

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Фокичев Николай Сергеевич

**ТРОМБОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРОМИЦЕТОВ
РОДА *TOLYROCLADIUM*: СКРИНИНГ ПРОДУЦЕНТОВ И
СВОЙСТВА ПРОТЕИНАЗ**

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2023

Диссертация подготовлена на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Научный руководитель – *Осмоловский Александр Андреевич* –
кандидат биологических наук

Официальные оппоненты – *Садыкова Вера Сергеевна* –
доктор биологических наук, доцент, ФГБНУ
«Научно-исследовательский институт по
изысканию новых антибиотиков имени Г. Ф.
Гаузе», заместитель директора по научной
работе, отдел микробиологии, лаборатория
таксономического изучения и коллекции культур
микроорганизмов, заведующая лабораторией
– *Терёшина Вера Михайловна* –
доктор биологических наук, ФГУ «Федеральный
исследовательский центр «Фундаментальные
основы биотехнологии» РАН», Институт
микробиологии им. С.Н. Виноградского, группа
экспериментальной микологии, руководитель
группы, ведущий научный сотрудник
– *Белякова Галина Алексеевна* –
кандидат биологических наук, доцент, ФГБОУ
ВО «Московский государственный университет
имени М.В.Ломоносова», биологический
факультет, кафедра микологии и альгологии,
доцент

Защита диссертации состоится «14» марта 2023 г. в 15:30 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 389.

E-mail: nvkostina@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.2/2412>

Автореферат разослан «10» февраля 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Н.В. Костина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. Сердечно-сосудистые заболевания занимают лидирующую позицию среди причин общемировой смертности (31%) и ежегодно уносят жизни более 8,9 млн. человек. При этом около 15,5% случаев смертности приходится непосредственно на ишемическую болезнь сердца, около 11,1% – на инсульты и связанные с ними последствия, около 2,3% – на состояния, связанные с развитием тромбоэмболии легочной артерии. Более того, практически все патологии сердечно-сосудистой системы и системы гемостаза так или иначе сопряжены с возникновением и развитием тромбозов в период лечения.¹

Одними из наиболее эффективных средств для борьбы с тромботическими осложнениями с точки зрения современной медицины являются препараты – активаторы плазминогена. Они способны оказывать стимулирующее действие на собственную систему тромболизиса человека, одновременно освобождая кровеносное русло от тромбов и при этом не вызывая серьезных последствий, связанных с обильными кровотечениями и ретромбозами. Однако применение подобных лекарств в России (стрептокиназы, урокиназы, альтеплазы и их более современных аналогов) на данный момент значительно ограничено в связи с их достаточно высокой стоимостью и значительными рисками непереносимости: кровопотерей, возникновением разнообразных реакций гиперчувствительности организма и обширных кровоизлияний в жизненно-важные органы (Baker, 2002).

Инновационным подходом к решению проблемы терапии и диагностики тромбозов может стать использование лекарств, основанных на протеолитических ферментах микромицетов. Возможность их эффективного использования была описана и показана российскими микробиологами в конце XX века в опытах *in vitro* и *in vivo*.

Поиск специфичных и безопасных тромболитических веществ является важной задачей современной медицины и биотехнологии (Balami et al., 2013). Значимым подходом к расширению пула тромболитических препаратов является использование для такого лечения более специфичных и безопасных протеиназ, получаемых из культуральной жидкости микромицетов (Hao et al., 2018). Предпочтительным является использование для этих целей активаторов плазминогена из-за их большей специфичности действия и меньших негативных последствий, по сравнению с применением традиционных фибринолитических протеиназ.

Одним из перспективных продуцентов, протеиназы которого обладают не только выраженной плазминоподобной активностью, но и активаторной к плазминогену активностью, является штамм почвенного микромицета *Tolypocladium inflatum* k1 (Шаркова и соавт., 2016). Виды *Tolypocladium* существуют как сапротрофы, так и как патогены насекомых (Bissett et al., 1983). *Tolypocladium inflatum*, а также *Tolypocladium cylindrosporum* являются энтомопатогенными представителями своего рода, которые изучались в качестве возможных агентов биологической борьбы с насекомыми.

¹ По данным официального сайта Всемирной организации здравоохранения на 2019 г. (<https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates>)

Различные свойства этих микромицетов, связанные с их патогенностью и способностью проникать через кутикулу насекомых, имеют большое биотехнологическое значение. В данных процессах могут участвовать ферментные комплексы, катализирующие липолиз, хитинолиз и протеолиз.

