высокую протеолитическую активность и обладает незначительной амилолитической активностью (рис. 25, табл. 5).

При высеве на дифференциально-диагностические среды микромицет *S. strictum* показал высокую активность на среде с желатином и казеином (табл. 5): значения энзиматических индексов составили 2.69 и 2.01, соответственно. Также высокие показатели были выявлены на средах с крахмалом (1.51) и эластином (1.13). На среде с целлюлозой активность не была обнаружена.

Высокие показатели протеолитической активности с казеином и желатином, а также амилолитическая активность на среде с крахмалом свидетельствуют о том, что данный микромицет способен расщеплять широкий круг субстратов, и может иметь определенный биотехнологический потенциал что делает его дальнейшее изучение весьма перспективным.

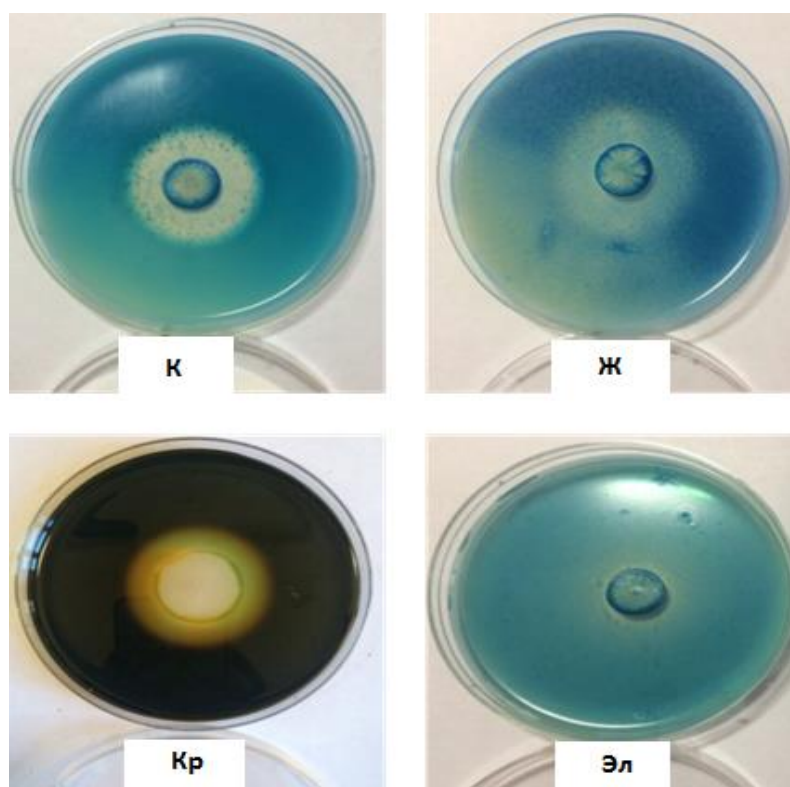


Рис. 25. Колонии *Sarocladium strictum* на дифференциально-диагностических средах с содержанием: казеина (К), желатина (Ж), крахмала (Кр) и эластина (Эл), и зоны гидролиза субстратов.

Таблица 5.

Гидролитический потенциал микромицета *Sarocladium strictum*.

Субстрат	d колонии, мм	D зоны гидролиза, мм	Энзиматический индекс
Казеин	16.3 ± 0.5	32.5 ± 0.5	2.01 ± 0.5
Крахмал	28.3 ± 0.5	42.5 ± 0.5	1.51 ± 0.5
Эластин	15.5 ± 0.5	17.5 ± 0.5	1.13 ± 0.5
Желатин	15.3 ± 0.5	42.5 ± 0.5	2.69 ± 0.5
Целлюлоза	0	0	0

3.4.2. Протеолитическая активность микромицета *Sarocladium strictum* при росте на средах различного состава

Для культивирования микромицета *S. strictum* в глубинных условиях были использованы 2 среды с различным составом. Среда № 1 содержит глюкозу, глицерин, NaNO_3 , гидролизат рыбной муки, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ и KH_2PO_4 и является стандартной средой для культивирования микромицетов – продуцентов протеолитических ферментов (Батомункуева и Егоров, 2001; Dunaevskii, 1999). Среда № 2 имеет менее сложный состав и содержит K_2HPO_4 , NaNO_3 , KNO_3 и сахарозу. Данная среда также была использована для культивирования микромицета *A. longa* и является наиболее удобной для выделения и очистки экзопротеаз.

Результаты определения активности протеаз при росте продуцента на средах № 1 и 2 представлены в табл. 6. Как видно из таблицы, казеинолитическая активность микромицета на среде № 1 была выше, чем на среде № 2 (32.8 и 29.2 мкмоль Тур/мл×мин, соответственно). Фибринолитическая и фибриногенолитическая активность на среде № 1 и №2 были одинаковы и различия в величине активности находились в районе погрешности. Показатели фибринолитической и активаторной к плазминогену активности на фибриновых пластинах в среде № 2 были значительно выше и составили 843.0 и 574.3 усл.ед./мл, соответственно, в то время как те же активности на среде № 1 составили 738.6 и 369.8 усл.ед./мл, соответственно. Активности, измеренные с ХПС, также находились в районе погрешности метода, и значимых отличий на средах с различным составом обнаружено не было (рис. 26). Максимальная активность была показана при использовании урокиназного хромогенного субстрата (pGlu-Gly-Arg-pNA), которая составила порядка 50 нмоль pNA/мл×мин на обеих средах. Также проявилась несколько меньшая активность по отношению к субстрату активированного протеина С (pGlu-Pro-Arg-pNA). Остальные активности вносят куда меньший вклад в суммарную активность препарата.

Таким образом, на основании полученных данных была выбрана среда № 2, так как она является более удобной для выделения конечного продукта и к тому же продуцент при росте на ней имеет более высокие показатели по фибринолитической и активаторной к плазминогену активности.

Таблица 6.

Протеолитическая активность микромицета *Sarocladium strictum* на средах различного состава.

Активность, ед. измерения	Субстрат	Значения активности на среде	
		№1	№2
Казеинолитическая активность, мкмоль Туг/мл×мин	казеин	32.8 ± 1.2	29.2 ± 1.3
Фибринолитическая, мкмоль Туг/мл×мин	фибрин	16.1 ± 1.3	17.8 ± 1.2
Фибриногенолитическая, мкмоль Туг/мл×мин	фибриноген	9.3 ± 1.1	8.7 ± 1.2
Фибринолитическая, усл.ед./мл	фибрин	738.6 ± 15.3	843.0 ± 17.5
Активаторная к плазминогену, усл. ед./мл	фибрин, плазминоген	369.8 ± 14.2	574.3 ± 15.9

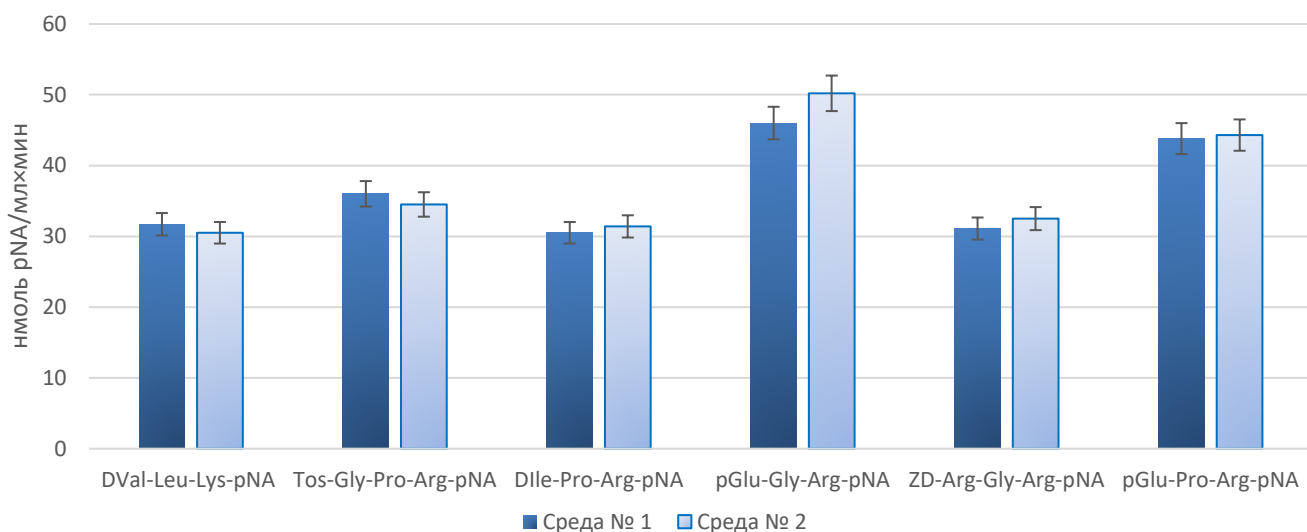


Рис. 26. Активность с ХПС протеолитических ферментов микромицета *Sarocladium strictum* при росте на средах различного состава. DVal-Leu-Lys-pNA – субстрат плазмина; Tos-Gly-Pro-Arg-pNA – субстрат тромбина; Dlle-Pro-Arg-pNA – субстрат тканевого активатора плазминогена; pGlu-Gly-Arg-pNA – субстрат урокиназы; ZD-Arg-Gly-Arg-pNA – субстрат Ха-подобный; pGlu-Pro-Arg-pNA – субстрат активированного протеина С.

3.4.3. Подбор оптимального значения pH среды для образования внеклеточных протеаз микромицетом *S. strictum*

Экспрессия внеклеточных протеаз микромицетов имеет зависимый характер. На данный процесс оказывают влияние температура, аэрация, состав среды и значения pH (Егоров 1979). Для изучения выработки и активности протеаз в глубинных условиях была использована синтетическая среда №2 с различными значениями начального pH (рис. 27, 28).

Эксперименты показали, что при культивировании микромицета на среде с pH 4 значение общей протеолитической активности составило 367.06 мкмоль Tyr/мл×мин (рис. 27), что значительно выше, чем на средах с pH 5, 6,

6.5 и 7. Казеинолитическая активность сильно падала при pH 5 и составила всего 25.47 мкмоль Тур/мл×мин. При увеличении pH среды до 6 активность начинала нарастать, и достигала своего второго максимума при pH 6.5 (69.99 мкмоль Тур/мл×мин). При дальнейшем увеличении значения pH до 7 данная активность снова снижалась, и ее величина составила 36.73 мкмоль Тур/мл×мин.

Урокиазная активность постепенно нарастала при увеличении pH среды (рис. 27) от 4 (1.12 нмоль рНА/мл×мин) и достигала своего максимума при pH 6.5 (32.84 нмоль рНА/мл×мин). На среде с pH 7 изучаемая активность снизилась и составила 14.50 нмоль рНА/мл×мин.

Фибринолитическая и активаторная к плазминогену активность (рис. 28) также постепенно росли при увеличении pH среды. Так, при pH 4 их значения составили 247.25 и 14.99 усл. ед./мл, соответственно. Максимальные значения изучаемых активностей были обнаружены при pH 6.5 и составили 852.48 и 462.87 усл. ед./мл, соответственно. Небольшое снижение исследуемых активностей было отмечено при pH 6 (664.34 и 258.08 усл. ед./мл) и при pH 7 (525.47 и 220.28 усл. ед./мл, соответственно). Интересно также отметить изменение фибринолитической и активаторной к плазминогену активности в зависимости от pH среды. При pH 4 фибринолитическая активность была значительно выше активаторной к плазминогену активности. В то время, как при увеличении pH среды это соотношение изменялось, и при pH 6.5 активаторная активность составляла 50 % от фибринолитической активности.

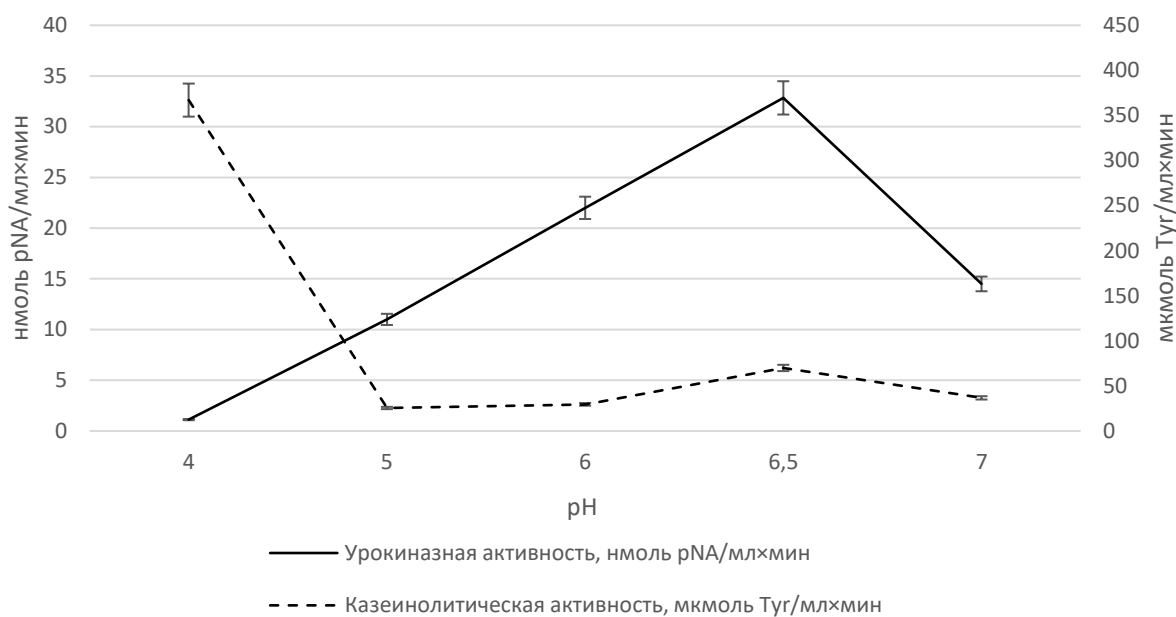


Рис. 27. Влияние pH среды на активность протеолитических ферментов микромицета *S. strictum*: урокиназная активность (ХПС) и общая протеолитическая активность (казеинолиз).

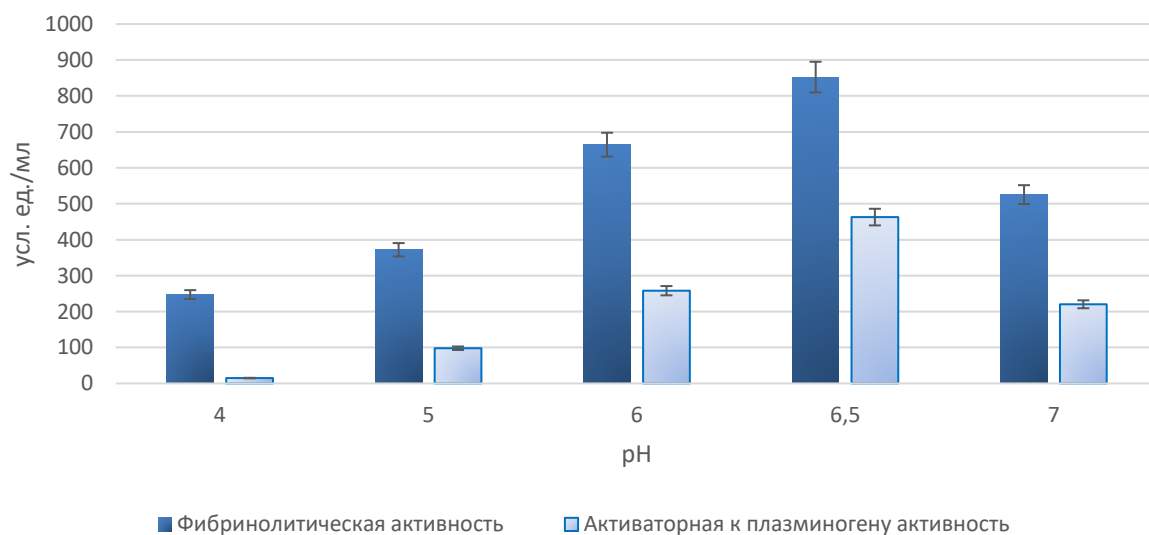


Рис. 28. Влияние pH среды на активность протеолитических ферментов микромицета *S. strictum*: Фибринолитическая и активаторная к плазминогену активность (метод фибриновых пластин).

Из данных литературы известно, что микромицеты рода *Sarocladium* занимают различные экологические ниши и растут в нейтральном диапазоне рН, от слабокислого до слабощелочного (Hoog, 2000). Характер роста микромицета *S. strictum* на средах с различным значением рН имел заметные расхождения только при значении 4, при котором происходило подавление роста микромицета и количество мицелия ощутимо снижалась. При значении рН 5 консистенция мицелия была несколько чуть менее плотная, чем при более высоких значениях. Изменения в характере роста при рН 6, 6.5 и обнаружены не были, но показатели активности в этом диапазоне имели существенные различия. Несмотря на незначительный шаг изменения рН среды значение 6.5 является наиболее оптимальным для данного продуцента для увеличения выхода конечного продукта.

Таким образом, можно сделать вывод, что оптимальные значения рН среды культивирования для образования протеаз микромицетом *S. strictum* находятся в пределах 6 – 6.5. При данных значениях рН наблюдается повышение активаторной к плазминогену активности и снижение общей протеолитической активности.

3.4.4. Динамика роста и накопления протеолитических ферментов микромицета *S. strictum*

Изучение динамики роста и накопления протеолитических ферментов *S. strictum* проводили в условиях глубинного культивирования (рис. 29) в течение 168 часов. На протяжении первых двух суток культура нарастала, а с третьих суток начиналась стационарная фаза роста (рис. 29). На 5 сутки происходило замедление роста. Максимумы фибринолитической и активаторной к плазминогену активности совпадали и приходились на 4 и 6 сутки культивирования. Полученные значения составляли для фибринолитической активности 974.6 и 968.2 усл. ед./мл, а для активаторной 714.2 и 698.8 усл. ед./мл, соответственно.

Наибольшая продуктивность микромицета *S. strictum* приходилась на 2 и 4 сутки культивирования (рис. 30), максимальная скорость роста также на 4 сутки была наибольшей. По-видимому, продуктивность и рост микромицета на 4 сутки взаимосвязаны: происходит интенсивное прорастание спор, что влияет на удельную скорость роста и на образование ферментов.

Как было показано выше, подобный характер роста на жидкой питательной среде со сменой генераций также наблюдался у микромицета *A. longa*. Наличие эндогенного биоритма встречается среди микромицетов и может изменяться в зависимости от условий культивирования. Данная особенность позволяет наладить оптимальный процесс получения экзогенных ферментов из культуральной жидкости продуцента.

На среде Чапека - Докса микромицет *S. strictum* растет в виде тяжистых молочно-белых колоний (рис. 31, а). В глубинной культуре на синтетической среде, с использованием источников азота в окисленной форме, при низком соотношении углерода и азота и значениях рН, близким к нейтральным, *S. strictum* растет в виде мелкодисперсной массы, состоящей из тяжелой слабо ветвящегося мицелия, с многочисленными фиалидами и овально-палочковидными одноклеточными конидиями, длиной 3–5 мкм (рис. 31, б – е).

