

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В.ЛОМОНОСОВА

на правах рукописи



Корниенко Елена Игоревна

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

1.5.11. Микробиология

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва 2023

Диссертация подготовлена на кафедре микробиологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова

Научные руководители – *Котова Ирина Борисовна*, доктор биологических наук, профессор

– *Осмоловский Александр Андреевич*, кандидат биологических наук

Официальные оппоненты – *Каюмов Айрат Рашитович*, доктор биологических наук, доцент, ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) Федеральный университет», Институт фундаментальной медицины и биологии, Высшая школа биологии, кафедра генетики, заведующий кафедрой

– *Манучарова Наталия Александровна*, доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», факультет почвоведения, кафедра биологии почв, профессор

– *Александрова Алина Витальевна*, доктор биологических наук, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет, кафедра микологии и альгологии, ведущий научный сотрудник

Защита диссертации состоится «19» декабря 2023 г. в 17:00 на заседании диссертационного совета МГУ.015.2 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, аудитория М-1

E-mail: *nvkostina@mail.ru*

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на портале <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.2/2782>

Автореферат разослан «15» ноября 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Н.В. Костина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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. 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.

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 (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 таких как: состав и рН среды, температура, 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.

5. 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 которой 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 ХПС 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 реакционную 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 также 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 источников, 64 - на русском и 75 - на английском.

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» (Нидерланды, 2017); «International Conference on Advances in Biomedicine and Biomedical Engineering 2017» (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» (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 5 научных работ, среди них 4 статьи в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В.Ломоносова и 1 патент РФ. В статьях и патенте, 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.

Основное содержание работы

Обзор литературы

Обзор литературы состоит из трех глав. В главе 1 представлен общий разбор системы гемостаза и описание её основных функций. Подробно представлены современные взгляды на системы свёртывания и противосвёртывания крови.

В главе 2 представлены сведения о протеолизе и протеолитических ферментах. Особое внимание уделяется каскадным ферментативным процессам системы

гемостаза, а также классу пептид-гидролаз.

В главе 3 подробно рассмотрены протеолитические ферменты грибов, способные к селективному протеолизу компонентов плазмы крови. Особое внимание уделено препаратам Триаза и Лонголитин, как наиболее изученным препаратам-фибринолитикам грибного происхождения.

Материалы и методы исследования

Объект исследований. В исследованиях использовали микромицеты *Arthrobotrys longa* Mecht. 1 и *Sarocladium strictum* 203.

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

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

Культуры выращивали в пробирках со скошенной средой Чапека-Докса в течении 7 дней и хранили в холодильнике до 1 месяца при 4-6°C. В условиях глубинного культивирования для получения протеаз микромицеты выращивали в два этапа в колбах на качалке (280 об/мин) при 28 °C. На первом этапе биомассу пересеивали 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): K₂HPO₄ – 4.4, NaNO₃ – 19, KNO₃ – 2.5, сахароза – 40, вода – водопроводная, pH среды составлял 6.5. Среда для посевной мицелия была составлена из тех же компонентов, но концентрация их была уменьшена в 2 раза.

Определение гидролитического потенциала микромицета. Для выявления гидролитического потенциала микромицета *S. strictum* были использованы среды следующего состава (г/л): KH₂PO₄ – 0,5, MgSO₄ – 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: EI = (D+d)/D, где D – диаметр колонии в мм, а d – диаметр зоны гидролиза в мм.

Молекулярно-генетическая идентификация микромицета. 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 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).

Изучение биоритмов микромицетов в глубинной культуре. Для обнаружения полицикличности роста микромицета проводили отбор проб каждые 24 часа культивирования в жидкой питательной среде. В отобранных пробах измеряли целевую активность и биомассу и рассчитывали удельную скорость роста. Также для подтверждения полицикличности культуры и сопоставления ее морфологического состояния с динамикой накопления протеолитических ферментов осуществляли микроскопический контроль.

Получение ферментного комплекса из культуральной жидкости микромицетов. Для получения ферментного комплекса культуральную жидкость микромицета отделяли от мицелия центрифугированием. Осаждение белков из культуральной жидкости проводили двукратным объемом ацетона, охлажденным до -20°C . Полученную смесь выдерживали 1 час при $+4^{\circ}\text{C}$ 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.