Перспективным биотехнологическим подходом к разработке новых тромболитических препаратов на основе продуцентов из группы *Tolypocladium* представляется изучение штаммов микромицетов данного рода, выделенных не только из почвенных экониш, но также полученных из других грунтов с отличными физико-химическими свойствами. Источником подобных штаммов может являться экониша донных грунтов Белого моря. Рядом исследователей было показано большое разнообразие микромицетов, существующих в данных физико-химических условиях. Песчаные грунты прибрежной зоны морей представляют собой специфические и практически неизученные местообитания грибов. Их уникальность связана, в первую очередь, с особенностями литоральной зоны, для которой характерно периодическое затопление и осушение, регулярные изменения влажности, солености и температуры. Использование культуральных методов позволяет выделять из донных осадков разнообразные виды микромицетов, в том числе и некоторые новые для науки (Бубнова, 2009).

В данной работе был изучен тромболитический потенциал нескольких штаммов микромицетов рода *Tolypocladium*, выделенных из грунтов Белого моря, в сопоставлении с биотехнологическим и медицинским потенциалом ранее исследованного штамма микромицета *Tolypocladium inflatum* k1. Сравнение свойств ферментных препаратов, выделенных из микромицетов рода *Tolypocladium*, полученных из донных грунтов Белого моря, со свойствами охарактеризованного почвенного штамма-продуцента тромболитических веществ *Tolypocladium inflatum* k1 позволит выявить наиболее оптимальный микромицет-продуцент с биотехнологической точки зрения, описать особенности выделяемых тромболитических препаратов и охарактеризовать возможность их медицинского применения. Полученные данные могут быть в дальнейшем использованы для разработки тромботерапевтических средств на основе препаратов микромицетов данной группы, а также диагностических наборов (диагностикумов) на отдельные патологии системы гемостаза.

Цель и задачи работы. Целью настоящей работы было охарактеризовать биотехнологический потенциал микромицетов рода *Tolypocladium*, выделенных из донных грунтов Белого моря, для тромботерапии и диагностики патологий системы гемостаза человека.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Идентифицировать по молекулярно-биологическим признакам штаммы-изоляты рода *Tolypocladium*, выделенные из грунтов Белого моря.
2. Провести сравнительный анализ тромболитических показателей исследуемых штаммов друг с другом по значениям энзиматического индекса на диагностических средах с казеином, фибрином и фибриногеном, и выбрать наиболее специфичный в отношении фибриллярных белков.

3. Выявить оптимальные условия (состав, температура, рН, соленость среды) глубинного культивирования выбранного штамма для достижения максимального выхода тромболитических препаратов протеиназ из культуральной жидкости в лабораторных условиях.

4. Охарактеризовать физико-химические и тромболитические свойства препарата протеиназ, выделяемых из культуральной жидкости наиболее перспективного штамма-продуцента, а также отдельных белковых фракций, полученных изоэлектрофокусированием препарата.

5. Провести сравнительный анализ наиболее перспективного по совокупности тромболитических показателей штамма *Tolypocladium* среди выделенных из грунтов Белого моря, с аналогичными показателями известного ближайшего аналога – продуцента тромболитического препарата штамма микроциета-энтомофага *Tolypocladium inflatum* k1.

6. Охарактеризовать возможное биотехнологическое применение и пути коммерциализации препарата протеиназ наиболее перспективного по совокупности тромболитических показателей штамма *Tolypocladium* среди выделенных из грунтов Белого моря.

Объектами исследования являлись семь изолятов микроциетов рода *Tolypocladium*, выделенных из грунтов Белого моря, штамм *Tolypocladium inflatum* k1, а также препараты их внеклеточных протеиназ, полученные из культуральной жидкости микроциетов в результате глубинного культивирования на средах разного состава, и отдельные фракции, полученные в результате их последующего разделения методом изоэлектрофокусирования.

Предметом исследования являлись разнообразные биотехнологические способы выявления и оценки тромболитического потенциала микроциетов, необходимого для создания медицинских препаратов и диагностических наборов на основе их экзопротеиназ.

Научная новизна работы. Впервые показано наличие тромболитического потенциала у семи штаммов микроциетов рода *Tolypocladium*, выделенных из грунтов Белого моря, проведен отбор наиболее оптимального продуцента по показателям тромболитической эффективности (по значениям энзиматического индекса на диагностических средах с казеином, фибрином и фибриногеном, а также по степени эффективности протекания тромболитического процесса на модели фибринового тромба *in vitro*), и обладающего максимальной тромболитической активностью (фибринолитической и активаторной к плазминогену) в данной группе.