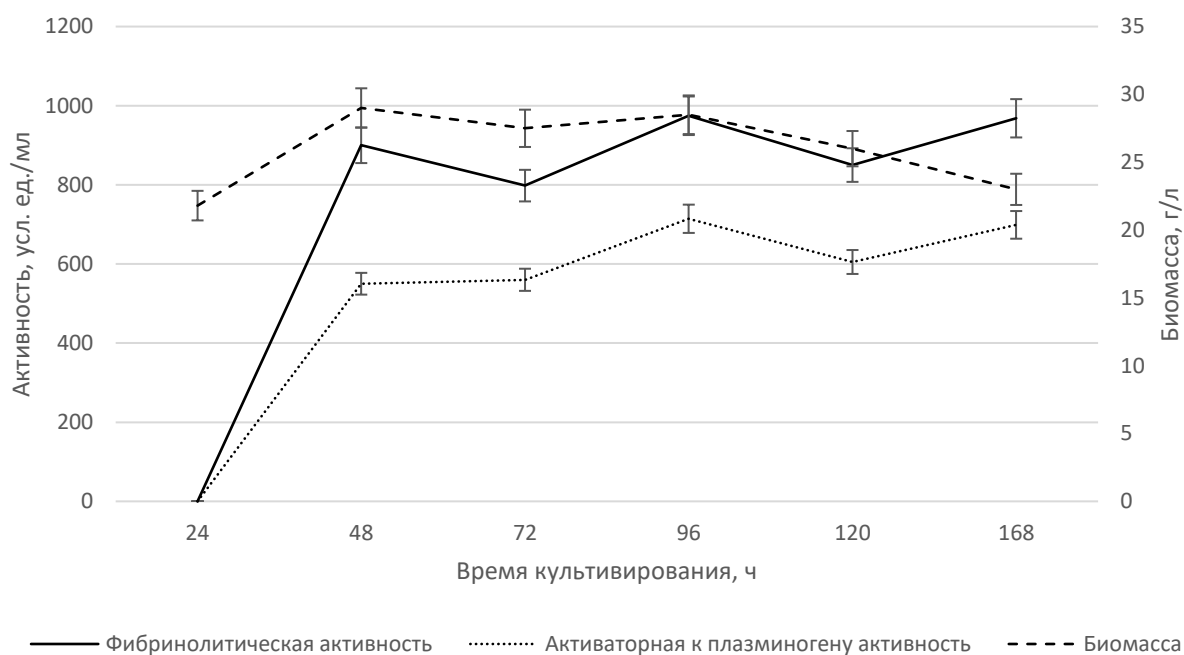


Рис. 29. Динамика роста и накопления протеолитических ферментов микромицетом *S. strictum*.

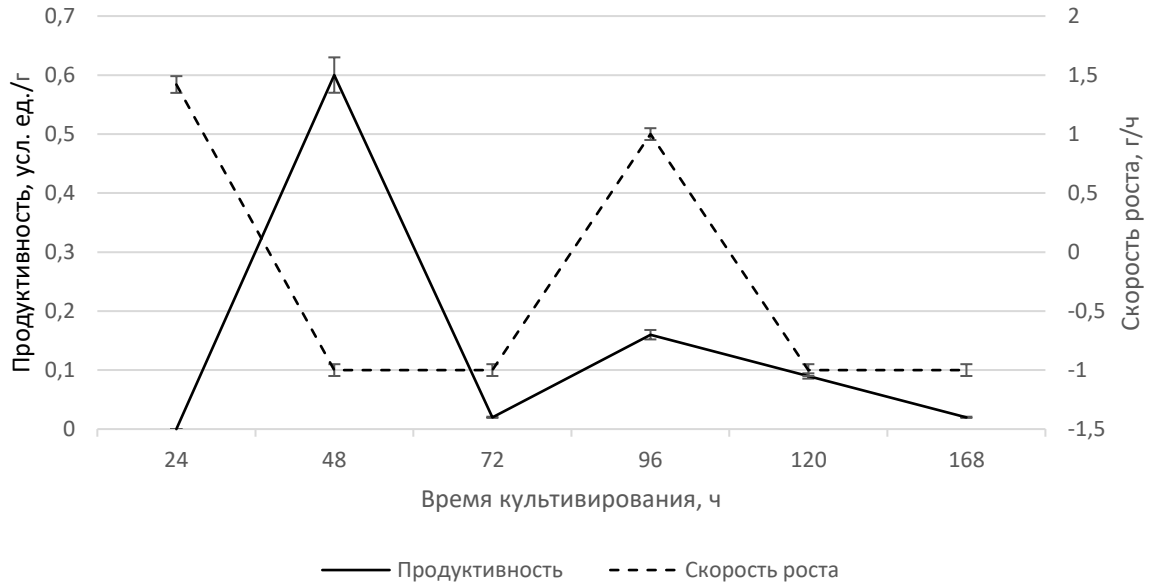


Рис. 30. Продуктивность и скорость роста в глубинных условиях культивирования микромицета *S. strictum*.

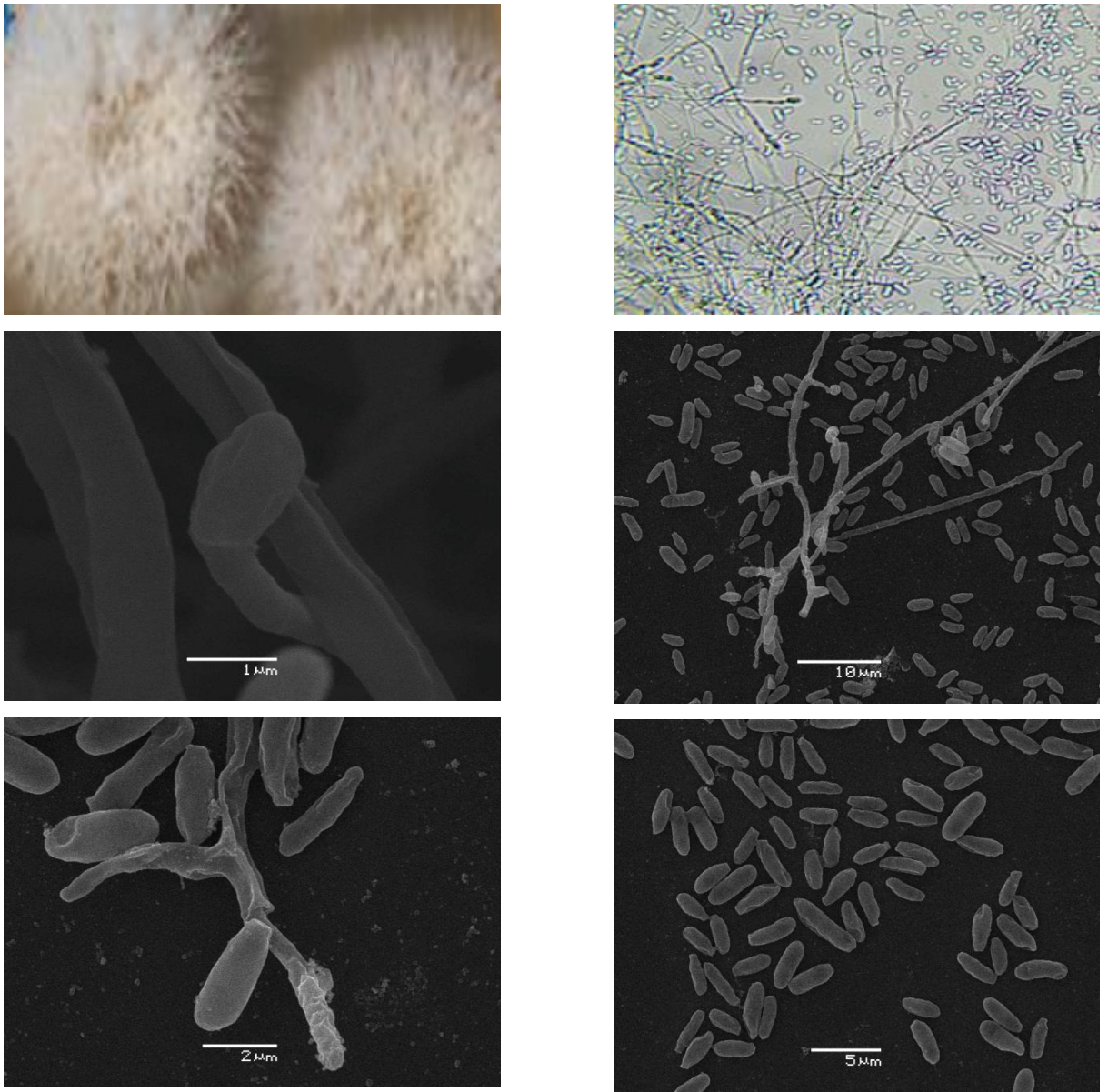


Рис. 31. Морфология микромицета *S. strictum*. Колония *S. strictum* на агаризованной среде (а), световая микроскопия *S. strictum* в глубинных условиях культивирования (400×) на 3-и сутки культивирования на посевной среде (б), электронная микроскопия (в – е) *S. strictum*: морфология конидий и конидиеносцев в стационарной фазе роста.

3.4.5. Сравнение протеолитической активности микромицетов *A.*

longa и *S. strictum*

Для изучения и сравнения протеолитической активности экзопротеаз, образованных микромицетами *A. longa* и *S. strictum*, была использована отделенная от мицелия культуральная жидкость. В качестве субстратов взяли казеин, фибрин, фибриноген. С помощью метода фибриновых пластин был изучен фибринолитический и активаторный к плазминогену потенциал микромицетов.

Общая протеолитическая активность с казеином продуцента *A. longa* превышала активность *S. strictum* на 23% и составляла 37.9 мкмоль Tyr/мл×мин, в то время как активность *S. strictum* составляла 29.2 мкмоль Tyr/мл×мин. Это показывает, что протеазы *A. longa* могут быть менее специфичны, чем у *S. strictum*.

Фибринолитическая и фибриногенолитическая активность измеренные с нативными белками, фибрином и фибриногеном соответственно, оказались на 30% выше у микромицета *A. longa*, чем у *S. strictum* (рис. 32).

Фибринолитическая и активаторная к плазминогену активность на фибриновых пластинах для двух микромицетов оказались близкими по значению. Фибринолитическая активность *A. longa* составила 751.0 усл.ед./мл, в то время как активность *S. strictum* имела значения 653.0 усл.ед./мл, что составляет порядка 10 %. В то же время активаторная к плазминогену активность *A. longa* уступает аналогичной активности *S. strictum* порядка 3% и составляют 674.3 и 697.3 усл.ед./мл соответственно.

Из полученных результатов можно сделать вывод, что новый продуцент имеет более узкопрофильные протеазы с активаторной к плазминогену активностью и поэтому его дальнейшее изучение является весьма перспективным, так как протеазы, способные расщеплять лишь конкретные субстраты, являются более биотехнологически востребованными.

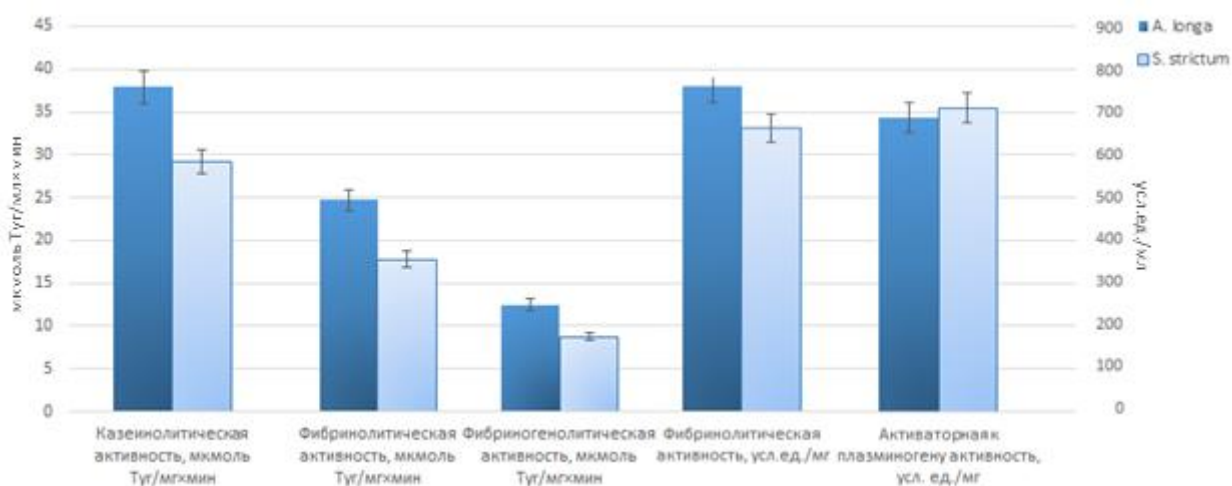


Рис. 32. Сравнение активности протеаз микромицетов по отношению к нативным белкам.

3.4.6. Сравнение активности протеаз, образуемых микромицетами *A. longa* и *S. strictum*, по отношению к хромогенным пептидным субстратам

Исследование активности протеаз обоих микромицетов в культуральной жидкости позволило выявить их некоторые сходства. Так, например, оба микромицета проявляли активность по отношению к субстратам плазмина, тромбина, урокиназы, а также тканевому активатору плазминогена и Ха – фактору (рис. 33).

Значения плазминоподобной активности и активности по отношению к ХПС фактора Ха микромицетов *A. longa* и *S. strictum* различались не более чем на 10%. Тромбиноподобная активность *A. longa* превосходила активность *S. strictum* в два раза, что делает протеазы *A. longa* менее востребованными фибринолитическими агентами, несмотря на более выраженную активность тканевого активатора плазминогена. В то же время урокиназная активность *S. strictum* на 15 % превосходила активность *A. longa* и составляла 58.7 нмоль рНА/мл×мин (против 49.8 нмоль рНА/мл×мин).

Таким образом, протеазы, образуемые *S. strictum*, имеют выраженную урокиназную активность и их можно рассматривать как потенциальный активатор плазминогена урокиназного типа. Подобная активность делает данный продуцент весьма перспективным для его дальнейшей разработки. Подобные узкоспецифичные протеазы с высокой активностью по конкретному субстрату встречаются крайне редко, а спрос на подобные препараты постоянно растет. Продукт, основанный на протеазах данного микромицета может иметь широкое применение в медицине и косметологии, а также входить в состав диагностикумов.

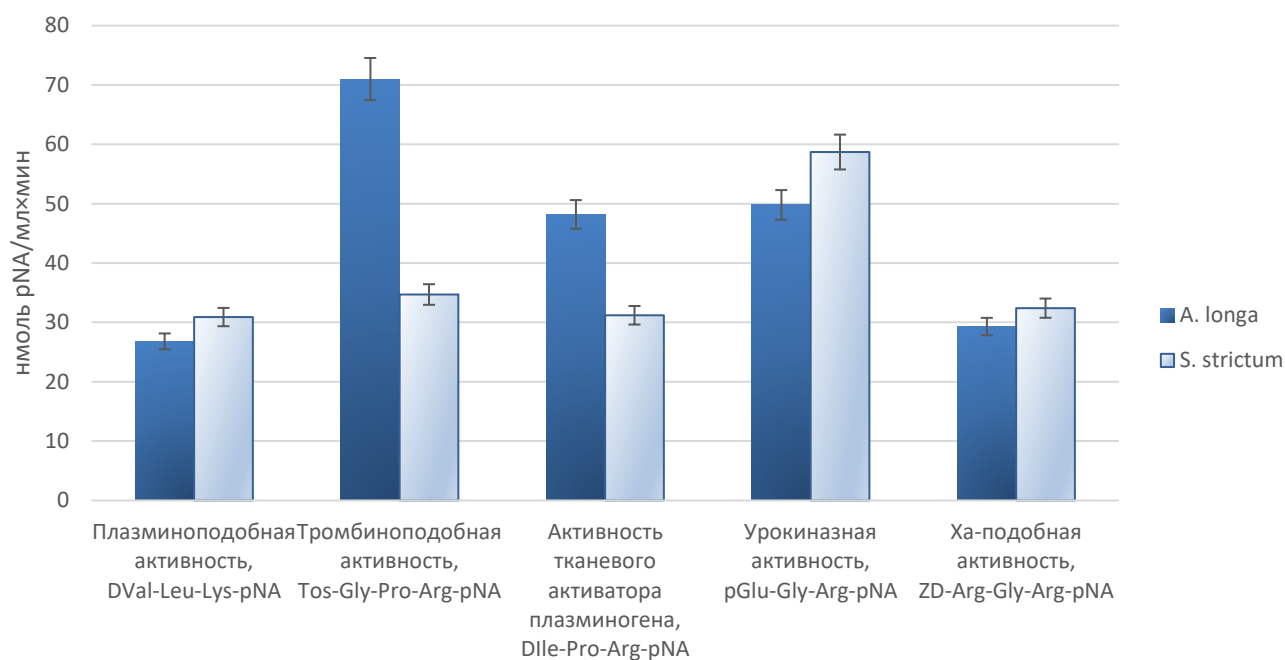


Рис. 33. Сравнение активности протеаз микромицетов *A. longa* и *S. strictum* по отношению к хромогенным пептидным субстратам.

3.5. Биохимические свойства протеолитического комплекса, образованного микромицетом *S. strictum*

Анализ фибринолитического комплекса внеклеточных протеаз штамма микромицета *S. strictum* включал в себя различные биохимические и физиологические методы оценки активности. Для дальнейшей работы был использован препарат, выделенный из культуральной жидкости микромицета. Комплекс фибринолитических ферментов, образуемый микромицетом *S. strictum* получил рабочее название «Стриктолиаза».

3.5.1. Сравнение очищенных препаратов протеаз, образуемых микромицетами *A. longa* и *S. strictum*

Для сравнения активности изучаемых протеаз были использованы очищенные и высушенные препараты микромицетов *A. longa* (Лонголитин) и *S. strictum* (Стриктолиаза).

При изучении урокиназной активности препаратов (рис. 34) было обнаружено, что разница в активности препаратов Стриктолиаза и Лонголитин составляет порядка 15%. Фибринолитическая активность Лонголитина оказалась примерно в 2 раза выше, чем у Стриктолиазы (435.15 усл. ед/мг против 240.18 усл. ед/мг). При изучении активаторной к плазминогену активности были обнаружены различия в активностях не более чем на 10%. Так, изучаемая активность у Лонголитина составила 203.48 усл. ед/мг, а у Стриктолиазы – 229.35 усл. ед/мг.

Высокая фибринолитическая активность Лонголитина, по сравнению со Стриктолиазой, может делать данный препарат менее востребованным для медицины, поскольку, как ранее упоминалось, для современной медицины предпочтительнее использование не прямых фибринолитических препаратов, а препаратов – активаторов плазминогена.

Очевидно, что препарат Стриктолиаза проявляет высокую активаторную активность урокиназного типа, что делает данный ферментный комплекс весьма интересным аналогом уже изученных препаратов.

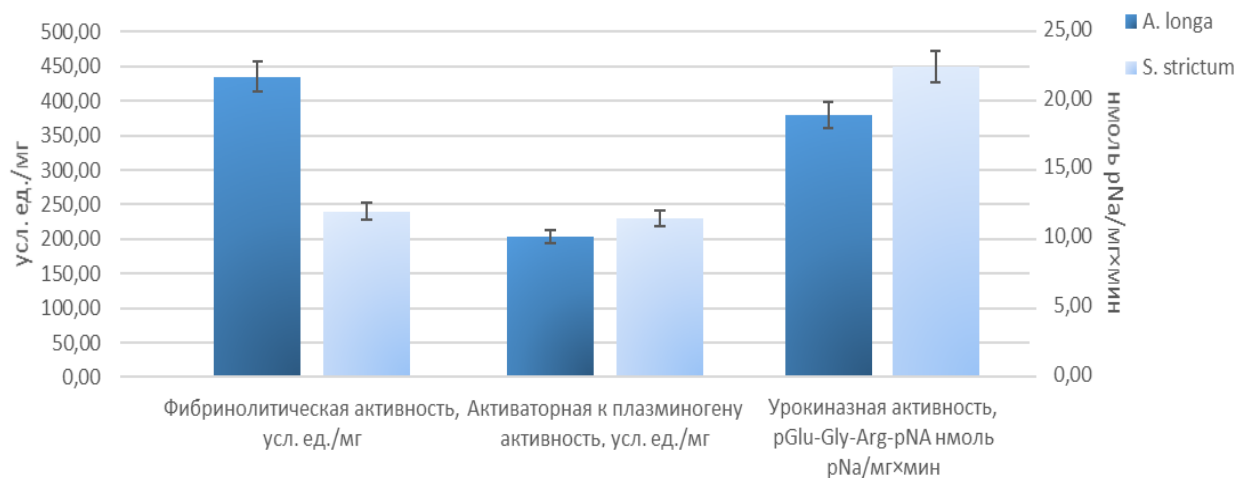


Рис. 34. Сравнение активностей препаратов протеаз, образуемых микромицетами *A. longa* и *S. strictum*.

3.5.2. Изоэлектрофокусирование препарата протеаз микромицета *S. strictum*

Для дальнейшего изучения компонентов препарата Стриктолиазы проводили разделение белков методом изоэлектрофокусирования в колонке с градиентом концентрации сахарозы 0-40% и градиентом рН амфолинов 3.0-10.0. Так как ранее данный препарат проявлял ярко выраженную урокиназную активность, то поиск активных белков проводился с использованием рGlu-Gly-Arg-рNA субстрата. Также смотрели расщепление казеина для обнаружения белков с общей протеолитической активностью.