Определение фибринолитической и активаторной к плазминогену активности протеаз микромицетов 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 раствор бычьего фибриногена и раствор тромбина, затем аккуратно перемешивали и переносили в чашки Петри. Образование и уплотнение фибринового геля происходило при комнатной температуре в течение 1 - 3 часов. После этого часть чашек прогревали при температуре 86°C 30 минут, тем самым инактивируя плазминоген.

Для измерения фибринолитической и активаторной к плазминогену активности на пластины наносили пробы и помещали чашки в термостат на 4 часа. По истечении указанного времени на пластинах измеряли площадь зоны лизиса в мм^2 . 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.

Определение общей протеолитической активности протеаз микромицетов. Общую протеолитическую активность определяли модифицированным методом Ансона – Хагихары (Anson, 1935; Hagihara et al., 1958). В ходе ферментативного гидролиза происходит отщепление тирозина от молекулы казеина, а оставшийся непрореагировавший белок в дальнейшем осаждается ТХУ. После центрифугирования полученной реакционной смеси определяли количество отщепившегося тирозина.

Определение активности протеаз микромицетов с хромогенными пептидными субстратами. Активность протеаз определяли по гидролизу хромогенных пептидных субстратов (ХПС), имеющих в качестве хромофора п-нитроанилидную

группу (-pNA). 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).

Изоэлектрофокусирование комплексных тромболитических препаратов. Для разделения белков, входящих в препарат, использовали изоэлектрофокусирование (ИЭФ) по методу Вестерберга (Vesterberg, 1972). ИЭФ проводили при 4°C в широком градиенте pH амфолинов (pH 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 проведения содержимое колонки собирали по фракциям объемом 1.5 – 2 мл на холоду. В полученных фракциях измеряли pH, содержание белка, общую протеолитическую активность и активность с хромогенными пептидными субстратами.

Определение белка в пробах, на различных стадиях очистки протеаз микромицетов. Определение белка в пробе проводили тремя методами:

1. Определение количества белка в культуральной жидкости методом Бредфорд. Для этого к пробе добавляли реактив Кумасси (Coomassie Brilliant Blue G-250) и измеряли оптическую плотность при длине волны 595 нм.

2. Спектрофотометрическое определение количества белка во фракциях, полученных после изоэлектрофокусирования. Концентрацию белка в пробе определяли на основе поглощения исследуемого раствора при A280 нм.

3. Определение количества белка с помощью бицинхониновой кислоты в пробах с различными разведениями препаратов. Метод основан на биуретовой реакции и выявляет только наличие пептидных связей (Redinbaugh, 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.

Денатурирующий электрофорез белков в ПААГ. Денатурирующий электрофорез белков проводили в 10%-ном ПААГ с додецилсульфатом натрия по методу Лэммли (Laemmly, 1970) при силе тока в 40 мА. Для определения молекулярной массы фермента использовали набор метчиков Unstained Protein Molecular Weight Marker (фирмы «Thermoscientific»).

Ингибиторный анализ. Было исследовано действие ингибиторов в молярном соотношении фермент : ингибитор 1:10 и 1:100. Начальную и остаточную протеолитическую активность фермента определяли при 37°C после его прединкубации с ингибитором в течение 120 мин при 25°C, как описано выше, и выражали в процентах от контроля. Были использованы следующие ингибиторы: ЭДТА, о-фенантролин, п-ХМБ, PMSF, TPCK, TLCK, соевый ингибитор трипсина. Также был изучен ингибиторный и активаторный эффект по отношению к полученным протеазам со следующими соединениями: ϵ -аминокапроат; аскорбат; гепарин.

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

Измерение термостабильности и температурного оптимума работы протеаз микромицета *S. strictum*. Для измерения термостабильности и температурного оптимума работы фермента использовали следующие температуры: 25, 30, 37, 45, 55 и 65°C.

Хранение препаратов протеаз микромицетов. Высушенные препараты – сырцы были заложены на хранение при различных температурах (-80, -20, +4, +25, +37°C) на разные временные интервалы (неделя, месяц, 3 месяца, 6 месяцев, 9 месяцев, 1 год). Затем для оценки стабильности препаратов проводили определение следующих параметров: содержание белка, измерение урокиназной активности с соответствующим ХПС, измерение фибринолитической и активаторной активности методом фибриновых пластин.