Оптимизированы условия культивирования (подобран температурный оптимум, рН-оптимум, соленость) для поверхностного и глубинного культивирования исследуемых штаммов-продуцентов и наработки ими тромболитических препаратов (при глубинном культивировании на средах различного состава выбрана оптимальная органоминеральная ферментационная среда для культивирования).

Впервые изучены и сопоставлены биохимические свойства экзопротеиназ штаммов *Tolypocladium inflatum* 62a и штамма *Tolypocladium inflatum* k1 (ближайшего ранее описанного аналога, обладающего тромболитическим потенциалом) по

показателям степени тромболизиса, фибринолитической и активаторной активности, а также активности в отношении отдельных белков системы гемостаза (реакции с хромогенными субстратами), термо- и рН-стабильности, наличие коагулазной активности и реакции на гликопротеины.

Впервые для протеиназ штамма *Tolypocladium inflatum* 62a показано наличие выраженного пролонгированного во времени тромболитического эффекта в отношении лизиса фибринового геля, что свидетельствует о возможности его применения для разработки тромболитических лекарственных препаратов, в т.ч. комбинированных, с медленным клиренсом из кровотока, позволяя минимизировать затраты на количество вводимой субстанции, тем самым снижая стоимость препарата и геморрагические риски для пациента. Также наличие подобного эффекта может быть использовано для разработки диагностикумов на патологии системы гемостаза, оценки резерва плазминогена и состояния фибринолитической системы. Помимо этого, возможно использование препарата протеиназ для создания аппликационных медицинских изделий для наружного применения – раневых повязок, противогематомных и ангиопротекторных мазей.

Теоретическая и практическая значимость работы. Исследование тромболитических свойств штаммов микромицетов рода *Tolypocladium* включает не только идентификацию новых штаммов микроорганизмов, но и выявление новых продуцентов препаратов, обладающих более выраженными тромболитическими свойствами, такими как фибринолитическая и активаторная к плазминогену активность, степень эффективности тромболизиса, специфичность в отношении отдельных белков системы гемостаза, а также отдельных белковых фракций, полученных после разделения методом изоэлектрофокусирования, по сравнению с ранее исследованными близкими аналогами (например, *Tolypocladium inflatum* k1).

Практическая значимость работы заключается в выявлении нового источника тромболитических препаратов для терапии и борьбы с тромботическими осложнениями, в том числе ангиопротекторов для наружного применения при лечении гематом, раневых повязок и создания диагностических наборов (диагностикумов) на отдельные патологии системы гемостаза.

Методология и методы исследования. Автором выполнены анализ отечественной и зарубежной литературы по теме исследования, планирование и проведение экспериментальной и теоретической частей работы с использованием современных методов микробиологии и биотехнологии, биохимии, молекулярной биологии и биоинформатики. Полученные результаты были проанализированы, систематизированы и изложены в тексте работы, сформулированы выводы и практические рекомендации.

Положения, выносимые на защиту:

1. Штамм *Tolypocladium inflatum* 62a среди семи выделенных из грунтов Белого моря штаммов микромицетов, относящихся по видовой принадлежности к *Tolypocladium inflatum* и *Tolypocladium cylindrosporum*, обладает наиболее выраженным тромболитическим потенциалом, демонстрирует высокую специфичность к

фибрилярным белкам при поверхностном культивировании на диагностических средах с казеином, фибрином и фибриногеном.

2. Получение препарата протеиназ *Tolypocladium inflatum* 62a рекомендуется проводить из культуральной жидкости в условиях глубинного культивирования микромицета в органоминеральной ферментационной среде при температуре 28°C, pH от 6,5 до 7,0, солености 26‰ на пятые сутки культивирования.

3. Препарат протеиназ, полученный из культуральной жидкости *Tolypocladium inflatum* 62a, стабилен в физиологических условиях, демонстрирует более высокую фибринолитическую и активаторную к плазминогену активность и степень лизиса фибриновых тромбов в *in vitro* модели в сравнении с препаратом штамма ближайшего аналога – почвенного микромицета *Tolypocladium inflatum* k1.