Определение общей протеолитической активности с казеином во фракциях, позволило обнаружить присутствие протеаз в щелочной области с рН 11.8 (рис. 35). Также было замечено разделение по белку в кислой и нейтральной областях рН. Так как ранее препарат проявлял высокую урокиназную активность, то было необходимо выявить данную активность в послефокусировочных фракциях. Была обнаружена протеаза с ярко выраженной урокиназной активностью с рI 4.5, а также протеаза с рI 7.2.

Исходя из полученных данных, можно говорить о присутствии минимум трех протеаз *S. strictum* (протеазы I, II и III), в составе комплексного препарата.

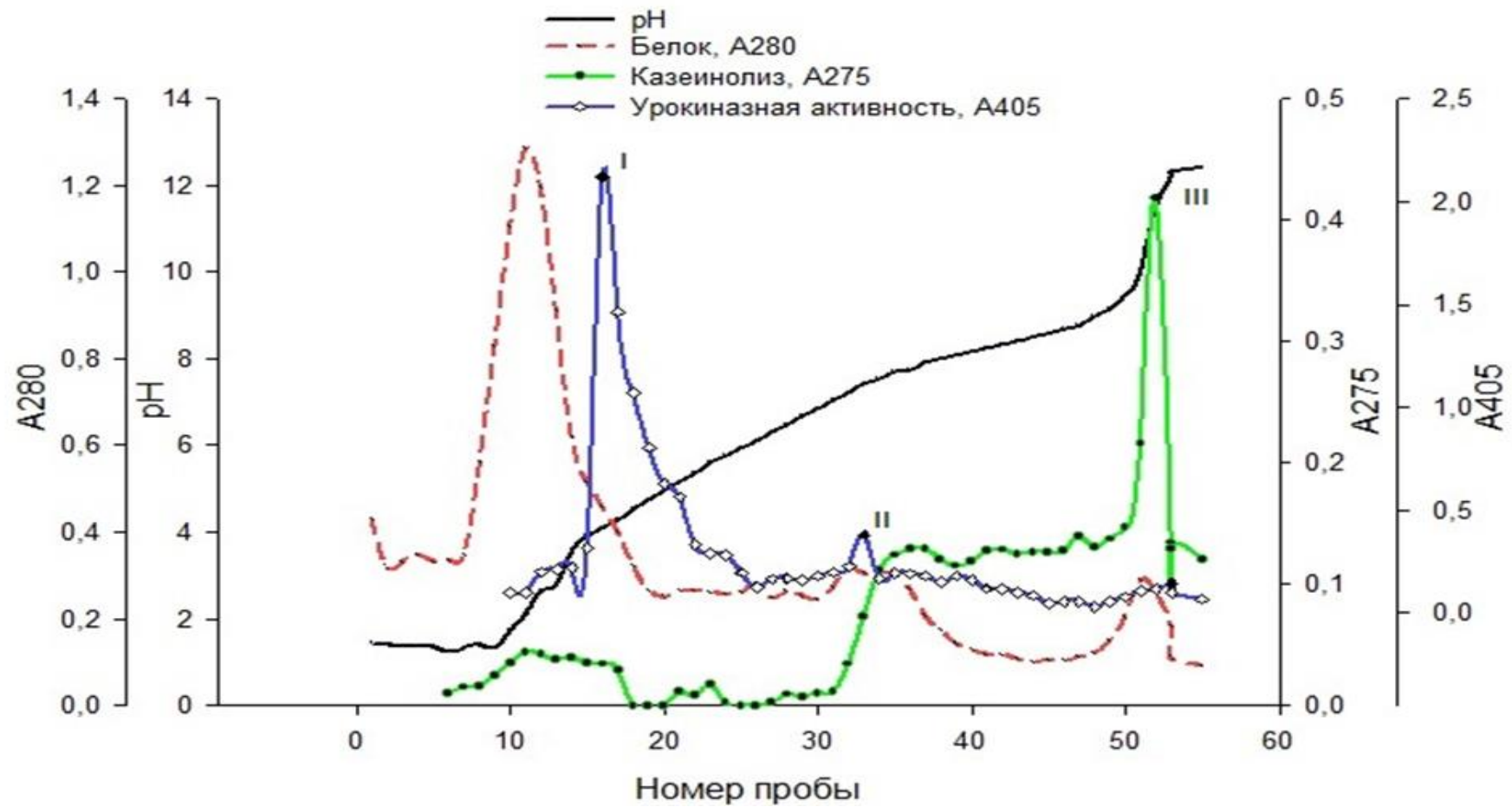


Рис. 35. Изоэлектрофокусирование препарата протеаз, образуемых микромицетом *S. strictum*.

3.5.3. Сравнение препарата протеаз *S. strictum* с коммерческими аналогами

Для определения биотехнологического потенциала нового продуцента было проведено сравнение выделенного фибринолитического комплекса с ранее изученными препаратами микромицетов, а также с препаратами, применяемыми на практике. Был использован широкий ряд субстратов для определения возможностей применения нового препарата (табл. 7). Изучаемые типы активностей имеют большой практический интерес и являются первостепенными для определения перспективности новых препаратов. Сравнение проводили в стандартных условиях.

Для сравнения были выбраны препараты протеаз микромицетов, которые находятся на стадии разработки или уже используются в медицинских целях - Террилитин, внеклеточные препараты протеаз *Tolypocladium inflatum*, *Aspergillus ochraceus* и *Arthrobotrys longa*, а также плазмин человека. Все использованные препараты проявляют высокую фибринолитическую или активаторную к плазминогену активность.

Террилитин является коммерческим препаратом в основе которого находится фермент террилитин, получаемый из нативных растворов *Aspergillus terricola* Н-20. Данный препарат является протеолитическим средством и применяется при расщеплении некротической ткани, кровяных сгустков и гнойных экссудатов (Нынь и др., 2007; Мирзаев и др., 2021).

Плазмин является белком плазмы крови и представляет собой трипсиноподобную протеазу, которая разрушает фибриновые сгустки (Айсина и др., 2014).

Внеклеточная сериновая протеаза микромицета *Tolypocladium inflatum* является фибринолитиком с активаторным к плазминогену действием (Шаркова и др. 2016).

Препарат, полученный из культуральной жидкости микромицета *Aspergillus ochraceus*, является активатором протеина С, одного из главных

компонентов антикоагулянтной системы крови. Протеин С участвует в контроле тромбообразования, блокировании воспаления и ингибировании апоптоза. Таким образом, данный ферментный комплекс обладает фибринолитическим и антикоагуляционным действием (Osmolovskiy, 2020).

Изучение общей протеолитической активности с казеином показало, что протеолитический комплекс, образуемый *S. strictum* обладает низким сродством к казеину (184.88 мкмоль Tyr/мг×мин) по сравнению с препаратами протеаз других микромицетов. Наибольшую общую протеолитическую активность показал террилитин (1948.95 мкмоль Tyr/мг×мин). Также высокую активность по отношению к данному субстрату наблюдали у препарата протеаз *Aspergillus ochraceus* (543.05 мкмоль Tyr/мг×мин). Наименьшую казеинолитическую активность наблюдали у плазмина, она составила 91.4 мкмоль Tyr/мг×мин.

Несмотря на низкое содержание белка в препарате, протеолитический комплекс, образуемый микромицетом *S. strictum*, обладает высокой активаторной к плазминогену активностью (3492.44 усл. ед./мг). Также высокую активаторную к плазминогену активность проявили Лонголитин (2259.76 усл. ед./мг) и плазмин (1913.28 усл. ед./мг). Фибринолитическая активность, выявленная методом фибриновых пластин, нового препарата была также высока по сравнению с другими препаратами и составила 2030.49 усл. ед./мг. Также высокую фибринолитическую активность показали Лонголитин (2180.48 усл. ед./мг) и Террилитин (1832.53 усл. ед./мг). Активаторная к плазминогену и фибринолитическая активность протеаз микромицета *Tolyrocladium inflatum* имела выраженный характер, но при расчете на удельную активность составила 430.12 и 693.75 усл. ед./мг, соответственно, что несколько ниже ранее представленных препаратов.

Протеолитический комплекс *S. strictum* проявил достаточно высокую фибринолитическую (116.34 мкмоль Tyr/мг×мин) и фибриногенолитическую (184.88 мкмоль Tyr/мг×мин) активность при взаимодействии с фибрином и фибриногеном соответственно. Из препаратов сравнения высокую

активность проявил лишь препарат Лонголитин (175.48 и 235.48 мкмоль Тур/мг×мин, соответственно).

При сравнении субстратной специфичности с хромогенными пептидными субстратами со свойствами белков системы гемостаза, протеолитический комплекс *S. strictum* проявил ярко выраженную урокиназную активность, значение которой составило 656.09 нмоль рНА/мг×мин. Схожую по значению активность проявил только Лонголитин (555.24 нмоль рНА/мг×мин), который проявил высокое сродство по отношению к данному субстрату. Плазминоподобная активность у изучаемого комплекса составила 84.63 нмоль рНА/мг×мин.

Таким образом, препарат протеаз микромицета *S. strictum*, обладает низкой общей протеолитической активностью и высокой способностью активировать плазминоген по урокиназному пути, что дает возможность рассматривать его применение в качестве медицинского препарата или использовать в составе диагностикумов наравне с известными аналогами.

Таблица 7.

Сравнение препарата, образуемого *S. strictum* с известными аналогами.

Удельная активность	Внеклеточная протеаза <i>Sarocladium strictum</i>	Лонголитин, протеаза <i>Arthrobotrys longa</i>	Внеклеточная протеаза <i>Tolypocladium inflatum</i>	Внеклеточная протеаза <i>Aspergillus ochraceus</i>	Террилитин	Плазмин
Казеинолитическая, мкмоль Тур/мг×мин	184.88 ± 11.2	120.24 ± 11.1	106.12 ± 11.4	543.05 ± 11.7	1948.95 ± 18.6	91.4 ± 12.2
Фибринолитическая, усл ед/мг	2030.49 ± 29.7	2180.48 ± 28.9	693.75 ± 18.9	536.93 ± 9.9	1832.53 ± 18.1	715.66 ± 16.5
Активаторная к плазминогену, усл ед/мг	3492.44 ± 29.3	2259.76 ± 29.1	430.12 ± 18.5	340.77 ± 9.3	266.67 ± 9.5	1913.28 ± 18.5
Фибринолитическая, мкмоль Тур/мг×мин	116.34 ± 10.9	175.48 ± 9.1	10.95 ± 9.2	66.56 ± 8.1	121.44 ± 8.1	35.7 ± 4.8
Фибриногенолитическая, мкмоль Тур/мг×мин	184.88 ± 9.1	235.48 ± 10.9	77.46 ± 10.1	53.32 ± 9.2	117.68 ± 7.1	33.25 ± 4.2
Урокиназная, нмоль рNA/мг×мин	656.09 ± 10.6	555.24 ± 10.3	1.12 ± 0.1	0.38 ± 0.1	1.15 ± 0.1	9.21 ± 1.5
Плазминоподобная, нмоль рNA/мг×мин	84.63 ± 9.9	66.90 ± 9.7	3.04 ± 0.2	34.12 ± 2.1	63.12 ± 4.3	69.29 ± 4.8

3.5.4. Способность протеаз микромицета *S. strictum* к лизису тромба *in vitro*

Для изучения способности протеаз микромицета *S. strictum* лизировать тромб *in vitro* были использованы протеазы I, II и III, полученные из послефокусировочных фракций.

Как видно из рис. 36, протеаза III вносила наибольший вклад в тромболитический потенциал препарата, а доля нелизированного тромба по прошествии 90 минут составила 42.9%. Протеазы I и II вносили меньший вклад, и доля нелизированных тромбов составила 58 и 63.2%, соответственно.

Исходя из полученных данных, можно предположить, что суммарный препарат будет обладать большей активностью в отношении фибриновых сгустков и гематом, если рассматривать его дальнейшее применение в качестве фибринолитического средства. Для использования в качестве диагностикума, напротив, его разделение является предпочтительнее. Такая двойственность данного комплексного препарата делает его применение удобным и вариативным.

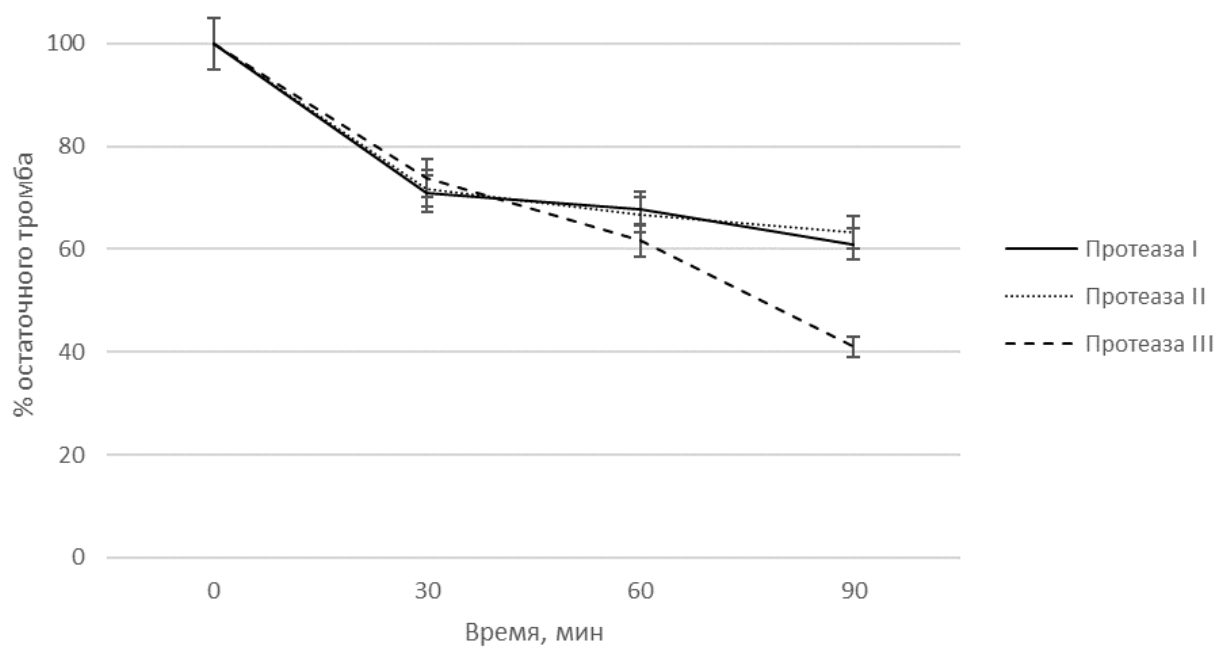


Рис. 36. Тромболизис протеазами микромицета *S. strictum*.

Протеаза I – рI 4.5;

Протеаза II – рI 7.2;

Протеаза III – рI 11.8.

3.5.5. Влияние ингибиторов протеолитических ферментов на протеазы, образуемые микромицетом *S. strictum*

Для установления класса изучаемых протеаз был проведен ингибиторный анализ (рис. 37, 38, 39). Наибольшее ингибирующее действие на активность протеаз I и II оказал соевый ингибитор трипсина в соотношениях 1:10 и 1:100. Также небольшой ингибиторный эффект на активность протеазы I оказывали ТРСК (ингибитор химотрипсиновых протеаз) и PMSF (ингибитор сериновых протеаз), а активность протеазы II частично ингибировалась PMSF. Протеаза III теряла активность под действием соевого ингибитора трипсина и PMSF в соотношениях 1:10 и 1:100. Активность протеаз также незначительно ингибировалась п-ХМБ, взаимодействующим с тиоловыми группами. Таким образом, можно предположить, что протеазы *S. strictum* являются трипсиноподобными тиолзависимыми протеазами серинового типа.

Также для протеаз I и II было обнаружено, что добавление в реакционную смесь гепарина увеличивает активность изучаемых протеаз (рис. 40). Активирующее действие гепарина было не раз отмечено в источниках литературы для Лонголитина и Террилитина (Миргородская и др., 1978). Добавление гепарина в реакционную среду способно существенно повысить активаторную к плазминогену активность протеолитического комплекса. Также при его добавлении снижается активность протеазы III, которая обладает общей протеолитической активностью. Такая особенность делает протеазы микромицета *S. strictum* востребованными для дальнейшей разработки препаратов на их основе.

При добавлении ϵ -аминокапроата и аскорбата натрия наблюдали незначительное снижение активности протеаз, входящих в комплексный препарат. Снижение активности некоторых протеаз было до не более 85% от исходной, либо отсутствовало. Таким образом, эти биологические добавки не оказывают существенного влияния на активности данного комплекса.

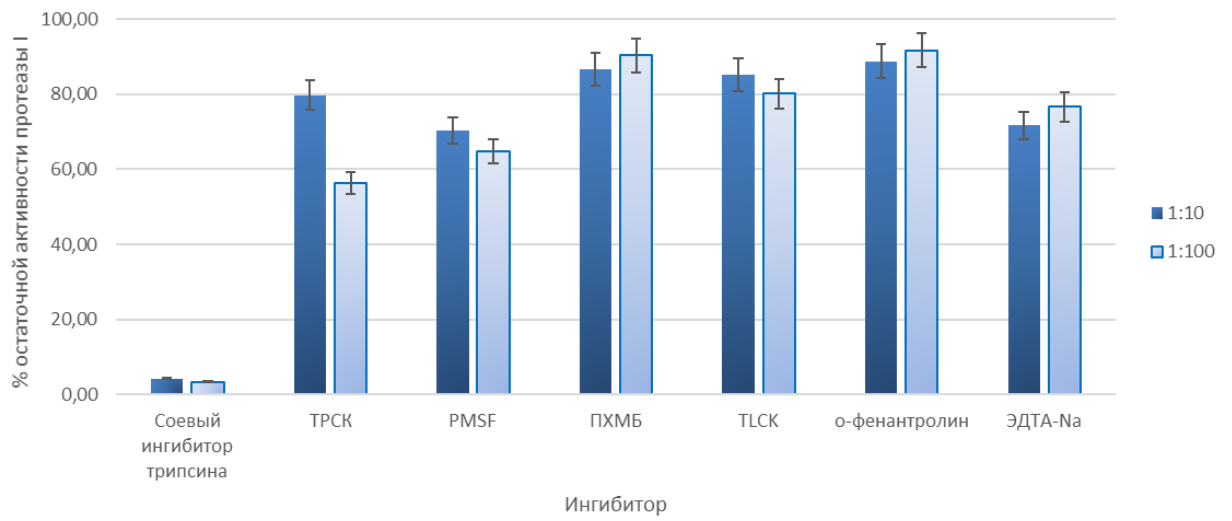


Рис. 37. Ингибиторный анализ протеазы I микроциста *S. strictum*.

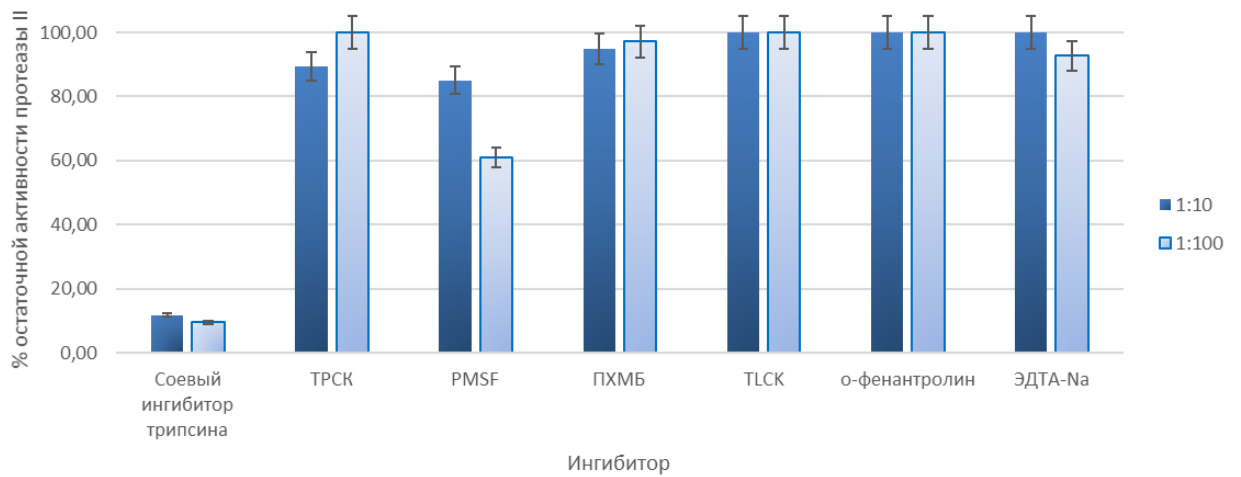


Рис. 38. Ингибиторный анализ протеазы II микроциста *S. strictum*.