Определение острой токсичности. Острую токсичность оценивали при внутрибрюшинном и внутривенном введении мышам C57Bl/6 и крысам линии Вистар обоих полов. Все исследования на животных проводили в соответствии с руководящими принципами Хельсинкской декларации и одобрены Комитетом по биоэтике Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (протокол 16-1 от 14.05.2021).

Определение аллергенности. Определение аллергенности проводили на крысах линии Вистар обоих полов; мышах линии СВА обоих полов; мышах CD1 обоих полов; кроликах породы «Советская шиншилла» обоего пола. Аллергенность препарата 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.

Определение иммунотоксичности. Определение иммунотоксичности проводили на (C57Bl/6xDBA) мышах F1. 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.

Изучение активности препарата Стриктолиаза в различных носителях на модели внутридермальной гематомы. Эффективность препарата для наружного применения против гематом была исследована с использованием в качестве носителей кремовой и гелевой основы. Исследование по оценке эффективности проводили на крысах Вистар обоих полов.

Основные результаты и обсуждение

Морфо-физиологические особенности микромицета *Arthrobotrys longa* Mecht. 1 в глубинной культуре.

Изучение особенностей морфологии и физиологии микромицета *Arthrobotrys longa* Mecht. 1 в глубинных условиях культивирования позволило выявить

взаимосвязь развития культуры с образования ферментов. При его культивировании было отмечено, что на молодых гифах постоянно образуются одноклеточные микроконидии, которые прорастают молодыми гифами, давая начало новым мицелиальным генерациям. Изучение динамики роста и накопления протеолитических ферментов *A. longa* проводили в течение 216 часов. Соотнеся данные, полученные в результате измерения фибринолитической и активаторной к плазминогену активности, общей протеолитической активности, биомассы, удельной скорости роста, с данными световой микроскопии удалось установить наличие внутреннего эндогенного биоритма культуры с периодом в 72 часа. Во всех случаях максимальное образование внеклеточных протеаз с активаторной к плазминогену активностью отмечалось в момент синхронного прорастания конидий и образования молодых генераций мицелия.

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.

Для выявления механизма действия Лонголитина на белки плазмы крови проводили определение активности лиофилизированного препарата с хромогенными пептидными субстратами протеаз системы гемостаза – плазмина, тромбина, тканевого активатора плазминогена и урокиназы. Наиболее ярко выраженной оказалась активность по отношению к урокиназному субстрату, величина которой составила 555.24 нмоль рNA/мг×мин, что выявило его направленное действие в отношении данного субстрата.

Путем фракционирования препарата Лонголитин методом изоэлектрофокусирования было выявлено наличие трех активных протеаз, входящих в данный комплекс (рис. 1).

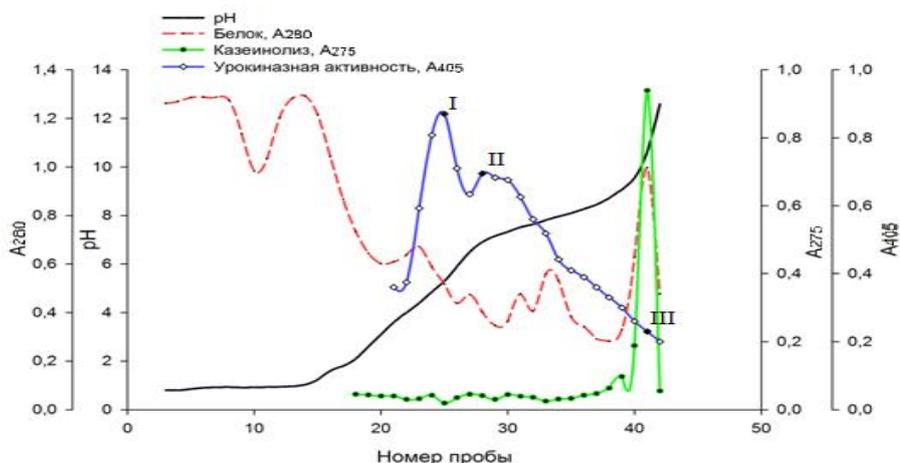


Рис. 1. Изоэлектрофокусирование препарата Лонголитин.

Определение общей протеолитической активности во фракциях позволило обнаружить пик активности в щелочной области с рI 10.64. Показано, что комплексный препарат обладал выраженной активаторной к плазминогену активностью урокиназного типа из-за обнаруженных двух протеаз с подобной активностью с рI 5.52 и 6.91.

