

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-микофил, 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 °С. 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): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 4.4, NaNO<sub>3</sub> – 19, KNO<sub>3</sub> – 2.5, сахароза – 40, вода – водопроводная, рН среды составлял 6.5. Среда для посевного 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): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,5, MgSO<sub>4</sub> – 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  $-20^{\circ}\text{C}$ . 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  $86^{\circ}\text{C}$  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  $\text{мм}^2$ . 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  $\text{Cu}^{2+}$  до  $\text{Cu}^+$ , 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:  $\epsilon$ -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 С57В1/6 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 (С57В1/6хDBA) 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).

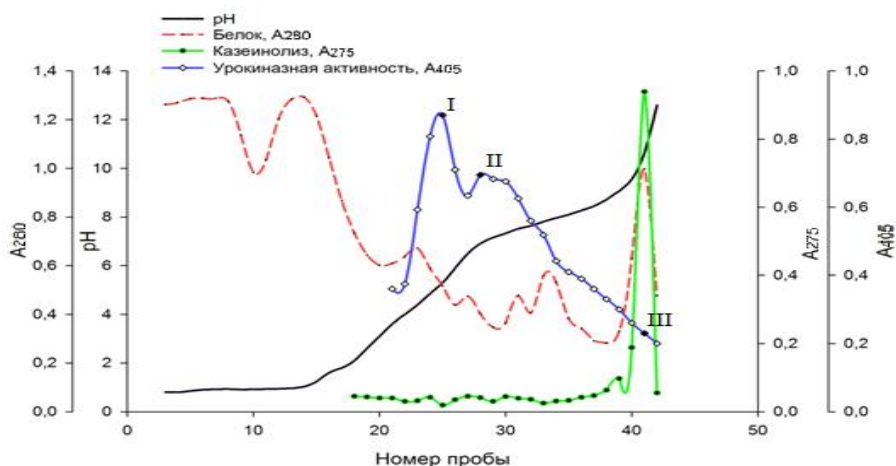


Рис. 1. Изоэлектрофокусирование препарата Лонголитин.

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).

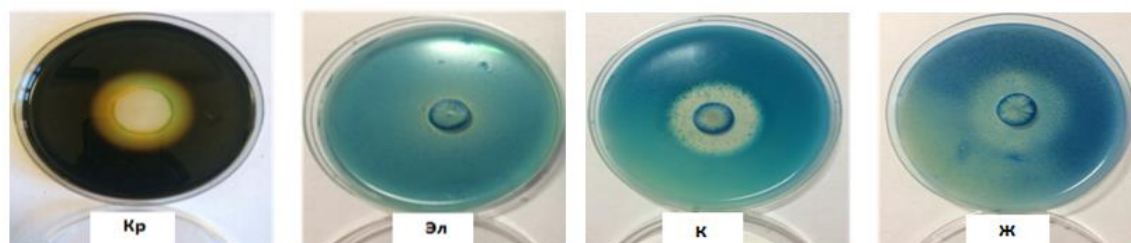


Рис. 2. Колонии *S. strictum* 203 на дифференциально-диагностических средах с содержанием казеина (К), желатина (Ж), крахмала (Кр) и эластина (Э), и зоны гидролиза субстратов.

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 рI 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.