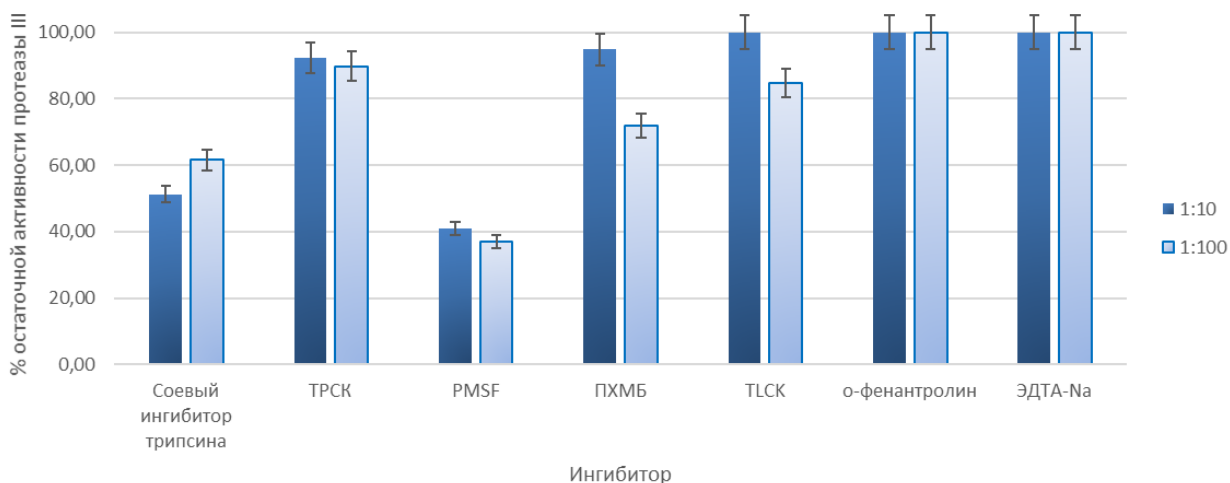


Рис. 39. Ингибиторный анализ протеазы III микромицета *S. strictum*.

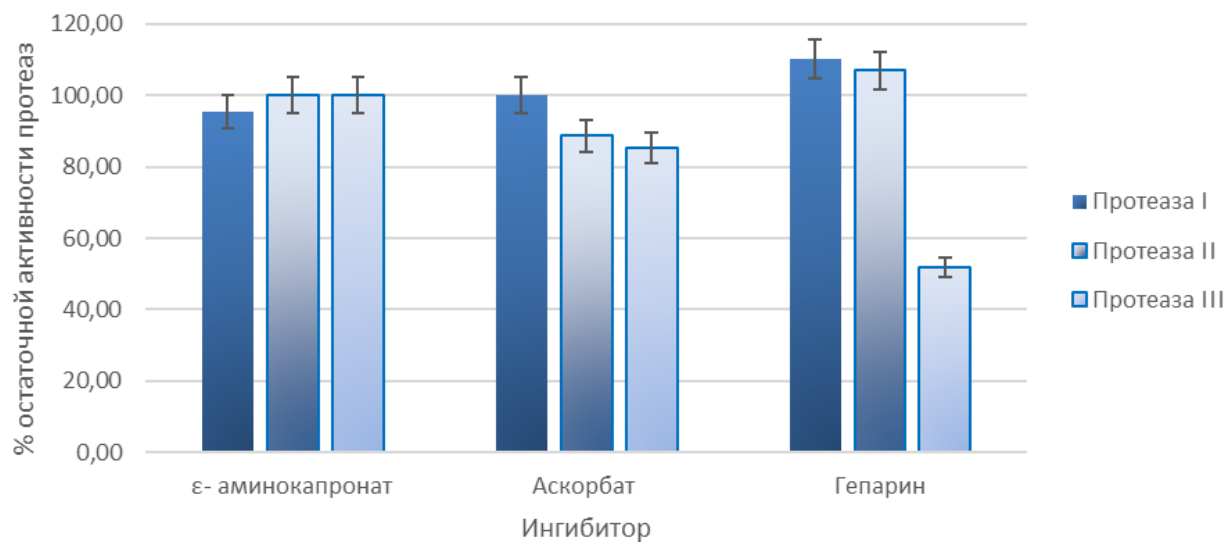


Рис. 40. Ингибирующий и активирующий эффект ε-аминокапроната, аскорбата и гепарина на протеазы микромицета *S. strictum*.

3.5.6. pH-стабильность и pH-оптимум работы протеаз, образованных микромицетом *S. strictum*

Изучение pH-стабильности протеаз, входящих в состав комплексного препарата ферментов микромицета *S. strictum*, показало, что активность протеазы I сдвинута в щелочную область (рис. 41). Протеазы II и III сохраняли высокую активность в нейтральной области pH. В то же время как кислые значения pH (до 5) и щелочные (с 11) подавляли активность всех трех изучаемых протеаз, что коррелирует со значениями pH-стабильности протеазы микромицета *A. ochraceus* VKM F4104D, которая также была активна в диапазоне pH 5 – 10 (Осмоловский, 2015).

pH-оптимум активности протеазы I находился около 10 (рис. 42). Протеаза II проявляла одинаково высокую активность в диапазоне pH от 5 до 8. Оптимум работы протеазы III находился около 9.

Из полученных данных следует, что оптимальные условия pH для работы с этим комплексным препаратом находятся в нейтрально – щелочных условиях. Полученные результаты по pH-активности коррелируют со значением pH крови, что дает возможность в дальнейшем использовать данный препарат для клиники в качестве тромболитика, а также в качестве средства для наружного применения.

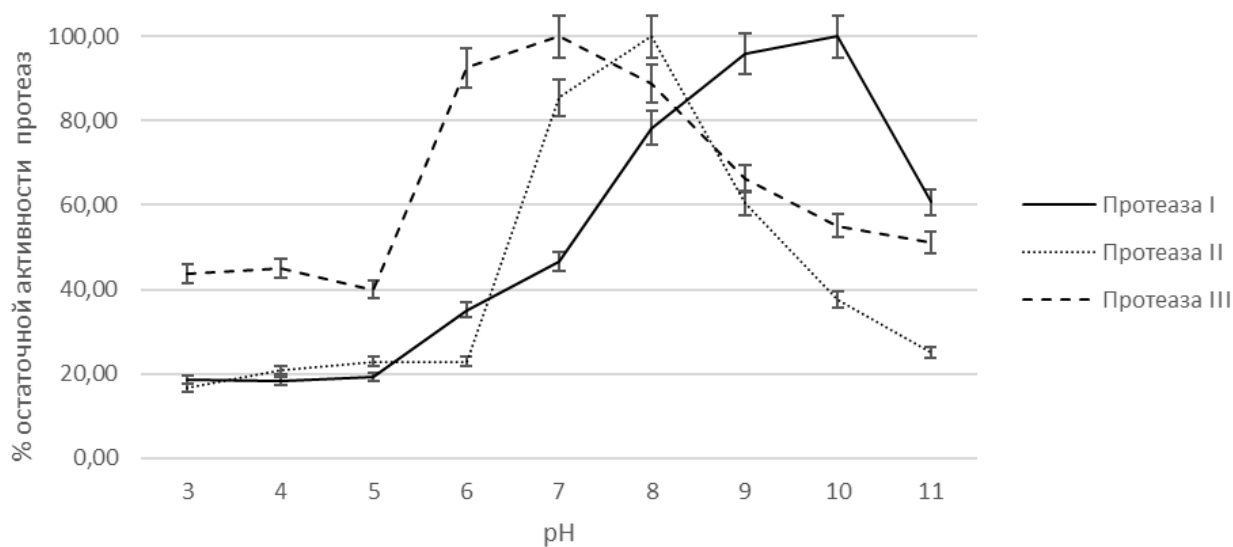


Рис. 41. pH-стабильность протеаз микромицета *S. strictum*.

Протеаза I – pI 4.5; протеаза II – pI 7.2; протеаза III – pI 11.8.

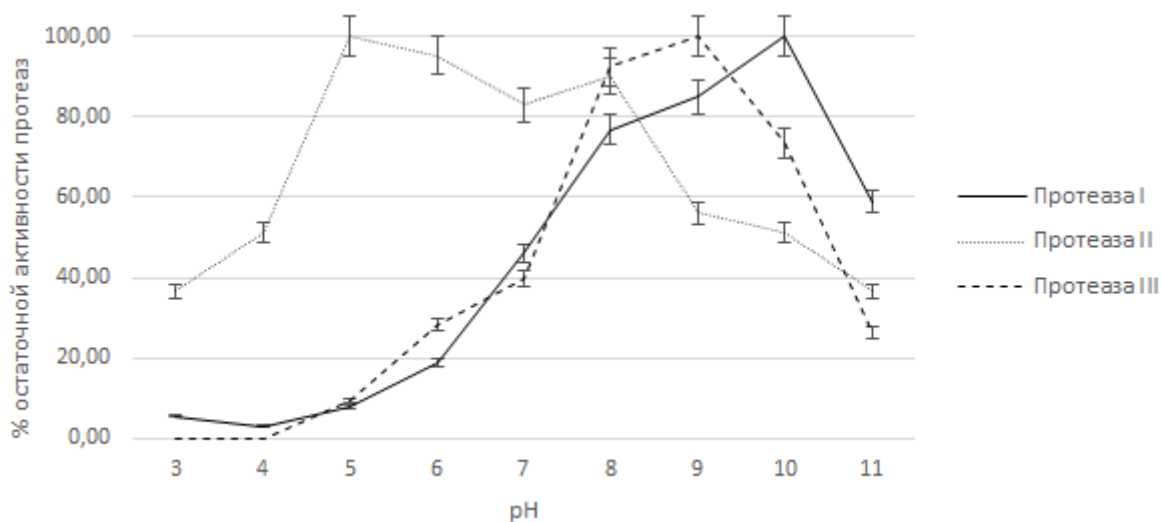


Рис. 42. pH-оптимум активности протеаз микромицета *S. strictum*.

Протеаза I – pI 4.5; протеаза II – pI 7.2; протеаза III – pI 11.8.

3.5.7. Термостабильность и температурный оптимум работы протеаз, образуемых микромицетом *S. strictum*

В результате изучения термостабильности протеаз *S. strictum* было показано, что протеаза I проявляла высокую урокиназную активность и была стабильна после трех часов инкубации при +30 и +37°C (рис. 43). Протеазы II и III проявляли высокую активность после инкубации при +30°C. После трех часов инкубации при +55°C все изучаемые протеазы инактивировались, что коррелирует с данными полученными при изучении протеазы микромицета *A. ochraceus*, которая сохраняла свою активность при тех же температурных показателях (Осмоловский, 2015).

Температурный оптимум работы протеаз I и II составляет +55°C (рис. 44). Протеаза III была одинаково активна в диапазоне от +37 до +55°C. При температуре выше +55 °C все изучаемые протеазы инактивировались.

Полученные данные дают возможность предположить, что изучаемый препарат будет иметь высокую эффективность при лечении и профилактике тромбозов. Активности всех трех протеаз являются достаточно высокими при использовании их при физиологически нормальной температуре тела.

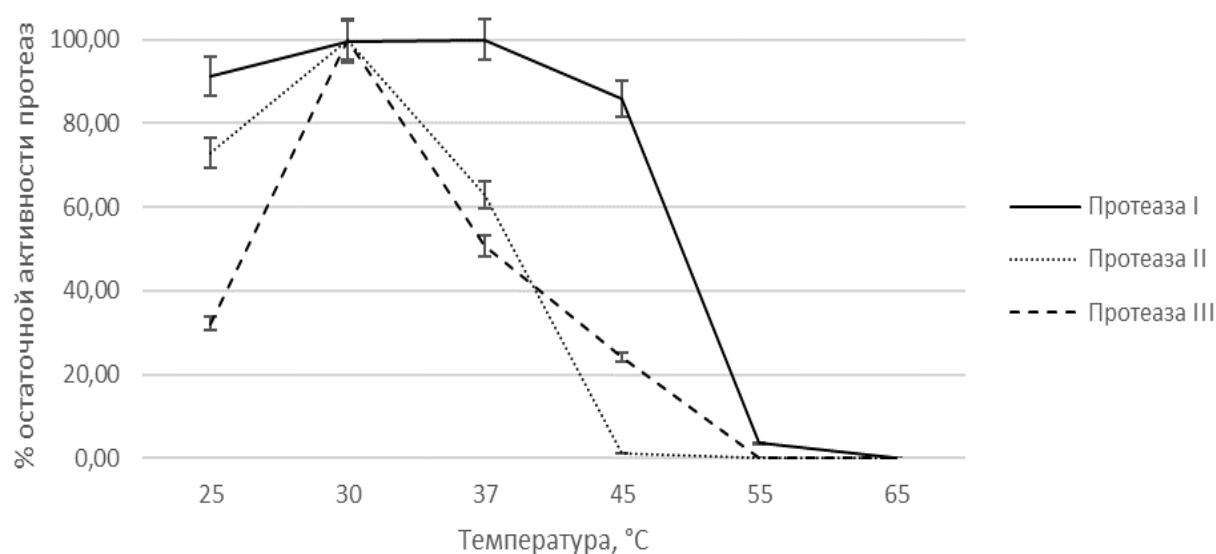


Рис. 43. Термостабильность протеаз микромицета *S. strictum*.

Протеаза I – pI 4.5; протеаза II – pI 7.2; протеаза III – pI 11.8.

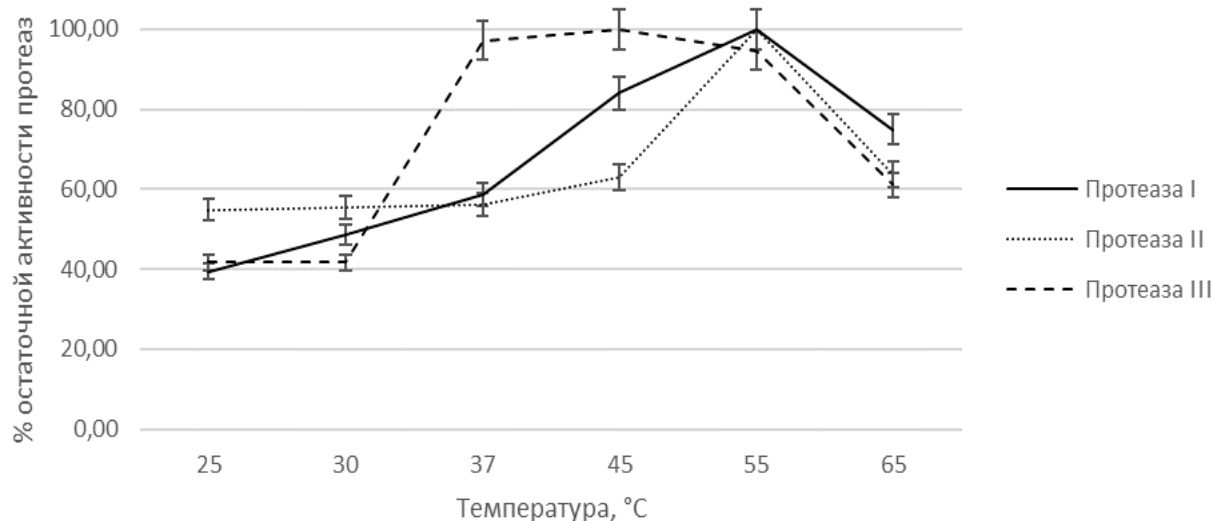


Рис. 44. Температурный оптимум активности протеаз микромицета *S. strictum*. Протеаза I – pI 4.5; протеаза II – pI 7.2; протеаза III – pI 11.8.

3.5.8. Содержание углеводного компонента во внеклеточных протеазах *S. strictum*

Определение углеводного компонента в исследуемых послефокусировочных пиковых фракциях проводили с помощью периодной кислоты и реактива Шиффа (фуксинсернистой кислоты) методом дот-блоттинга на нитроцеллюлозе (Thronton et al., 1996). Поскольку гликозилированные белки широко распространены среди эукариот, определение данной посттрансляционной модификации, представляющее собой присоединение к полипептидной цепи углеводных остатков, является чрезвычайно важным для последующей разработки способа клонирования протеаз *S. strictum*.

Определение углеводного компонента в составе изучаемых протеаз дало следующий результат (рис. 45). Видно, что наиболее гликозилированной

оказалась протеаза I, чуть меньше – протеаза II. В составе протеазы III гликопротеинов не обнаружено.

Полученные данные дают возможность рассматривать возможность клонирования данных генов протеаз в прокариотических организмах.

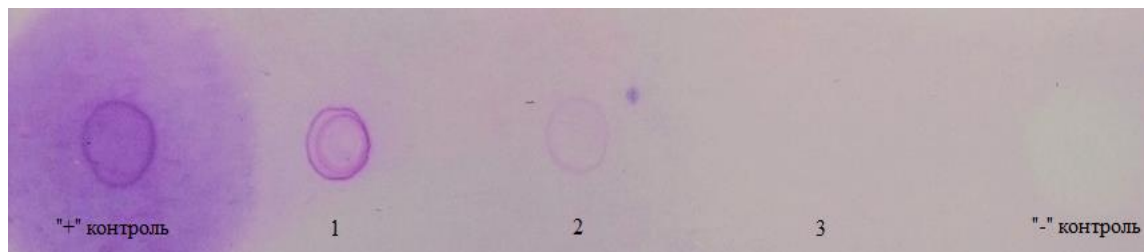


Рис. 45. Определение углеводного компонента в составе протеаз *S. strictum*: «+» – положительный контроль: инвертаза дрожжей; **1**, **2** и **3** – протеазы I, II и III, соответственно (фракции после ИЭФ); «-» – отрицательный контроль: БСА.

3.5.9. Электрофоретический анализ протеаз микромицета *S. strictum*

Денатурирующий электрофорез комплексного препарата и выделенных протеаз микромицета *S. strictum* проводили по методу Лэммли (Laemmly, 1970). Было показано, что выделенные протеазы представляют собой гомогенные белки и имеют молекулярную массу около 35 кДа (рис. 46). На данном рисунке представлены три послефокусировочные фракции, содержащие протеазы I, II и III с pI 4.5, 7.2 и 11.8 соответственно, а также комплексный препарат Стриктолиаза. Такие значения молекулярной массы характерны для экзопротеаз грибного происхождения, молекулярные массы которых находятся в диапазоне 27 – 41 кДа (Sadhasivam, 2011).

Белки с молекулярной массой 35 кДа трудно проходят через кожные барьеры. Поэтому применение Стриктолиазы в качестве средства для наружного применения остается открытым вопросом. Но в то же время известен препарат на основе гепарина (гепариновая мазь) с доказанной

эффективностью. Длина цепи гепарина может быть различна, и молекулярная масса может колебаться от 3 до 40 кДа. Гепарин является самым часто назначаемым препаратом по данным ВОЗ (Мировая статистика здравоохранения, 2020).

Таким образом, тщательный подбор носителя, дозировки и способа применения делает фармацевтическую субстанцию на основе Стриктолиазы весьма востребованной в современной клинической практике.