Изучение активности экзопротеаз микромицета *S. strictum* 203.

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

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 *S. strictum* 203 проявляет высокую протеолитическую активность и обладает незначительной амилолитической активностью (рис. 2).

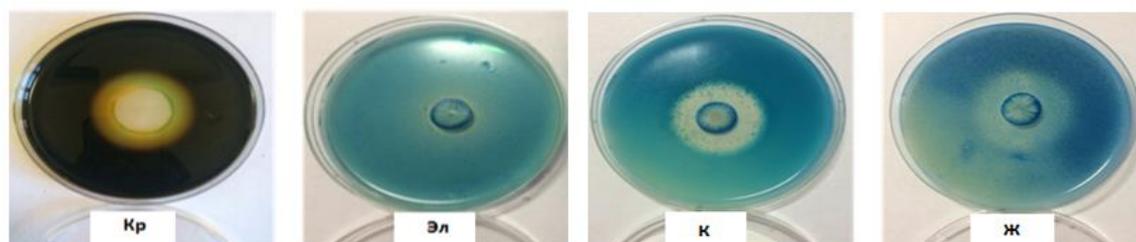


Рис. 2. Колонии *S. strictum* 203 на дифференциально-диагностических средах с содержанием казеина (К), желатина (Ж), крахмала (Кр) и эластина (Э), и зоны гидролиза субстратов.

Экспрессия внеклеточных протеаз микромицетов зависит от рН и состава среды культивирования, поэту был подобран оптимальный состав, содержащий K_2HPO_4 , $NaNO_3$, KNO_3 и сахарозу, а также, было подобрано оптимальное значение рН ферментационной среды равное 6.5. При культивировании микромицета в подобранных условиях наблюдали эндогенный биоритм культуры с периодом 96 часов.

Молекулярно-генетическая идентификация ассоцианта – микрофила.

При работе с *Arthrobotrys longa* Mecht. 1 после моноспорового посева на агаризованной среде Чапека–Докса нами был выделен неизвестный гриб-микофил, также обладающий фибринолитической активностью. При изучении макро- и микроморфологии микромицета была установлена принадлежность данного гриба к роду *Sarocladium*. Молекулярно-генетическая идентификация по участку нуклеотидной последовательности ITS1-5.8S-ITS2 рДНК позволила определить микромицет как *Sarocladium strictum*. Последовательность была депонирована в GenBank под номером MF192758.

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

Для определения потенциала нового штамма *S. strictum* 203 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. 1). Изучаемые типы активностей имеют большой практический интерес и являются первостепенными для определения перспективности новых препаратов. Для сравнения были выбраны препараты протеаз микромицетов, которые находятся на стадии разработки или уже используются в медицинских целях - Террилитин, внеклеточные препараты протеаз *Arthrotrys longa*, *Aspergillus ochraceus* и *Tolypocladium inflatum*, а также плазмин человека. Все использованные препараты проявляют высокую фибринолитическую или активаторную к плазминогену активность.

Изучение общей протеолитической активности с казеином показало, что протеолитический комплекс *S. strictum* 203 обладает низким сродством к казеину (184.88 мкмоль Туг/мг×мин) по сравнению с препаратами протеаз микромицетов. Несмотря на низкое содержание белка в препарате, протеолитический комплекс, образуемый микромицетом *S. strictum*, обладает высокой удельной активаторной к плазминогену активностью (3492.44 усл. ед./мг). Фибринолитическая активность, также выявленная методом фибриновых пластин, составила 2030.49 усл. ед./мг.

При сравнении субстратной специфичности с хромогенными пептидными субстратами со свойствами белков системы гемостаза, протеолитический комплекс *S. strictum* 203 проявил ярко выраженную урокиназную активность, значение которой составило 656.09 нмоль рНА/мг×мин. Схожую по значению активность имел только Лонголитин (555.24 нмоль рНА/мг×мин), который проявил высокое сродство по отношению к данному субстрату.

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

Таблица 1.

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 рНА/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 рНА/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

Свойства препарата Стриктолиаза, образуемого микромицетом *S. strictum*.