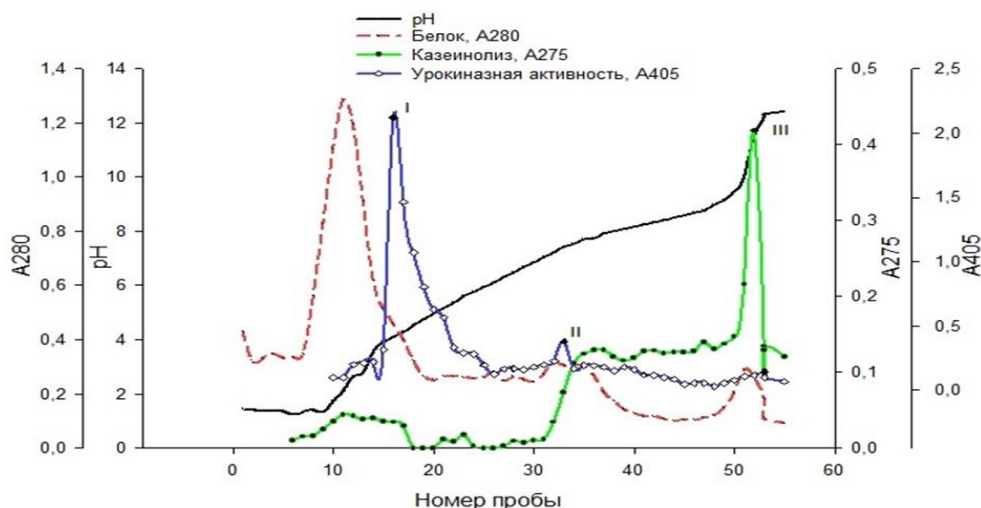


Рис. 3. Изоэлектрофокусирование препарата Стриктолиаза.

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.

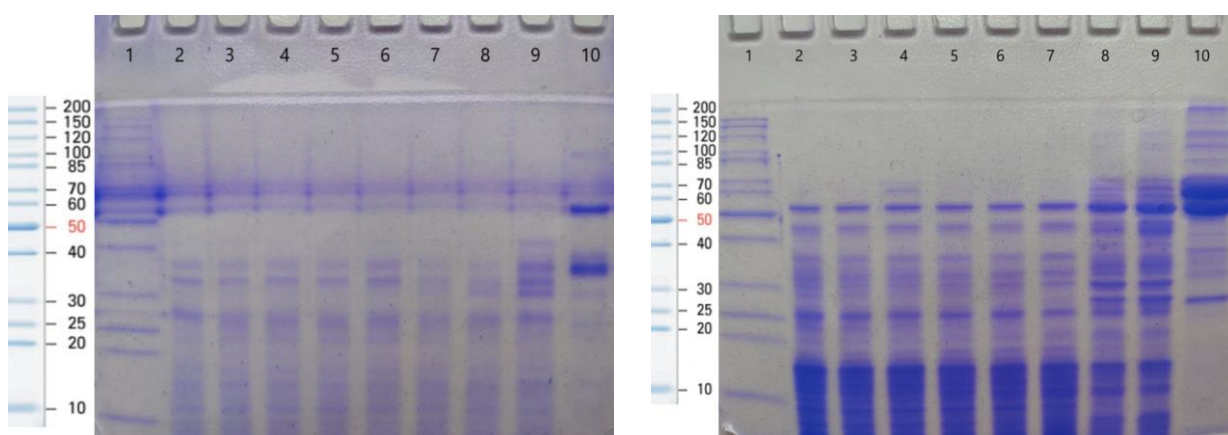


Рис. 4. Ограниченный протеолиз плазминогена и фибриногена под действием препарата Стриктолиаза.

#### **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).

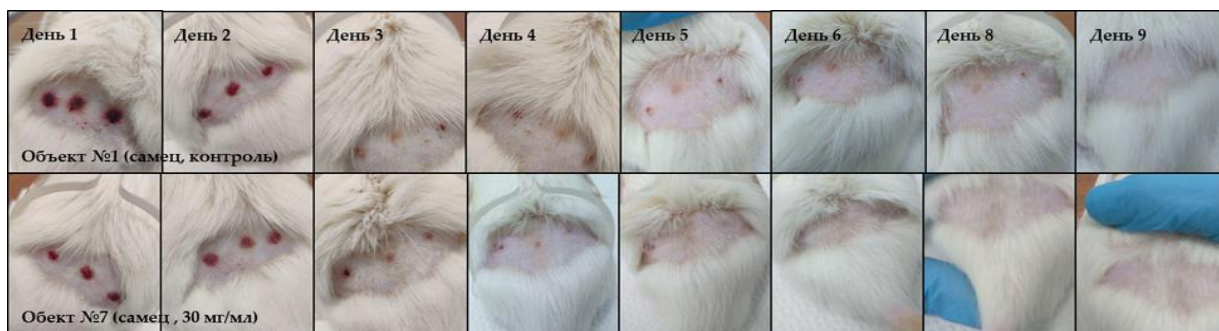


Рис. 5. Изменения площади внутрикожных гематом у крыс с 1 по 9 день наблюдений.

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)