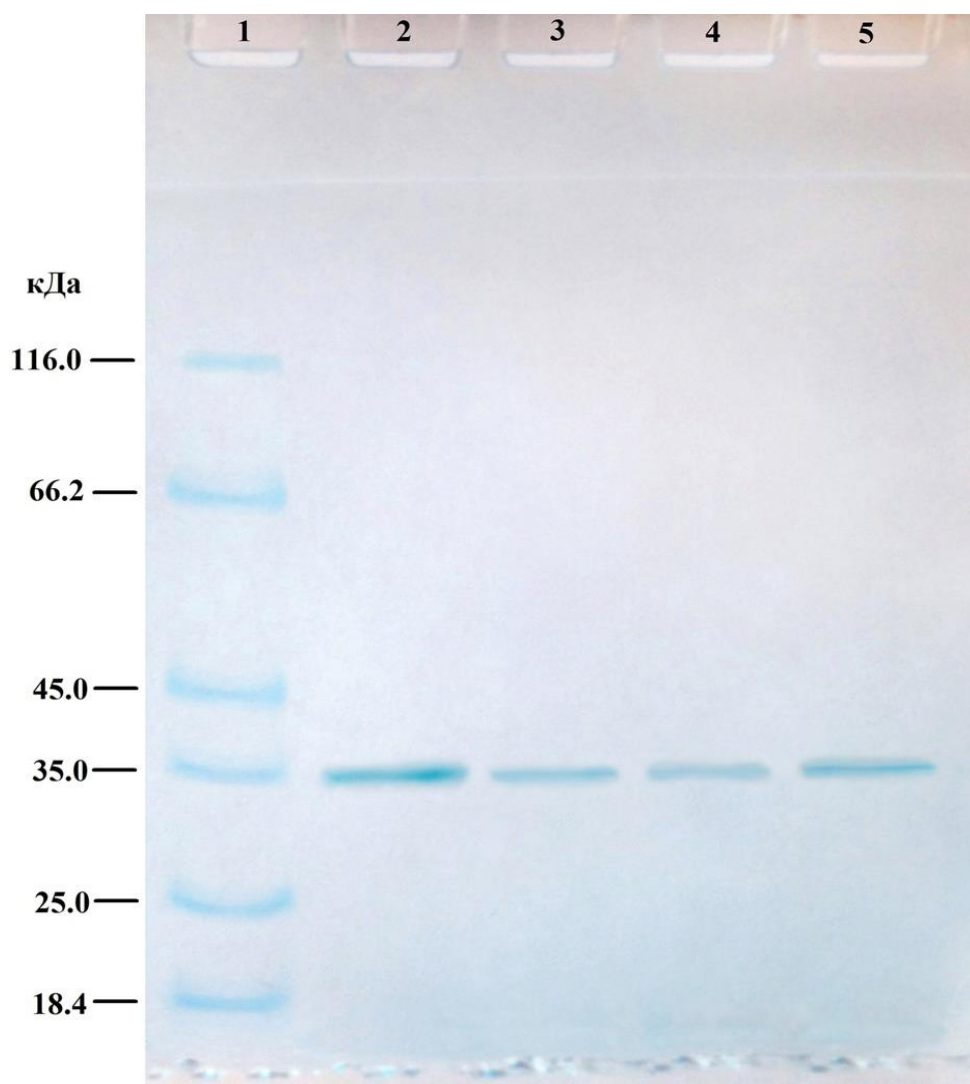


Рис. 46. Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле.
М – метчики, 1 – препарат, 2-4 – протеазы I, II и III.

3.5.10. Ограниченный протеолиз плазминогена и расщепление фибриногена протеазами *S. strictum*

Для наглядного подтверждения ограниченного протеолиза плазминогена и расщепления фибриногена препаратом Стриктолиаза, полученным из культуральной жидкости микромицета *S. strictum*, проводили денатурирующий электрофорез после его инкубации с соответствующими белками. В качестве сравнительного контроля использовали препарат Стрептокиназу, получаемый из *Streptococcus haemolyticus*, - препарат с активаторной к плазминогену активностью, использующийся в медицинской практике.

В результате инкубации со Стриктолиазой (рис. 47) плазминоген подвергался частичному протеолизу под воздействием протеаз этого комплекса. Реакция происходит достаточно быстро и уже через 5 мин. инкубации было заметно частичное расщепление плазминогена. После 10, 15 и 20 мин. инкубации процент плазминогена, подвергшегося ограниченному протеолизу, не менялся, что указывает на высокую скорость реакции расщепления.

В сравнении со Стрептокиназой, которая расщепляла плазминоген на 2 фрагмента, Стриктолиаза расщепляла его на 6 и более фрагментов. Это может указывать на высокое сродство Стриктолиазы к плазминогену и доступность данного субстрата для фермента.

При сокращении времени инкубации Стриктолиазы и плазминогена (рис. 48) можно было наблюдать образование продуктов протеолиза уже через 5 секунд с момента начала инкубации. При этом еще сохранялись высокомолекулярные фрагменты субстрата около 50 кДа, но их было значительно меньше по сравнению с нативным субстратом, где преобладали фрагменты в 35 и 50 кДа.

При взаимодействии Стриктолиазы с фибриногеном также наблюдалась быстрая деградация субстрата на большое количество низкомолекулярных остатков (рис. 49). По прошествии 5 и 10 секунд заметно снижалось

количество высокомолекулярных компонентов фибриногена. На 20 секундах инкубации в реакционной среде фактически не наблюдали остатков больше 50 кДа. Данная реакция, как и реакция с плазминогеном, также протекала с достаточно высокой скоростью, что говорит о высоком сродстве фермента к данному субстрату.

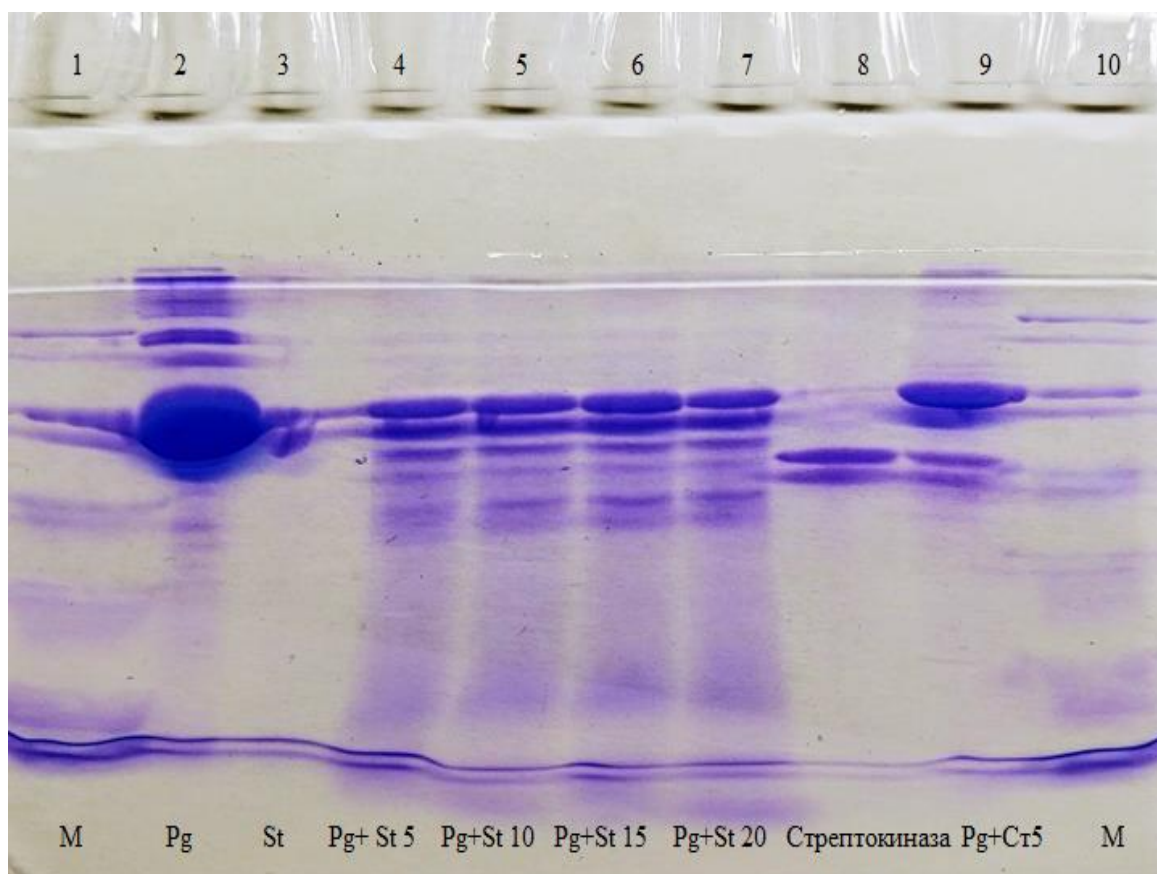


Рис. 47. Ограниченный протеолиз плазминогена Стриктолиазой и Стрептокиназой: М – метчики; Pg – плазминоген; St – Стриктолиаза (протеолитический комплекс, образованный *S. strictum*); Pg + St 5 – плазминоген и Стриктолиаза 5 мин. инкубации; Pg + St 10 – плазминоген и Стриктолиаза, 10 мин. инкубации; Pg + St 15 – плазминоген и Стриктолиаза 15 мин. инкубации; Pg + St 20 – плазминоген и Стриктолиаза, 20 мин. инкубации; Стрептокиназа – активатор плазминогена из *Streptococcus haemolyticus*; Pg + Ст. 5 – плазминоген и стрептокиназа, инкубация 5 мин.

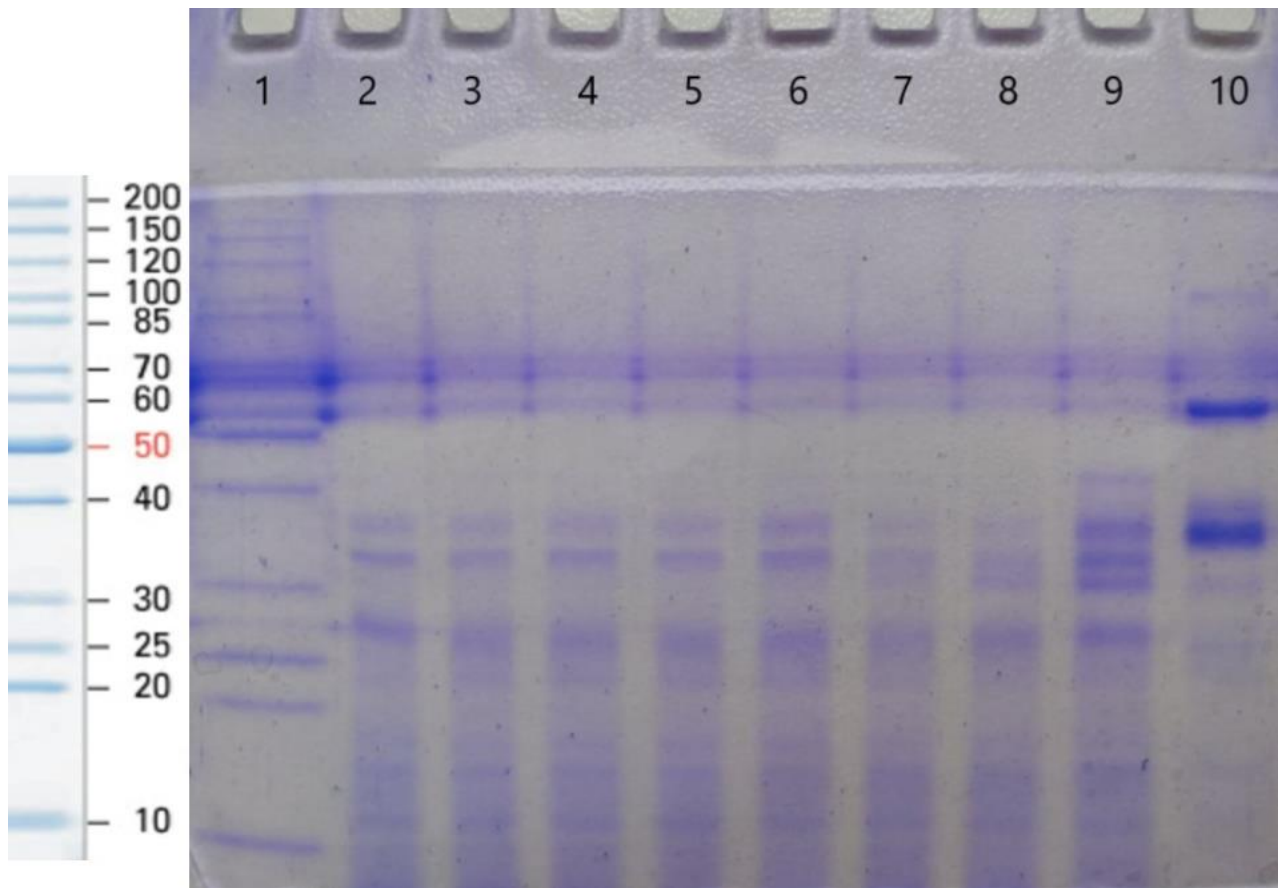


Рис. 48. Ограниченный протеолиз плазминогена: 1- метчики; 2–6 – Стриктолиаза + фибриноген - 5, 10, 20, 40, 60 секунд инкубации; 7-9 - Стриктолиаза + фибриноген - 5, 10, 15 минут инкубации; 10 – Плазминоген.

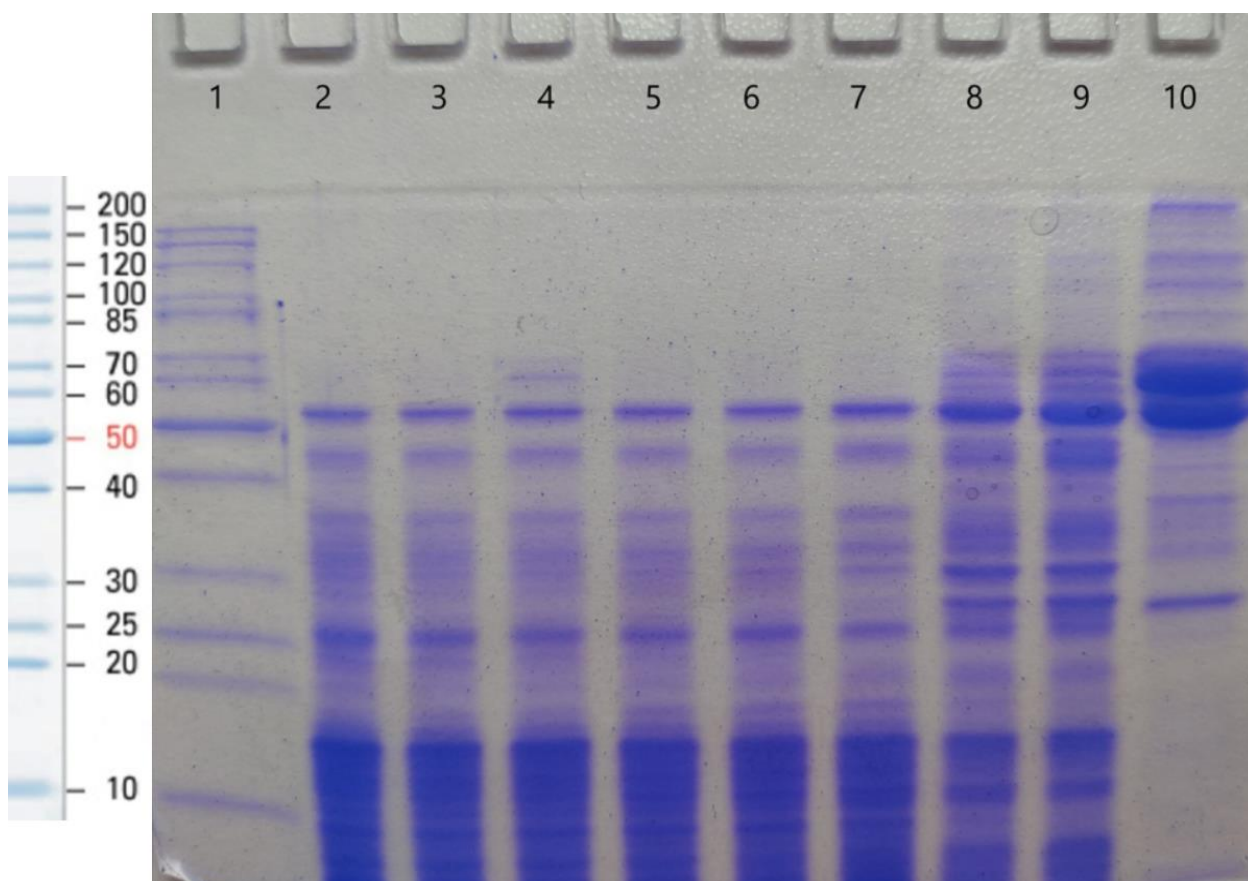


Рис. 49. Ограниченный протеолиз фибриногена: 1- метчики; 2–4 – Стриктолиаза + фибриноген - 15, 10, 5 минут инкубации; 5-9 - Стриктолиаза + фибриноген - 60, 40, 20, 10, 5 секунд инкубации; 10 – Фибриноген.

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод о высоком сродстве Стриктолиазы в отношении данных субстратов. Препарат протеаз микромицета *S. strictum* способен с высокой эффективностью осуществлять протеолиз таких составляющих плазмы крови как плазминоген и фибриноген, что делает его весьма перспективным тромболитическим и фибринолитическим препаратом.

3.5.11. Хранение препарата Стриктолиазы

В результате хранения препарата (фармацевтической субстанции) при различных температурах на протяжении различного времени были получены следующие данные.

При хранении при -80°C активность препарата сохранялась и изменения в активности были в районе погрешности метода (рис. 50, 51, 52). Также хранение при $+4^{\circ}\text{C}$ в течении года существенно не повлияло на активности препарата. При температуре в $+25^{\circ}\text{C}$ произошло некоторое снижение активности, но оно также не столь существенно. Из этого можно сделать вывод, что препарат протеаз микромицета *S. strictum* является стабильным и способен выдерживать данный диапазон температур и сохранять свою активность в течение года. Оптимальная температура хранения составила -80°C .

Если сравнить полученные данные с показателями Лонголитина, то можно говорить о том, что протеазы комплекса Стриктолиазы являются более устойчивыми при хранении в различных условия и потеря их наблюдаемой активности существенно меньше, чем у Лонголитина.

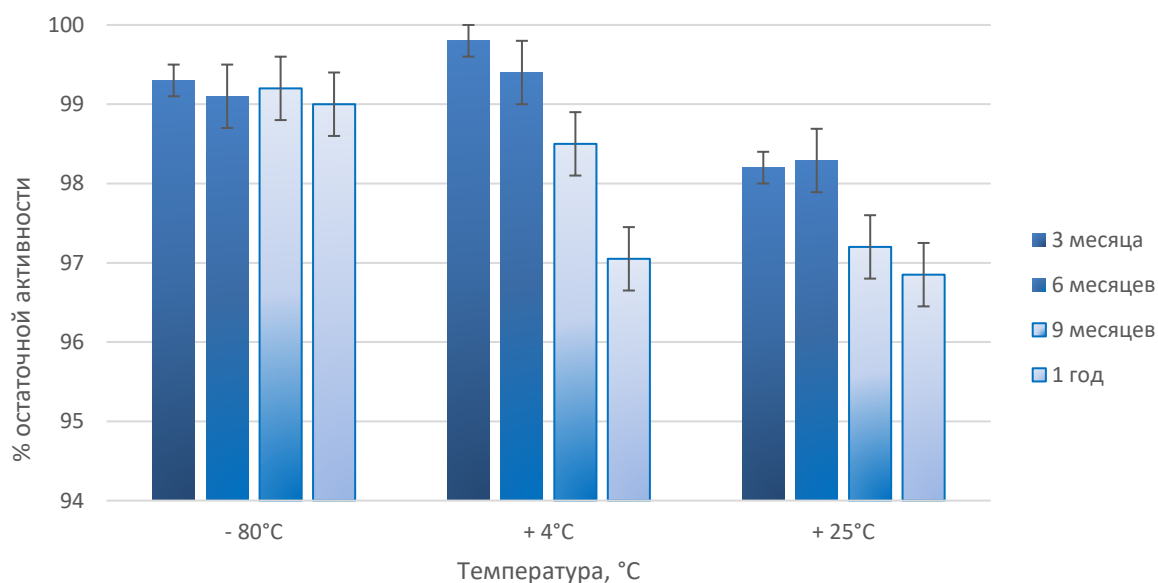


Рис. 50. Остаточная активность при хранении препарата протеаз микромицета *S. strictum*: урокиназная активность.