При изоэлектрофокусировании препарата Стриктолиаза в составе комплекса обнаружены три активных протеазы с рН 4.5, 7.2 и 11.8, в дальнейшем обозначенные как протеазы I, II и III (рис. 3). Протеазы I и II проявляют высокую активность по отношению к урокиназному субстрату, в то время как протеаза III обладает ярко выраженной общей протеолитической активностью.

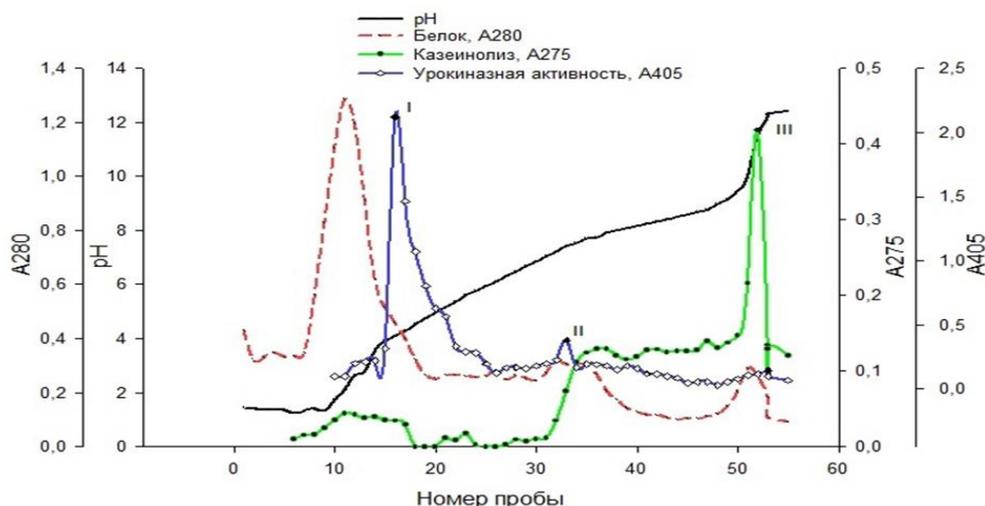


Рис. 3. Изоэлектрофокусирование препарата Стриктолиаза.

Изучение рН стабильности протеаз, входящих в состав комплексного препарата показало, что активность протеазы I находится в щелочной области. Протеазы II и III сохраняли высокую активность в нейтральной области рН. Прединкубация проб в кислых (до 5) и щелочных (с 11) значениях рН существенно подавляла активность всех трех изучаемых протеаз. рН оптимум активности протеазы I находился около 10. Протеаза II проявляла одинаково высокую активность в диапазоне рН от 5 до 8. Оптимум активности протеазы III находился около рН 9.

В результате изучения термостабильности было показано, что протеаза I проявляла высокую урокиназную активность и была стабильна после трех часов инкубации при +30 и +37°C. Протеазы II и III сохраняли высокую активность после инкубации только при +30°C. После трех часов инкубации при +55°C все изучаемые протеазы инактивировались. Температурный оптимум работы протеаз I и II составлял +55°C. Протеаза III была одинаково активна в диапазоне от +37 до +55°C. При температуре выше +55°C все изучаемые протеазы инактивировались.

Детальное изучение протеаз комплекса показало, что протеаза I является гликозилированной, II – слабо гликозилированной, а в составе протеазы III гликопротеинов обнаружено не было, при этом молекулярная масса изучаемых протеаз составляла 35 кДа. Проведенный ингибиторный анализ показал, что протеазы *S. strictum* 203 являются трипсиноподобными тиолзависимыми протеазами серинового типа. Также для протеаз I и II было обнаружено, что добавление в реакционную смесь гепарина увеличивает активность изучаемых протеаз. Оптимальная температура хранения препарата Стриктолиаза составила –80°C.

Для наглядного подтверждения ограниченного протеолиза плазминогена и расщепления фибриногена препаратом Стриктолиаза проводили денатурирующий электрофорез реакционной смеси после инкубации препарата с соответствующими белками (рис. 4). В результате инкубации плазминоген подвергался частичному протеолизу уже через 5 секунд с момента начала реакции. 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. По прошествии 5 и 10 секунд заметно снижалось количество высокомолекулярных компонентов фибриногена. На 20 секундах инкубации в реакционной среде фактически не наблюдалось остатков больше 50 кДа.

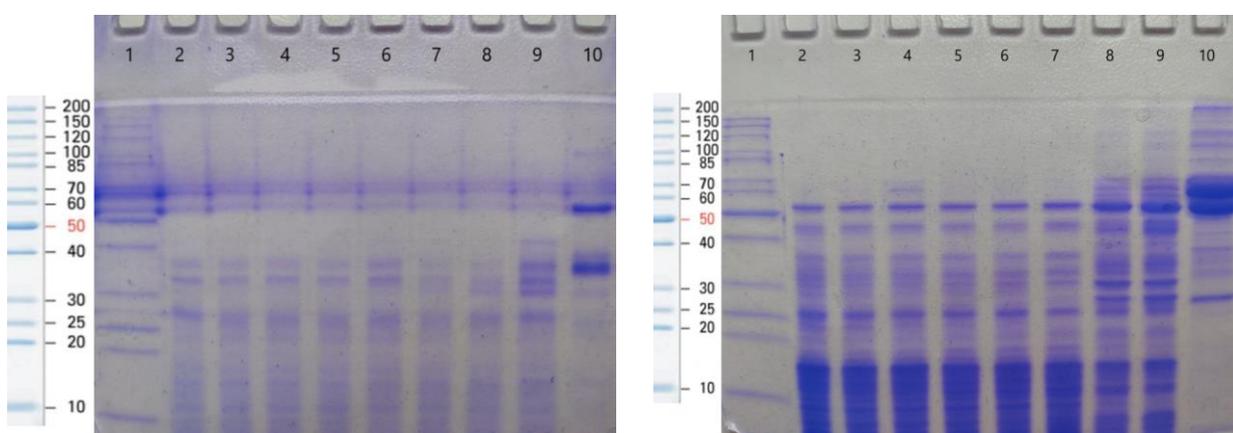


Рис. 4. Ограниченный протеолиз плазминогена и фибриногена под действием препарата Стриктолиаза.

Оценка препарата Стриктолиаза в качестве фармацевтической субстанции.

При проведении доклинических испытаний препарата Стриктолиаза, образуемого микромицетом *S. strictum* 203, не выявлено иммунотоксичных и аллергенных свойств при испытании данной субстанции на животных, а также отсутствовала острая токсичность.

Для оценки эффективности препарата Стриктолиаза в составе крема проводили аппликацию субстанции на внутридермальные гематомы крыс. В результате наблюдали значительное сокращение поврежденного участка дермы начиная с 4 суток наблюдения в сравнении с контролем (рис. 5).



Рис. 5. Изменения площади внутрикожных гематом у крыс с 1 по 9 день наблюдений.

По результатам, полученным в тесте Данна (выявление значимости внутри каждой из экспериментальных групп относительно контроля), статистически значимое различие между контрольной группой и группой, получавшей крем с конечной концентрацией препарата 30 мг/мл, наблюдали на 4 – 6 и 8 сутки измерений.

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 (Sharma, 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, 2020., Hanff, 2020., Thomas, 2022., Fanaroff, 2023). В связи с этим, пациентам необходимо проводить антикоагулянтную профилактику.

Перспективным для медицины представляется тромболитический препарат Стриктолиаза, полученный из культуральной жидкости микромицета *S. strictum* 203. 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 изученные ферменты. 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* 203, 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, входящие 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 *Arthrotrys 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 активность к плазминогену 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 и 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.

**Список работ, опубликованных по теме диссертации в рецензируемых
журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI,
рекомендованных для защиты в диссертационном совете
МГУ имени М.В.Ломоносова:**

1. Alipkina S.I., **Kornienko E.I.**, Nalobin D.S., Osmolovskiy A.A. Acute toxicity, immunotoxicity and allergenicity of protease complex obtained from micromycete *Sarocladium strictum* // *Pharmaceutics*. – 2021. – Т. 13. – №. 10. – С. 1660. DOI: 10.3390/pharmaceutics13101660. (IF (WoS) = 6,321; IF (SJR) = 0,8 (Q1)). 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 = 0,962. [**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 WoS 0,886; IF SJR = 0,24)]. (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 = 0,495). (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 (WoS) = 1,156; IF (SJR) = 0,35 (Q 3))]. (0,31/0,25)

Патент РФ:

5. **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 регистрации 30.12.2019. № 2019144891. Опубликовано 29.07.2020. (0,5/0,4)