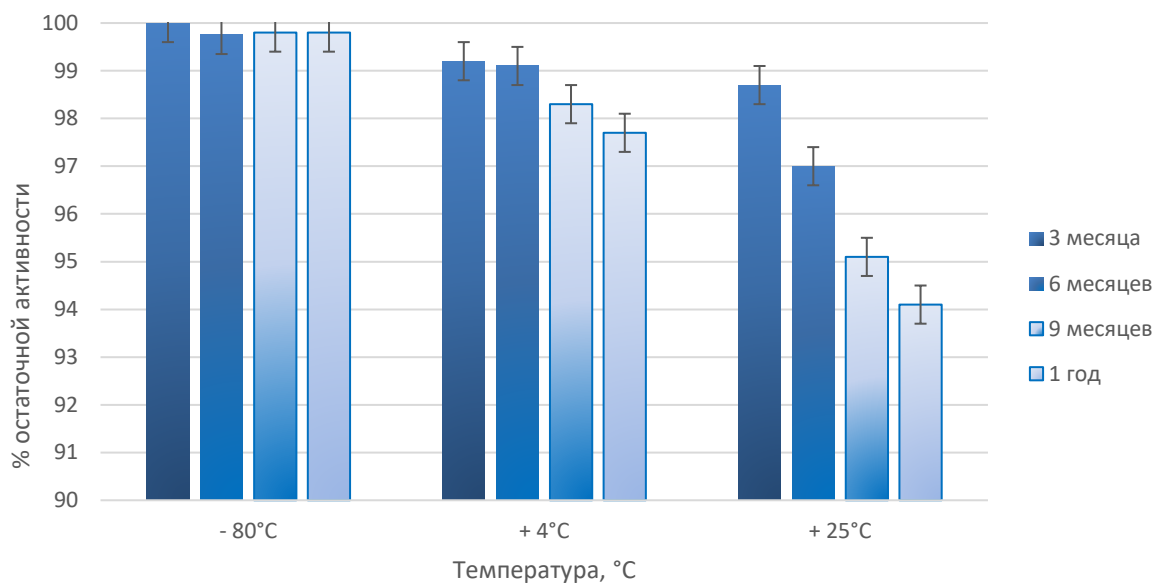


Рис. 51. Остаточная активность при хранении препарата протеаз микромицета *S. strictum*: фибринолитическая активность.

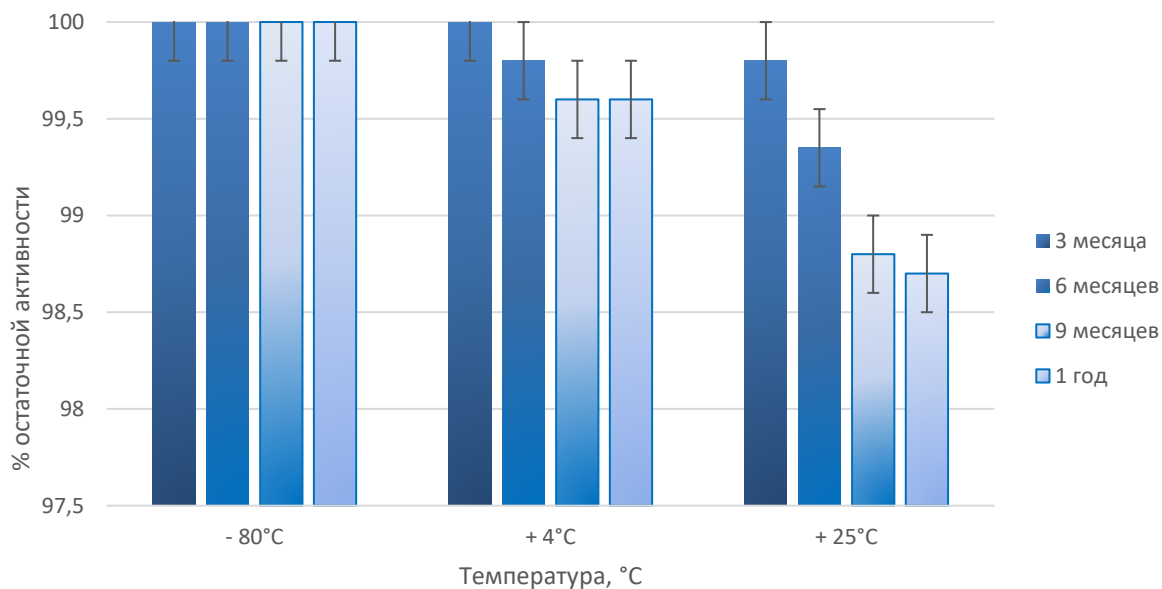


Рис. 52. Остаточная активность при хранении препарата протеаз микромицета *S. strictum*: активаторная к плазминогену активность.

3.6. Оценка препарата, образуемого микромицетом *S. strictum*, в качестве фармацевтической субстанции

Для дальнейшей разработки коммерческого прототипа и прохождения доклинических испытаний препарат, получаемый из культуральной жидкости микромицета *S. strictum*, оценивали в качестве фармацевтической субстанции (ФС).

3.6.1. Определение чистоты и подлинности фармацевтической субстанции, образуемой микромицетом *S. strictum*

Для стандартизации фармацевтической субстанции (ФС) было произведено измерение спектра поглощения ФС в концентрации 5 мг/мл. Таким способом были определены положения максимумов и минимумов спектра поглощения (рис. 53): максимум принадлежит отрезку [1.220; 1.350], начало спектра пролегает в отрезке [0.520; 0.700], окончание спектра находится в отрезке [0.340; 0.380].

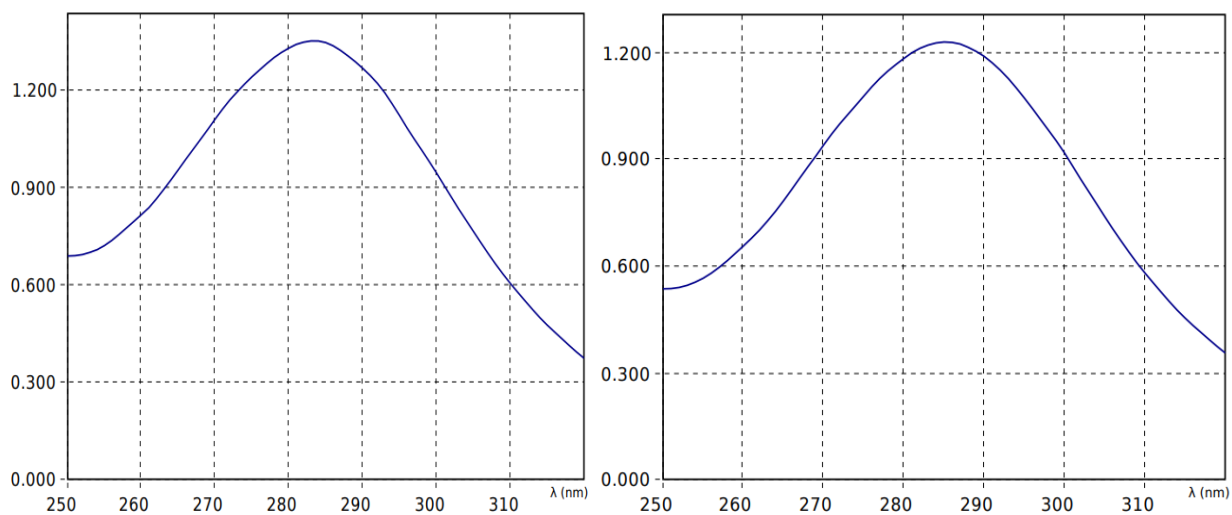


Рис.53. Спектры поглощения растворов ФС в концентрации 5 мг/мл, полученных в 2019 и 2022 годах.

Согласно рекомендуемым требованиям к качеству ФС, представленным в ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота», в субстанции,

предназначенной для нестерильных лекарственных препаратов для наружного применения, общее число микроорганизмов не должно превышать 10² КОЕ в 1 г (мл). Общее число микроорганизмов в 1 мл раствора ФС, получаемой из культуральной жидкости *S. strictum* в концентрации 60 мг/мл, не превышало показатель 10² КОЕ в 1 мл. Также общее число микроорганизмов в 1 мл (0,950 г) готовой лекарственной форме с концентрацией ФС 60 мг/мл не превышало показатель 10² КОЕ в 1 мл.

Среднее значение pH готовой ЛФ на кремовой основе составляло 6,4, на гелевой 6,6, что соответствует интервалу допустимых показателей для наносимых на поверхность кожи лекарственных и косметических средств.

3.6.2. Аллергенность фармацевтической субстанции, образуемой микромицетом *S. strictum*

В тесте на активную кожную анафилаксию у мышей оценивали средний диаметр и интенсивность пораженного (посиневшего) участка, окружающего место инъекции (табл. 8). В результате теста статистически значимых различий между контрольной и экспериментальными группами выявлено не было. Внутри каждой группы не было различий между диаметрами поврежденных участков после введения физиологического раствора (ФР) и фармацевтической субстанции (ФС). Таким образом, фармацевтическая субстанция не влияет на развитие кожной анафилаксии и не проявляет аллергических свойств.

Таблица 8.

Средний диаметр поражения во всех группах животных.

Доза, мг/кг	Количество животных в группе	Диаметр пораженного участка (ФР), мм	Диаметр пораженного участка (ФС), мм
0	10	0.428 ± 0.057	0.472 ± 0.055
24	10	0.745 ± 0.161	0.801 ± 0.171
240	10	0.728 ± 0.154	0.769 ± 0.126

В тесте активной системной анафилаксии у крыс степень развития анафилаксии оценивали по выраженности отека тонкой кишки (по изменению содержания воды, методом высушивания до постоянной массы) (табл. 9).

В результате теста статистически значимых расхождений между контрольной (масса при сушке кишечника уменьшилась в среднем на 41.2 %) и опытными группами (масса уменьшилась в среднем на 37.5 и 39.1 % для групп 12 и 120 мг/кг, соответственно) не выявлено.

Таким образом, ФС не влияет на развитие активной системной анафилаксии, а также не проявляет аллергенных свойств.

Таблица 9.

Содержание воды в тонком кишечнике у крыс, иммунизированных овалбумином.

Доза, мг/кг	Количество животных в группе	Изменение содержания воды, %
0	10	40.9 ± 1.025
12	10	39.3 ± 1.127
120	10	41.1 ± 0.51

В тесте на воспалительную реакцию, вызванную конканавалином А (который является растительным митогеном и способен стимулировать мышечные Т-лимфоциты) у мышей определяли вес обеих лап и рассчитывали индекс реакции (Табл. 10).

В результате этого теста статистически значимых различий между контрольной и экспериментальными группами выявлено не было. Средний индекс реакции имел схожие значения для всех трех групп.

Таблица 10.

Влияние фармацевтической субстанции на воспалительную реакцию на конканавалин А.

Доза, мг/кг	Количество животных в группе	Показатель реакции, мм
0	10	13.7 ± 1.51
24	10	13.55 ± 1.73
240	10	13.81 ± 1.77

Тест Драйза использовали для оценки раздражающего действия фармацевтической субстанции на конъюнктивном тесте у кроликов. Все используемые в работе кролики (как самцы, так и самки) имеют состояние роговицы, радужной оболочки и конъюнктивы на исходном физиологическом уровне.

Для оценки реакции рассматривались такие параметры, как:

- Роговица – плотность и продолжительность помутнения; размер зоны роговицы, вовлеченной в реакцию
- Радужная оболочка – степень воспаления
- Конъюнктивита – гиперемия конъюнктивы века; степень отека и обильно выделения.

Каждому из экспериментальных параметров была присвоена оценка от 0 до 5, в зависимости от выраженности признака.

Анализ результатов пробы конъюнктивы показал, что исследуемое вещество не оказывает раздражающего действия.

3.6.3. Иммунотоксичность фармацевтической субстанции, образуемой микромицетом *S. strictum*

В гуморальном Т-клеточно-зависимом тесте у мышей количество антител-продуцирующих клеток (АПК) в селезенке определяли с помощью анализа клеток, образующих бляшки, и рассчитывали индекс модуляции (иммунный ответ) по сравнению с контрольной группой.

Результаты этого теста были выражены в количестве АПК на 1 млн ядросодержащих клеток в селезенке. Было установлено, что введение исследуемой ФС не приводит к изменению массы клеток селезенки по сравнению с контрольными животными (табл. 11).

Таблица 11.

Показатели массы селезенки и количества ядросодержащих клеток у мышей.

Вводимая субстанция	Антиген	Масса селезенки, г	Количество клеток, содержащих ядро, млн/селезенку	Количество животных в группе
Физиологический раствор	SRBC	0.15 ± 0.012	168.2 ± 13.74	10
Доза вещества, мг/кг				
20	SRBC	0.13 ± 0.015	198.5 ± 19.4	10
200	SRBC	0.16 ± 0.017	177.2 ± 21.2	10

Введение вещества в дозах 20 и 200 мг/кг не приводило к стимуляции гуморального иммунитета.

В результате этого теста статистически значимых увеличений количества АПК выявлено не было, как и различий в контрольной и опытных группах. Таким образом, анализ результатов теста показал, что исследуемая ФС не влияет на изучаемые показатели гуморального иммунитета у мышей (табл. 12).

Таблица 12.

Влияние вещества на накопление АПК у мышей.

Вводимая субстанция	Антиген	АПК, млн/селезенку	Индекс модуляции	Количество животных в группе
		Абсолютное значение	Абсолютное	

			антигена	значение	
Физиологический раствор		SRBC	4982.5 ± 245.5	29.85 ± 2.17	10
Доза вещества, мг/кг	20	SRBC	4839.2 ± 298.8	24.67 ± 2.45	10
	200	SRBC	4937.5 ± 247.6	27.81 ± 2.86	10

В тесте на гиперчувствительность замедленного типа у мышей был рассчитан индекс реакции (табл. 13). Анализ результатов теста показал, что исследуемая ФС не влияет на реакцию гиперчувствительности к SRBC.

Таблица 13.

Влияние вещества на реакцию гиперчувствительности замедленного типа у мышей.

Вводимая субстанция	Антиген	Вес экспериментальной лапы, мг	Вес контрольной лапы, мг	Индекс реакции	Количество животных в группе
Физиологический раствор	SRBC	257.2 ± 6.9	177.4 ± 2.3	44.90 ± 4.24	10
Доза вещества, мг/кг	20	SRBC	259.3 ± 6.1	43.22 ± 4.27	10
	200	SRBC	260.1 ± 7.2	45.63 ± 5.12	10

В тесте на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов подсчитывали количество перитонеальных макрофагов и количество содержащих частицы чернил (фагоцитарных) клеток. Таким способом был рассчитан фагоцитарный индекс (Табл. 14). Результаты испытания показали, что исследуемая ФС существенно не изменяет фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов при всех исследуемых дозах.

Таблица 14.

Влияние вещества на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов.

Доза, мг/кг	Количество животных в группе	Общее количество клеток в экссудате	Количество фагоцитарных клеток
0	10	685 ± 51.6	235 ± 25.9
20	10	688.8 ± 51.2	205.5 ± 24.2
200	10	670 ± 53.8	215 ± 23.6

Таким образом, во всех трех тестах не наблюдали существенных изменений в изучаемых параметрах иммунной системы животных, получающих исследуемую ФС.

3.6.4. Острая токсичность фармацевтической субстанции, образуемой микромицетом *S. strictum*

При внутривенном введении физиологического раствора в контрольной группе не наблюдали никаких симптомов, в то время, как в экспериментальной группе отмечалась повышенная частота дыхания и снижение активности после введения исследуемого вещества.

В первые минуты после внутривенного введения вещества крысы и мыши испытывали боль в области введения в течении 30 – 50 минут. Во время проведения эксперимента (14 дней) во всех группах животных не было зафиксировано ни одной смерти. Таким образом, не удалось обнаружить летальную дозу исследуемого вещества. При введении различных доз (0.551, 1.102, 2.204 и 4.408 мг/кг) субстанции летальности не наблюдали.

Внутрибрюшинное введение вещества также вызывало болевой синдром. Животные собрались в углу клетки и не двигались в течении 10 – 15 минут. Затем у нескольких животных проявились показатели боли в животе в течении 60 – 90 минут.

Общее состояние подопытных животных было таким же, как и у контрольной группы в течении всего срока наблюдения (14 дней). Животные проявляли нормальную активность, тремор отсутствовал, внешний вид животных (состояние шерсти, кожи, слизистых оболочек) были в норме. Потребление корма и воды были также в пределах нормы. Кал и моча были нормальной консистенции, запаха и цвета. Реакция животных на звуковые и тактильные раздражители была адекватной, признаков эмоционального напряжения не наблюдали.

Вес животных снизился на следующий день после введения вещества на 5 – 22 %, в зависимости от группы, но вернулся к исходным значениям через неделю после начала наблюдений.

При макроскопическом исследовании внутренних органов никаких видимых изменений обнаружено не было.

Таким образом, исследуемая ФС в профилактических и терапевтических дозах, а также в дозе, в три раза превышающей терапевтическую, не проявляла токсическое действие. Анализ результатов теста на острую токсичность показал, что полулетальная доза исследуемого вещества при внутривенном и внутрибрюшинном введении составляет более 4408 мг/кг.

Таким образом, ФС на основе протеаз микромицета *S. strictum* является безопасной с точки зрения аллергенных свойств, иммунотоксичности и острой токсичности в проведенных экспериментах на животных. Для внутривенного и внутрибрюшинного способа введения максимальная переносимая доза и полулетальная доза не были определены. В сравнении с уже давно применяемым в медицинской практике препаратом Стрептокиназа, который обладает выраженным токсическим эффектом и способен вызывать острый очаговый миокардит (Artus et al., 1887; Banerjee et al., 2004), новая разработка не вызывает серьезных осложнений и не обладает пагубным воздействием на организм подопытных животных. Полученные данные делают изучаемую фармацевтическую субстанцию весьма перспективной для медицинского применения и особо перспективной в биомедицинской области.

3.6.5. Проведение опытов *in vivo* и апробация мази для наружного применения на основе фармацевтической субстанции образуемой микромицетом *S. strictum*

В качестве носителей для выделенной фармацевтической субстанции использовались кремовая и гелевая основы. При подборе оптимального носителя оценивали его консистенцию, вязкость, удобство нанесения и эффективность внесенных в него протеаз.

В работе был использован гелевый носитель, в качестве основного компонента состоящий из карбопола, и кремовый носитель, имеющий более сложный состав. Среднее значение рН готовой кремовой субстанции составляло 6.4, готовой гелевой субстанции - 6.6, что соответствует допустимому интервалу показателя для наносимых на поверхность кожи лекарственного или косметического средства (табл. 18 Приложение 1).

Эффективность готовых субстанций проверяли на модели кожной гематомы у крыс обоих полов. Полученные данные были проверены на соответствие нормальному распределению при помощи критерия Андерсона-Дарлинга и критерия согласия Колмогорова-Смирнова. На основании полученных результатов (распределение не соответствовало Гауссовой кривой) были проведены:

1. Однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса (табл. 15) с анализом статистически значимых данных при помощи теста Данна (табл. 16) для эксперимента, состоящего из трех групп испытуемых (крем 30 мг/мл, 60 мг/мл, контроль);

2. Анализ с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни (табл. 17) для эксперимента, состоящего из двух групп испытуемых (гель 30 мг/мл, контроль).

Таблица 15.

Результаты анализа с использованием критерия Краскела-Уоллиса.

Группа	День 1	День 2	День 3	День 4	День 5	День 6	День 8
P-значение	0.8923	0.0703	0.2894	0.0219	0.005	0.0012	0.0008
Значимость различия между меридианами	нет	нет	нет	да	да	да	да

Различия в скорости заживления (рис. 54, табл. 18 Приложение 1) внутрикожных гематом между контрольной (плацебо), и экспериментальными группами, получавшими крем с концентрацией протеаз 30 мг/мл и 60 мг/мл, оказались статистически значимыми на 4, 5, 6, 8 сутки (7 сутки не учтены, так как измерения в данный день не проводили). Для выявления значимости внутри каждой из экспериментальных групп относительно контроля был проведен тест Данна.

Таблица 16.

Результаты теста Данна.

Тест Данна	День 4	День 5	День 6	День 8
Контроль vs. 30 мг/мл	0.0142	0.0424	0.004	0.0012
Значимость различия	да	да	да	да
Контроль vs. 60 мг/мл	0.0645	0.0025	0.0011	0.0012
Значимость различия	нет	да	да	да

По результатам, полученным в тесте Данна, статистически значимое различие между контрольной группой и группой, получавшей крем в концентрации ФС 30 мг/мл наблюдали на 4 – 6 и 8 сутки измерений; между группой контроля и группой, получавшей крем в концентрации ФС 60 мг/мл на 4 сутки статистически значимых различий не выявлено. Подобное отклонение может быть связано с небольшим размером выборки животных, а

также с наличием индивидуальных особенностей и различий в скорости течения физиологических процессов.

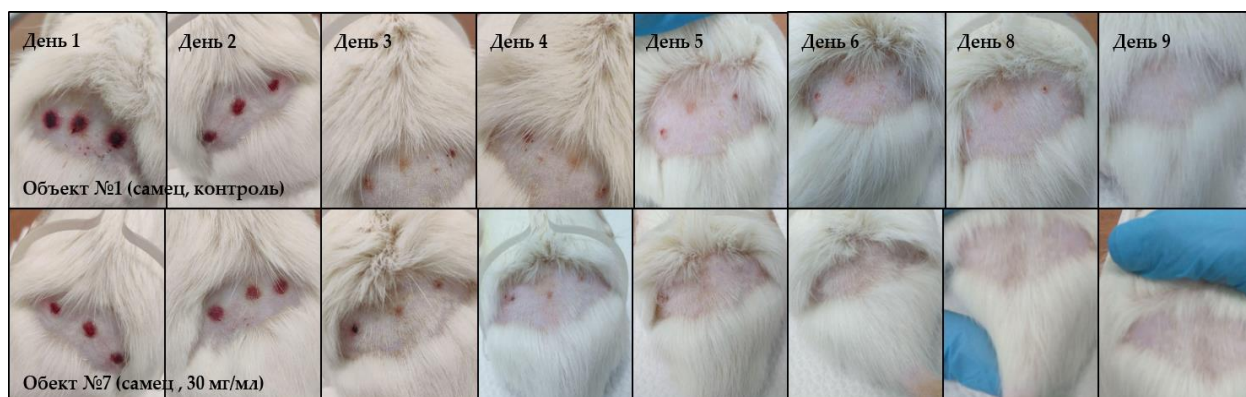


Рис. 54. Изменения площади внутрикожных гематом у крыс с 1 по 9 день наблюдений.

Таблица 17.

Результаты анализа с использованием критерия Манна-Уитни.

Группа	День 1	День 2	День 3	День 4	День 5	День 6	День 8
Р-значение	0.1486	0.4466	0.3527	0.0892	0.1051	0.2093	0.3684
Значимость различия между медианами	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет

Различия в скорости заживления внутрикожных гематом в линии эксперимента с использованием гелевого носителя оказались статистически незначимыми во все дни проведения измерений. Данный результат может быть связан как с аутолитическим расщеплением ферментов до менее активных низкомолекулярных продуктов, так и с недостаточной пенетрацией гелевой формы сквозь эпидермальные слои кожи.

Таким образом, гелевая форма не оказывала лечебного эффекта, в то время как кремовая способствовала более быстрому заживлению гематом, начиная с 4х суток наблюдения. При этом эффект заживления был более ярко выражен при нанесении субстанции в концентрации 30 мг/мл. Данный эффект можно объяснить увеличенной проникающей способностью

субстанции с более низкой концентрацией ФС, а также индивидуальными особенностями объектов.

На основании всех полученных данных можно сделать вывод об высокой перспективности дальнейшей разработки препарата на основе фармацевтической субстанции Стриктолизаза и её широкой востребованности в качестве наружного средства для устранения гематом, а при определенной степени очистки и в качестве лекарственного препарата. Очищенные протеиназы I и II также весьма эффективны в составе диагностических наборов, так как обладают ярко выраженной активаторной активностью по урокиназному типу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В организме человека протеазы-тромболитики отвечают за лизирование тромба внутри сосудистого русла. Тромболитические препараты – естественные патогенетические средства лечения тромбозов, осложняющие течение как сердечно-сосудистых, так и инфекционно-аллергических заболеваний (Подорольская и др., 2002., Sharma et al., 2021). Такие препараты могут находить широкое применение как в медицине в качестве лекарственной формы, так и в области косметологии для устранения дермальных гематом. Возросший спрос на тромболитические препараты также обусловлен пандемией COVID-19, при которой существенно увеличен риск развития тромбозов различной тяжести особенно у пациентов в тяжелом состоянии (Fatimah et al., 2020; Hanff et al., 2020; Thomas et al., 2022; Fanaroff et al., 2023). В связи с этим, пациентам необходимо проводить антикоагулянтную профилактику.

Перспективным для медицины представляется тромболитический препарат Стриктолиаза, полученный из культуральной жидкости микромицета *S. strictum*. Данный препарат обладает суммарным эффектом – фибринолитическим, тромболитическим, активаторным к плазминогену и незначительным общим протеолитическим действием.

В данной работе впервые было проведено комплексное изучение нового препарата Стриктолиазы, а также проведено его сравнение с ранее изученным препаратом Лонголитин, который является как прямым фибринолитиком, так и активатором плазминогена. В результате был показан схожий механизм действия изучаемых препаратов, но при детальном сравнении активность Стриктолиазы была несколько выше, чем у Лонголитина, а также при хранении в различных условиях стабильность первого существенно превосходила стабильность второго. В сравнении с коммерческими аналогами и различными фибринолитическими препаратами грибного происхождения, активность Стриктолиазы в качестве активатора плазминогена по урокиназному типу существенно превосходила все

изучаемые субстанции. Для наглядного подтверждения механизма действия на компоненты плазмы крови был проведен денатурирующий электрофорез, демонстрирующий протеолиз плазминогена и фибриногена фибринолитическим препаратом Стриктолиаза, что показало высокое сродство к данным субстратам.

Проведенные исследования позволили выявить оптимальные условия работы с продуцентом *S. strictum*, что позволило существенно увеличить выход препарата, который составляет не менее 5 г/л. Изучение условий работы с препаратом Стриктолиаза продемонстрировало его перспективность в качестве лекарственного препарата при различных способах применения, так как его оптимальные значения работы укладываются в оптимальные значения pH и температуры организма.

Было показано наличие трех активных протеаз в комплексном препарате Стриктолиаза, две из которых проявляли ярко выраженную активность по отношению к урокиназному хромогенному субстрату, при этом практически не проявляя другие виды активности, что показывает их высокое сродство к данному субстрату системы гемостаза. Третий компонент данного комплекса проявлял сравнительно низкую активность по отношению к данному субстрату, но обладал высокой общей протеолитической активностью, что делает данную протеазу эффективным фибринолитическим компонентом.

В работе были детально исследованы три протеазы, входящих в комплексный препарат Стриктолиаза. Был установлен класс протеаз путем проведения ингибиторного анализа, а также выявлена способность гепарина увеличивать активность протеаз с активаторной к плазминогену активностью. Определена молекулярная масса компонентов комплекса, а также содержание гликопротеинов в протеазах.

Тромболитические способности препарата Стриктолиаза были изучены как на *in vitro*, так и на *in vivo* моделях. Данная субстанция проявляла высокую активность на фибриновых пластинах, на модели тромба *in vitro*, а также на модели внутридермальной гематомы у крыс. В данной работе был

проведен первый этап доклинических испытаний фармацевтической субстанции Стриктолиаза, на котором было изучено иммунотоксическое и аллергенное воздействие на организм, а также было проведено определение острой токсичности. В результате проведенных тестов было установлено отсутствие каких-либо пагубных воздействий на организм изучаемых объектов, что делает данный препарат безопасным для применения.

В результате проведенной работы были изучены ранее неустановленные свойства препарата внеклеточных ферментов микромицета *Arthrobotrys longa* Mecht. 1, а также изучен новый продуцент фибринолитических ферментов *Sarocladium strictum* 203 и образованный им комплекс экзопротеаз.

ВЫВОДЫ

1) Полицикличность роста микромицета *A. longa* Mecht. 1 совпадает с максимумами фибринолитической и активаторной к плазминогену активности, которые связаны со стадией прорастания спор.

2) В процессе роста микромицет *A. longa* Mecht. 1 образует протеолитический комплекс как минимум из 3-х ферментов с рI 5.52, 6.91 и 10.64, соответственно, два из которых проявляют активаторную к плазминогену активность по урокиназному типу, в то время как третья протеаза обладает высокой общей протеолитической активностью.

3) Максимальный выход ферментов, образуемых микромицетом *S. strictum* 203, приходится на 4 сутки культивирования при оптимальных значениях рН среды 6 – 6.5.

4) Препарат, образуемый штаммом *S. strictum* 203 является комплексом как минимум из трех протеаз (I, II и III) с рI 4.5, 7.2 и 11.8, соответственно, две из которых проявляют высокую активность по отношению к урокиназному субстрату, которая значительно выше чем у Лонголитина. Протеаза III обладает высокой общей протеолитической активностью. Протеазы I и II являются гликозилированными, у протеазы III углеводного компонента не обнаружено.

5) Оптимальные значения рН активности всех трех протеаз, образуемых микромицетом *S. strictum* 203, находятся в нейтральном диапазоне. Оптимальная температура активности составляет 30 – 55 °С.

6) Все три протеазы *S. strictum* 203 являются трипсиноподобными тиолзависимыми протеазами серинового типа, а протеазы I и II активируются гепарином.

7) Проведенные этапы доклинических исследований показали отсутствие острой токсичности, иммунотоксичности и аллергенности фармацевтической субстанции Стриктолиазы, а также ее высокую активность в качестве тромболитического агента в *in vitro* и *in vivo* моделях.

8) Сравнение Стриктолиазы с коммерческими аналогами и другими препаратами грибного происхождения показало высокие значения фибринолитической и активаторной к плазминогену активности урокиназного типа при низкой общей протеолитической активности.

Рекомендация: выявленные свойства и активности дают возможность рассматривать данную субстанцию в качестве востребованного лекарственного средства, а микромицет *S. strictum* 203 – как биотехнологически перспективный продуцент.

Приложение 1

Таблица 18.

Изменения средней площади трех гематом у крыс, при нанесении крема в дозировках 30 и 60 мг/мл.

Объект №	Группа	Пол	Площадь гематомы, мм ²							
			День 1	День 2	День 3	День 4	День 5	День 6	День 8	День 9
1	Контроль	♂	46,95	25.22	8.7	7.65	2.14	3.36	1.14	0
2	Контроль	♂	15.54	13.64	7.5	6.34	2.68	2.76	0	0
3	Контроль	♂	14.51	11.04	7.44	6.93	4.07	4.02	0.83	0
4	Контроль	♀	31.12	15.32	7.42	3.28	2.44	2.28	0.77	0
5	Контроль	♀	26.9	13.17	6.31	4.14	2.37	2.09	0	0
6	Контроль	♀	31.09	13.17	12.38	3.66	3.46	2.69	1.77	0
7	Опыт, 30	♂	23.49	19.02	9.74	3.71	1.77	0	0	0
8	Опыт, 30	♂	30.83	20.3	4.76	1.43	0.95	0.2	0	0
9	Опыт, 30	♂	23.35	14.78	7.78	3.54	3.14	0.59	0	0
10	Опыт, 30	♂	20.46	15.39	5.1	3.72	1.23	0.79	0	0
11	Опыт, 30	♂	24.18	17.74	7.18	3.28	1.43	0.95	0	0

12	Опыт, 30	♀	35.29	12.05	8.06	3.46	2.85	1.23	0	0
13	Опыт, 30	♀	23.65	16.83	5.45	2.15	1.54	0.79	0	0
14	Опыт, 30	♀	28.62	13.67	4.77	3.19	2.31	0	0	0
15	Опыт, 30	♀	28.71	12.59	9.44	2.74	1.77	1.21	0	0
16	Опыт, 30	♀	31.08	17.81	6.61	2.27	2.01	0.77	0	0
17	Опыт, 60	♂	23.89	24.55	12.88	3.61	1.23	0	0	0
18	Опыт, 60	♂	26.9	19.63	12.56	3.97	1.97	0.91	0	0
19	Опыт, 60	♂	28.99	18.38	8.77	3.06	1.64	0.3	0	0
20	Опыт, 60	♂	22.76	14.24	2.9	2.4	1.14	0.43	0	0
21	Опыт, 60	♀	26.11	18.64	6.87	4.91	1.94	1.14	0	0
22	Опыт, 60	♀	29.13	14.88	7.57	2.34	1.77	0	0	0
23	Опыт, 60	♀	30.76	17.11	9.51	3.63	0.91	0	0	0
24	Опыт, 60	♀	24.71	23.75	9.62	2.1	1.8	0.4	0	0
25	Опыт, 60	♀	28.2	19.15	7.07	3.34	1.27	1.43	0	0

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айсина Р.Б., Мухаметова Л.И. Структура и функции системы плазминоген/плазмин // Биоорганическая химия. 2014. Т. 40, № 6, С. 642.
2. Анализ размера и доли рынка протеаз - тенденции роста и прогнозы (2023-2028 гг.) [Электронный ресурс] <https://www.mordorintelligence.com/ru/industry-reports/proteases-market>.
3. Андреев Г.В., Серебрякова Т.Н., Максимова Р.А., Цыманович С.Г., Шаркова Т.С., Мурашова Н.С., Козлова М.А. Свойства препарата фибринолитических ферментов, полученного из культуральной жидкости несовершенного гриба *Arthrotrrys longa* // Вестник МГУ. Серия биология, 1981. №1, С. 24-28.
4. База данных по пептидам и их ингибиторам MEROPS [Электронный ресурс] <https://www.ebi.ac.uk/merops/>.
5. Батомункуева Б.П., Егоров Н.С. Выделение, очистка и разделение комплексного препарата внеклеточных протеиназ *Aspergillus ochraceus* 513 с фибринолитическими и антикоагулянтными свойствами // Микробиология. 2001. Т. 70, № 5, С. 602-606.
6. Беккер З.Э., Бурцева Э.И., Рогова Е.С., Селях И.О. Биоритмы грибов в погруженной культуре // Журнал общей биологии. 1978. Т. 34, № 4, С. 521 – 533.
7. Беккер З.Э. Физиология и биохимия грибов // Москва.: Изд. МГУ. 1988. С. 230.
8. Веремеенко К.Н., Голобородько О.П., Кизим А.И. Протеолиз в норме и при патологии // Киев, Здоровья. 1988. С. 199.
9. Гаврилов О.К., Мурашова Н.С., Козлова М.А., Сиротенко А.В., Субботина Л.А., Иванова И.В., Максимова Р.А., Андреев Г.В., Константинов Ю.А., Афонин Н.А. Физиологические системы регуляции агрегатного состояния крови // Гематология и трансфузиология. Москва.: Медицина. 1985. С. 191.

- 10.Гарибова Л.В., Лекомцева С.Н., Основы микологии // Москва:. Наука. 2005. С. 221.
- 11.Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 1. ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота». [Электронный ресурс]: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol1/1135/>.
- 12.Дьяков Ю.Т. Грибы: индивидуумы, популяции, видообразование // Журнал общей биологии. 2008. Т. 69, № 1, С. 10-19.
- 13.Егоров Н.С., Ушакова В.И. Образование непатогенными плесневыми грибами рода *Aspergillus* коагулаз, свертывающих плазму и кровь человека // Микробиология 1973. Т. 21, № 1, С. 221-223.
- 14.Егоров Н.С., Лория Ж. К., Ландау Н. С. Протеолитические ферменты микроорганизмов в связи с их фибринолитической и коагулазной активностью // Биосинтез микроорганизмами нуклеаз и протеаз. Москва:. Наука. 1979. С.146-196.
- 15.Егоров Н.С., Крейер В.Г., Осмоловский А.А., Баранова Н.А., Шаркова Т.С., Подорольская Л.В., Серебрякова Т.Н. Внеклеточные протеиназы микроскопических грибов с профибринолитическими и антикоагулянтными свойствами // Тезисы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Тромбозы, кровоточивость, ДВС-синдром. Современные подходы к диагностике». 2009. С. 35 – 36.
- 16.Зубаиров Д.М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования // Казань:. Фэн. 2000. С. 364 – 367.
- 17.Иерусалимский Н.Д. Основы физиологии микробов // Москва:. Издательство академии наук. 1963. С. 214.
- 18.Касумова С.Ю., Намазов Н.Р., Гасанов Х.Ф., Мурадов П.З. Изучение образования протеолитических ферментов у хищных грибов // Вестник МГОУ. 2009. №4, С. 102-105.

19. Константинова Е.В., Магнитский А.В., Шостак Н.А. Тромболитическая терапия у больных с острым инфарктом миокарда // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. 2006. Т.4, № 2, С. 58 – 62.
20. Крейер В.Г., Руденская Г.Н., Ландау Н.С., Покровская С.С., Степанов В.М., Егоров Н.С. Субтилизиноподобная протеиназа SSPB из *Streptomyces spheroides* // Биохимия. 1983. Т. 48. № 8. С. 1365–1373.
21. Кудряшов, Б. А., Ляпина, Л. А. Комплекс гепарин-аспирин, его физико-химические и физиологические свойства // Вопросы медицинской химии. 1977. Т. 23, № 1, С. 44-51.
22. Куприна А.А., Упницкий А.А., Белоусов Ю.Б. Алтеплаза: клиническая фармакология, перспективы применения при остром инфаркте миокарда, фармакоэкономические аспекты // Фарматека. 2004. Т. 96, № 19-20, С. 96.
23. Ландау Н.С., Кураков А.В., Гуликова О.М., Батомункуева Б.П., Струкова С.М., Егоров Н.С. Экстрацеллюлярные протеиназы микромицетов с фибринолитическими и антикоагулянтными свойствами // Микробиология. 1998. Т. 67, № 2, С. 215-220.
24. Ландау Н.С., Гуликова О.М., Егоров Н.С. Особенности контроля синтеза протеиназ с плазминоподобной и активаторной активностями у морских бактерий // Микробиология. 2000. Т. 69. № 2. С. 185–190.
25. Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю. Шубина Т.А. Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови // Москва: Адвансед солюшнз, 2012. С.160.
26. Максимова Р.А., Шаркова Т.С., Силаев А.Б., Андреев Г.В., Серебрякова Т.Н., Теплякова Т.В. Штамм *Arthrotrix longa* - продуцент фибринолитических ферментов с активаторными свойствами // РФ, авт. свид. № 745943. 1980.
27. Мацелюх Е.В., Левишко А.С., Варбанец Л.Д. Протеолитические ферменты микроорганизмов // Мікробіологічний журнал. 2012. Т.72, № 4, С. 56-73.

28. Миргородская О.А., Иванова Г.П., Тенникова Т.Б., Москвичев Б.В. Изучение взаимодействия протеолитического фермента террилитина с гепарином // Биоорганическая химия. 1978. Т. 4, С. 972 – 978.
29. Мирзаев К.К., Юсупов К.А., Маткаримов Б.Х., Азизов Д.Т., Юсупов Ж.К., Эргашев К.Н. Сравнительная оценка эффективности лечения экспериментальных гнойных ран раневыми покрытиями с иммобилизованным трипсином и террилитином на усллюлозной и синтетической матрицах // Экономика и социум. 2021., Т. 4-2, № 83, С. 213-220.
30. Мировая статистика здравоохранения, 2020: мониторинг показателей здоровья в отношении ЦУР, целей в области устойчивого развития (World health statistics 2020: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals) – декабрь 2020 // Женева: ВОЗ. 2020. С. 92.
31. Мосолов В.В. Протеолитические ферменты // Москва: Изд. Наука. 1971. С. 243.
32. Намазов Н.Р., Касумова С.Ю., Гасанов Х.А., Мурадов П.З. Влияние различных источников азота на образование протеолитических ферментов гриба *Arthrobotrys compacta* // Вестник МГУ. Серия биология. 2010. Т.1, С. 48-51.
33. Немова Н.Н., Бондарева Л.А. К вопросу об эволюции протеолитических ферментов // Биомедицинская химия. 2008. Т. 54, № 1, С. 48-57.
34. Нынь И.В., Иванова Г.П., Тара Т.М., Москвичев Б.В. Лечебные свойства протеолитического фермента террилитина и его модифицированной формы терридеказы // Terra Medica Nova, 2007. Т. 1, № 45, С. 49-50.
35. Осмоловский А.А., Рукавицына Е.Д., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // Микробиология. 2017. Т. 86. № 4. С. 504–509.
36. Осмоловский А.А., Попова Е.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н. С. Фибринолитическая и коллагенолитическая активность внеклеточных протеиназ штаммов микромицетов *Aspergillus ochraceus* L-1 и *Aspergillus*

ustus 1 // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2016. № 1. С. 71-75.

37. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Кураков А.В., Егоров Н.С. Свойства внеклеточной протеиназы – активатора протеина с плазмы крови, образуемой микромицетом *Aspergillus ochraceus* // Прикладная биохимия и микробиология. 2015. Т. 51, № 1, С. 86–92.
38. Осмоловский А.А., Звонарева Е.С., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Воздействие внеклеточных протеаз микромицетов рода *Aspergillus* на белки системы гемостаза // Биоорганическая химия. 2014. Т. 40. № 6. С. 688–694.
39. Павлюкова Е.Б., Белозерский М.А., Дунаевский Я.Е.. Внеклеточные протеолитические ферменты мицелиальных грибов // Биохимия. 1998. Т. 63, № 8, С. 1059-1089.
40. Панченко Е.П. Тромболитические препараты в лечении больных острым инфарктом миокарда // Атмосфера. Кардиология. 2001. Т. 1, С. 35-39.
41. Пленина Л.В., Гаврилов О.К., Кручинский Н.Г., Максимова Р.А., Серебрякова Т.Н., Цыманович С.Г. Клинические испытания тромболитического препарата грибного происхождения – триаза // Успехи медицинской микологии. 2006. Т. 7, С. 20.
42. Руденская Г.Н. Новые подсемейства субтилизинов // Биоорганическая химия. 1994. Т. 20, №5, С. 475-484.
43. Подорольская Л.В., Шаркова Т.С., Андреев Г.В., Серебрякова Т.Н., Гемостаз и фибринолиз при наружном применении тромболитического препарата Лонголитина // Вестник МГУ. Серия биология. 2002. Т. 2, С. 11 – 15.
44. Подорольская Л.В., Серебрякова Т.Н., Шаркова Т.С., Неумывакин Л.В., Андреев Г.В. Тромболитический эффект Лонголитина на модели экспериментального тромбоза у крыс и кроликов при наружном применении (потенцирующее влияние гепарина) // Вестник МГУ. Серия биология. 2006. № 3, С. 11 – 16.

45. Подорольская Л.В., Серебрякова Т.Н., Шаркова Т.С. Действие Лонголитина - тромболитического препарата из низшего сапротрофного гриба *Arthrobotrys longa* на фибринолиз и гемостаз у крыс при пероральном применении // Тромбоз, гемостаз и реология. 2014. Т. 4, № 60, С. 67-73.
46. Северин Е.С. Биохимия для медицинских вузов // Москва: ГЭОТАР-МЕД. 2014. С.768.
47. Серебрякова Т.Н., Андреев Г.В., Максимова Р.А., Степанова Ц.Н. Активаторные свойства протеиназы, образуемой культурой сапрофитного гриба *Trichothecium roseum* // Прикл. биох. и микроб. 1977. Т. 12, № 3, С 398-404.
48. Серебрякова Т.Н., Андреев Г.В., Цыманович С.Г. Максимова Р.А., Шаркова Т.С.,. Влияние ферментного препарата Лонголитина на фибринолиз у животных // Научные доклады высшей школы. 1985. № 2, С. 66 – 71.
49. Серебрякова Т.Н., Максимова Р.А., Хлюстов С.В., Федулов А.С., Пленина Л.В., Федорова Н.И., Цыманович С.Г., Марченко Л.Н., Андреев Г. В. Способ получения фармацевтического препарата, обладающего фибринолитической и противовоспалительной активностью // Евразийский патент № 002561. 2002.
50. Смирнов В.М. Физиология человека // М.: Медицина. 2002. С. 608.
51. Степанова Ц.Н., Максимова Р.А., Юликова Е.П. Фракционирование препарата фибринолитических ферментов “Трихолизина”, образуемого *Trichothecium roseum* Lk. Ex Fr. на карбоксиметил-сефадексе С-50 // Прикл. биохим. микробиол. 1976. Т. 12, № 3, С. 407–410.
52. Степанова Е.В., Золина Е.Д., Маркович Н.А., Зиновьев В.В. Протеазы нематофаговых грибов р. *Arthrobotrys* и *Trichothecium* // Биотехнология. 2001. Т. 4, С. 46-52.
53. Степанов В.М. Молекулярная биология. Структура и функция белков // Москва: Изд. МГУ. 2005.С. 336.

54. Струкова С.М. Современные представления о механизме свертывания крови // Тромбы, кровоточивость и болезни сосудов. 2002. Т. 2, С. 21-26.
55. Фершт Э. Структура и механизм действия ферментов // Москва: Издательство Мир. 1980. С. 432.
56. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. Биохимия // Москва: Изд. КГУ. 2012. С. 456.
57. Цыманович С.А., Никандров В.Н., Максимова Р.А., Шаркова Т.С., Андреев Г.В., Серебрякова Т.Н. Физико-химические свойства тромболитического препарата Лонголитина. Вопр. мед. химии. 1992. Т. 38, № 3, С. 44-45.
58. Шаркова Т.С., Максимов В.Н. Изучение физиологии хищного гриба *Arthrobotrys longa* — продуцента лонголитина в связи с длительным хранением культуры в лабораторных условиях // Микология и фитопатология. 1999. Т. 33, № 5, С. 338 – 345.
59. Шаркова Т.С., Подорольская Л.В., Серебрякова Т.Н., Хромов И.С., Тарантул В.З. Композиция для приготовления противотромбозного геля // Патент РФ на изобретение № 2322232. 2007.
60. Шаркова Т.С., Серебрякова Т.Н., Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю., Подорольская Л.В. Антикоагулянтная и антиагрегационная активность тромболитического препарата Лонголитина // Тромбоз, гемостаз и реология. 2014. Т. 2, № 58, С. 82-86.
61. Шаркова Т.С., Кураков А.В., Осмоловский А.А., Матвеева Э.О., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Скрининг продуцентов протеиназ с фибринолитической и коллагенолитической активностями среди микромицетов // Микробиология. 2015. Т. 84. № 3, С. 316–322.
62. Шаркова Т.С., Матвеева Э.О., Крейер В.Г., Осмоловский А.А., Кураков А.В., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Бразование протеиназ активаторов плазминогена микроскопическим грибом *Tolyocladium inflatum* K1 // Прикладная биохимия и микробиология. 2016. Т. 52, № 1, С. 38.

63. Шиффман Ф.Дж. Патопфизиология крови // Москва: Изд. Бином. 2009. С. 448.
64. Шмидт Р., Тевс Г. Физиология человека // Москва: Изд. Мир. 2005. Т. 2, С. 415.
65. Ali Muhammed Moula Ali, Sri Charan Bindu Bavisetty. Purification, physicochemical properties, and statistical optimization of fibrinolytic enzymes especially from fermented foods: A comprehensive review // International journal of biological macromolecules. 2020. V. 163, P. 1498-1517.
66. Anson M.L. Crystalline carboxypeptidase // Science. 1935. V. 81, P. 467-470.
67. Antonov V.K., Gorbalenya A.E., Kotova S.A., Rotanova T.V., Shimbarevich E.V. Site-directed mutagenesis of La protease: A catalytically active serine residue // FEBS Letters. 1991. V. 287, P. 211 – 214.
68. Artus J. A., Cockburn A., Fuller J., McMurdo A. S., White D. J. The preclinical toxicology of anisoylated plasminogen streptokinase activator complex // Drugs. 1987. V. 33, P. 97–101.
69. Astrup R., Müllertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity // Arch. Biochem. Biophys. 1952. V. 40, P. 346-351.
70. Banerjee Anirban, Chisti Yusuf, Banerjee U.C. Streptokinase—a clinically useful thrombolytic agent // Biotechnology advances. 2004. V. 22, № 4, P. 287 – 307.
71. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72, № 1, P. 238-247.
72. Brogden R. N., Speight T. M., Avery G. S. Streptokinase: a review of its clinical pharmacology, mechanism of action and therapeutic uses // Drugs. 1973. V. 5, P. 357–445.
73. Danilets M.G., Belskaia N.F., Trofimova E.S., Uchasova E.G., Ligacheva A.A., Agafonov V.I. Antiallergic effect of D-glucuronic acid // Eksp. Klin. Farmakol. 2008. V. 71, P. 37–39.

74. Davis B.J. Disc-electrophoresis. VI. Method and applications to human serum proteins // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1964. V. 121, P. 404-427.
75. Demidova M.A., Schneur S.Y., Galimskaya E.V., Kovtun A.A. The influence of noopepta and mexidol on allergic reactions // Eksp. Klin. Farmakol. 2007. V. 70, P. 28–30.
76. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes // Official Journal of the European Union, 20 October 2010.
77. Domsch K.H., Gams W., Anderson T.H. Compendium of soil fungi // IHW-Verlag. 2007. P. 672.
78. Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1944. V. 82, P. 377–390.
79. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes No. 123 Strasbourg 18/03/1986 // [Available online] <https://rm.coe.int/168007a67b> (accessed on 26 August 2021).
80. Fanaroff Alexander C., Lopes Renato D. COVID-19 Thrombotic Complications and Therapeutic Strategies // Annual Review of Medicine. 2023. V. 74, P. 15-30.
81. Fatimah Al-Ania1, Samer Chehadea Thrombosis risk associated with COVID-19 infection // Thrombosis Research. 2020. V. 192, P. 152-160.
82. Cha W.S., Park S.S., Kim S.J., Choi D.B. Biochemical and enzymatic properties of a fibrinolytic enzyme from *Pleurotus eryngii*: cultivated under solid-state conditions using corn cob // Bioresour. Technol. 2010. V. 101, P. 6475-6481.
83. Deshpande M. Proteinases in fungal morphogenesis // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 1992. V. 8, P. 242 -250.
84. Dunaevskii Ya E., Gruban T.N., Belyakova G.A., Belozerskii M.A. Effect of the medium composition on the quantitative and qualitative composition of

- extracellular proteases of micromycetes // *Microbiology*. 1999. V. 68, № 3, P. 276-280.
85. Ero M.P., Ng C.M., Michailovski T., Harvey N.R., Lewis B.H. A pilot study on the serum pharmacokinetics of nattokinase in human following a single, oral, daily dose. *Dioprocess and biosystems engineering // Alternative Therapies in Health and Medicines*. 2013. V. 19, № 3, P. 16-19.
86. Fujita M., Nomura K., Hong K., Ito Y., Asada A., Nishimuro S. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993. V. 197, № 3, P. 1340–1347.
87. Gams W. *Cephalosporium-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes)* // Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. 1971. P. 262.
88. Gertler Arieh, Trop Moshe. The Elastase-Like Enzymes from *Streptomyces griseus* (Pronase) // *European Journal of Biochemistry*. 1971. V. 19, № 1, P. 90-96.
89. Gopinath, S.M., Suneetha, T.B. Exploration of newer substrate for fibrinolytic enzyme production by solid-state fermentation using *Penicillium chrysogenum* SGAD12 // *J. Res. Biol.*, 2011. V. 1, P. 242–245.
90. Griffith G.W., Shaw D.S. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions // *Appl. Environment. Microbiol.*, 1998. V. 64 № 10, P. 4007–4014.
91. Hagihara B., Matsubara H., Nakai M., Okunuki K. Crystalline bacterial proteinase. I. Preparation of crystalline proteinase of *Bacillus subtilis* // *J. Biochem.* 1958. V. 45, P. 185-194.
92. Hanff Thomas C., Mohareb Amir M, Giri Jay, Cohen Jordana B., Chirinos Julio A. Thrombosis in COVID-19 // *Hematology*. 2020. V. 95, № 12, P. 1578-1589.

93. Herrewegen F., Meijers J.C.M., Peters M., Ommen C.H. Clinical practice: The bleeding child. Part II: Disorders of secondary hemostasis and fibrinolysis // Eur J Pediatr. 2012. V. 171, № 2, P. 207-214.
94. Hoffman M., Monroe D.M. A cell-based model of hemostasis // Thromb. Hemost. 2001. V. 85, P. 958–963.
95. Holbrook I.B., Leaver A.G. A procedure to increase the sensitivity of staining by Coomassie Brilliant Blue G-250 – perchloric acid solution // Anal. Biochem. 1976. V. 75, № 2, P. 634-636.
96. Hoog de G.S., Guarro J., Gene J., Figueras M.J. Atlas of clinical fungi. 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures // Universitat Rovira i Virgili. 2000. P. 720.
97. Jerne N.K., Nordin A.A. Plaque formation in agar by single antibody producing cells // Science, 1963. V. 140, P. 405–408.
98. Kotb E. Activity assessment of microbial fibrinolytic enzymes // Microbiology and Biotechnology. 2013. V. 97, P. 6647–6665.
99. Laemly U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4 // Nature. 1970. V. 227, № 5259, P. 680-685.
100. Larcher G., Cimon, Symoens F., Tronchin G., Chabasse D. A 33 kDa serine proteinase B from *Scedosporium apiospermum* // Biochem. 1996. V. 315, P. 119-126.
101. Lassen M. Heart denaturation of plasminogen in the fibrin method // Acta Physiol. Scand. 1952. V. 27, P. 371-376.
102. Lee S.Y., Kim J.S., Kim J.E., Sapkota K., Shen M.H., Kim S., Chun H.S., Yoo J.C., Choi H.S., Kim M.K., Kim S.J. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from cultured mycelia of *Armillaria mellea* // Protein Expr Purif. 2005. V. 43, № 1, P. 10–17.
103. Li, H.P., Hu, Z., Yuan, J.L., Fan, H.D., Chen, W., Wang, S.J., Zheng, S.S., Zheng, Z.L., Zou, G.L. A novel extracellular protease with fibrinolytic activity from the culture supernatant of *Cordyceps sinensis*: Purification and characterization // Phytother. Res. 2007. V. 21, P. 1234–1241.

104. Liu J.G., Xing J.M., Chang T.S., Liu H.Z. Purification of nattokinase by reverse micelles extraction from fermentation broth: Effect of temperature and phase volume ratio // *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2006. V. 28, P. 267–273.
105. Lopez-Llorca L.V., Maciá-Vicente J.G., Jansson H.B. Mode of action and interactions of nematophagous fungi // Springer: *Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes*. 2008. P. 51–76.
106. Lokesh P., Sowdhamini R. Genome-wide survey of prokaryotic serine proteases: analysis of distribution and domain architectures of five serine protease families in prokaryotes // *BMC Genomics*. 2008. V. 9, P. 549.
107. Makino T., Shiraki Y., Mizukami H. Interaction of gypsum and the rhizome of *Anemarrhena asphodeloides* plays an important role in anti-allergic effects of byakkokakeishito in mice // *J. Nat. Med.* 2014. V. 68, P. 505–512.
108. Meenu M., Santhosh D., Kamia C., Randhir S. Industrial strain improvement: mutagenesis // *Ind. J. Microbiol.* 2000. V. 40, P. 25.
109. Neurath, H. The diversity of proteolytic enzymes // *Proteolytic enzymes: a practical approach*, Oxford, IRI Press, UK. 1989. V. 224, № 4647, P. 350 - 357.
110. Osmolovskiy A.A., Orekhova A.V., Conti E., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Production and stability of the proteinase complex from *Aspergillus ochraceus* L-1 with fibrinolytic and anticoagulant activity // *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. 2020. V. 75, P. 130-135.
111. Sumi H., Hamada H., Tsushima H., Mihara H., Muraki H. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto: a typical and popular soybean food in the Japanese diet // *Experientia*. 1987. V. 43, № 10, P. 1110–1111.
112. Park I.S., Park J.U., Seo M.J., Kim M.J., Lee H.H., Kang B.W., Choi Y.H., Joo W.H. and Jeong Y.K. Purification and biochemical characterization of a 17 kDa fibrinolytic enzyme from *Schizophyllum commune* // *J. Microbiol.* 2010. V. 48, № 6, P. 36-41.

113. Peng Y., Yang X., Zhang Y. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity *in vivo* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2005. V. 69, P. 126-132.
114. Pisano M.A., Oleniacz W.S., Mason R.T., Fleischman A.I., Maccara S.E., Catalano G.R. Enzyme production by species of *Cephalosporium* // Appl. Microbiol. 1963. V. 11, P. 111-115.
115. Rao M.B., Tanksali A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998. V. 62, № 3, P. 597- 635.
116. Rashmi B.S., Liny P. Production and characterization of novel fibrinolytic enzyme from different soil fungal sp. // Int J Pharm and Sciences. 2013. V. 4, № 3, P. 454-463.
117. Redinbaugh M.C., Turtley R.B. Analytical biochemistry // Department of Chemistry, State University of New York. 1986. V. 153, P. 267-271.
118. Sadhasivam S., Swaminathan K., Feng Huei Lin. Fungal protease: production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance // Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. 2011. V. 42, № 2, P. 298-304.
119. Sharma C., Osmolovskiy A., Singh R. Microbial fibrinolytic enzymes as anti-thrombotics: production, characterisation and prodigious biopharmaceutical applications // Pharmaceutics. 2021. V. 13, № 11, 1880.
120. Shimada, T., Cheng, L., Yamasaki, A., Ide, M., Motonaga, C., Yasueda, H., Enomoto, K., Enomoto, T., Shirakawa, T. Effects of lysed *Enterococcus faecalis* FK-23 on allergen-induced serum antibody responses and active cutaneous anaphylaxis in mice // Clin. Exp. Allergy. 2004. V. 34, P. 1784–1788.
121. Stefanini M., Adamis D.M. Purification of Aspergillin O // Lancet. 1959. V. 11, P. 443-444.
122. Smith S.A. The cell-based model of coagulation // J. vinari emergency and critical. 2009. V. 19, № 1, P. 3-10.

123. Sugimoto Satoshi, Fujii Tadashi, Morimiya Tatsuo, Johdo Osamu, Nakamura Takumi. The fibrinolytic activity of a novel protease derived from a tempeh producing fungus, *Fusarium* sp. BLB // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2007. V. 71, № 9, P. 2184–2189.
124. Summerbell R.C., Gueidan C., Schroers H-J., de Hoog G.S., Starink M., Rosete Y. Arocha, Guarro J., Scott J.A. *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium* // Studies in mycology. 2011. V. 68, № 1, P. 139-162(24).
125. Tharwat N.A. Purification and biochemical characterization of fibrinolytic enzyme produced by thermophilic fungus *Oidiodendron flavum* // Biotechnology. 2006. V. 5, P.160–165.
126. Thomas Mari R., Scully Marie. Clinical features of thrombosis and bleeding in COVID-19 // Blood. 2022. V. 140, № 3, P. 184-195.
127. Thronton D.J., Carlstadt I., Sheehan J.K. Identification of glycoproteins on nitrocellulose membranes and gels // Mol. Biotechnol. 1996. V. 5, P. 171-176.
128. Toshio S., Teruhiko B., Kei A. Purification and properties of blood-coagulating protease from *Cephalosporium* sp. // Agric. Biol. Chem. 1977. V. 41, № 2, P. 293-298.
129. Tripathi L., Sowdhamini R. Genome-wide survey of prokaryotic serine proteases: Analysis of distribution and domain architectures of five serine protease families in prokaryotes // Biology. BMC Genomics. 2008. V. 9, P. 549.
130. Ueda Mitsuhiro, Kubo Toshihiro, Miyatake Kazutaka, Nakamura Takumi. Purification and characterization of fibrinolytic alkaline protease from *Fusarium* sp. BLB // Applied microbiology and biotechnology. 2007. V. 74, P. 331–338.
131. Umay Betül, Gül Abdulkadir, Tanyıldızı Muhammet Şaban. Isolation, identification, and optimization of the fibrinolytic protease-producing strains // Archives of Microbiology. 2023. V. 205, № 135.

132. Vesterberg O. Isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gels // Biochim. Biophys acta, 1972. V. 1, P. 11-19.
133. White T.J., Bruns T., Lee S.J.W.T., Taylor J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // PCR protocols: a guide to methods and applications., 1990. V. 18, № 1, P. 315–322.
134. Wolberg A., Mast A. Tissue factor and factor VIIa – hemostasis and beyond // Thrombosis Research. 2012. V. 129, № 2, P. 1-4.
135. Wu B., Licheng W., Daijie C., Yang Z., Luo M. Purification and characterization of a novel fibrinolytic protease from *Fusarium* sp. CICC 480097 // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 36, P. 451-459.
136. Xiao-Lan L., Lian-Xiang D., Fu-Ping L., Xi-Qun Z., Jing X. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Rhizopus chinensis* 12 // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2005. V. 67, P. 209 – 214.
137. Yang J., Tian B., Liang L., Zhang K.Q. Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 75, P. 21–31.
138. Yike I. Fungal proteases and their pathophysiological effects // Mycopathologia. 2011. V. 171, № 5, P. 299-323.
139. Zhang K.Q. Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 75, P. 21–31.