4. Для протеиназы, полученной из препарата микромицета *Tolypocladium inflatum* 62a методом изоэлектрофокусирования, показан пролонгированный во времени тромболитический эффект в отношении лизиса фибринового геля и длительное сохранение (до нескольких суток) фибринолитической активности.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов определяется значительным объемом проведенных исследований, использованием в работе современных экспериментальных, статистических и биоинформатических методов. Достоверность результатов также подтверждается публикациями в рецензируемых отечественных и международных журналах, и патентом в РФ. Результаты диссертации были представлены на следующих российских и международных конференциях: «Ломоносов-2020» и «Ломоносов-2021» (Москва, 2020, 2021), «Геномика, метагеномика и молекулярная биология микроорганизмов» (Москва, 2022), «LIMSC» (Нидерланды, 2017), «18th European Congress on Biotechnology» (Швейцария, 2018), «ISCOMS» (Нидерланды, 2020) и «PhD Scientific days» (Венгрия, 2020).

Личный вклад автора заключается в самостоятельном выполнении теоретических и экспериментальных исследований, представленных в работе, анализе литературных данных, планировании и проведении экспериментов, обработке полученных результатов, подготовке и написании публикаций и научных докладов.

Структура работы. Работа состоит из следующих разделов: «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», и «Список литературы». Работа изложена на 172 страницах, содержит 56 рисунков и 14 таблиц. Список литературы включает 156 источников, в том числе 131 иностранный.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, среди них 3 статьи в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова, и 8 тезисов. Получен патент РФ № №2788697 «Способ оценки тромболитического потенциала микромицетов». В статьях и патенте, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность и глубокую признательность за научное руководство, всестороннюю поддержку и неоценимую

помощь при выполнении работы своему научному руководителю – к.б.н. Александру Андреевичу Осмоловскому, всему коллективу сотрудников научной группы по изучению протеолитических ферментов микромицетов направленного действия и кафедры микробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, а также д.б.н. Цавкеловой Елене Аркадьевне за подробное обсуждение материалов диссертации и ценные рекомендации, которые позволили существенно улучшить и структурировать изложенные в работе данные. Отдельную благодарность автор выражает своей жене Фокичевой Джулии Шавкатовне и родителям – Фокичевой Ксении Борисовне и Фокичеву Сергею Сергеевичу за напутствия и безграничную поддержку, сопровождающую подготовку работы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы рассмотрены современные представления о системе гемостаза человека, развитии патологических состояний, ассоциированных с тромбозами, а также современные биотехнологические подходы к тромботерапии, основанные на использовании секретируемых протеиназ микромицетов. Особое внимание уделяется рассмотрению механизмов развития тромботических осложнений, возникающих при терапии сердечно-сосудистых заболеваний и новой коронавирусной инфекции (COVID-19), а также способам их купирования с помощью тромболитических препаратов разных поколений. Приводится подробная характеристика секретируемых протеиназ микромицетов, их биотехнологического значения и перспектив использования в лечении и диагностике патологий системы гемостаза человека. Дано подробное описание микромицетов рода *Tolyposcladium* как биотехнологически перспективных продуцентов тромболитических препаратов, и экониши грунтов Белого моря как источника для скрининга новых перспективных штаммов микромицетов, обладающих тромболитическим потенциалом для решения биотехнологических, медицинских и диагностических задач.

Глава 2. Материалы и методы исследования

Объект исследования. Объектом исследования служили образцы изолятов микромицетов из грунтов Белого моря, предположительно относящиеся к роду *Tolyposcladium*, любезно предоставленные заведующим кафедрой микологии и альгологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, д.б.н. Кураковым А.В. Другим объектом исследования служил штамм микромицета *T. inflatum* k1, любезно предоставленный к.б.н. Шарковой Т.С., который был ранее изучен как продуцент протеиназ, обладающих фибринолитической и активаторной к плазминогену активностью (Шаркова и др., 2016).

Посевной материал получали смывом спор с поверхности культуры, выращенной в пробирках на скошенном сусло-агаре (СА) в течение 7 сут при 25°C в питательную среду состава (%): сусло – 6.7, глюкоза – 2, пептон – 0.1 (Батомункуева и Егоров, 2001). После 2 суток культивирования часть биомассы переносили в ферментационную среду состава (%): глицерин – 7, глюкоза – 3, гидролизат рыбной муки – 3, NaNO₃ – 0.2, MgSO₄ x 7H₂O – 0.1, KН₂PO₄ – 0.1. Культивирование микромицета осуществляли в колбах

объемом 750 мл, содержащих 100 мл среды, на орбитальной качалке (200 об/мин) при 28°C. Чистые культуры грибов хранили в пробирках со скошенным СА при 4°C.

Молекулярно-генетическая идентификация изолятов микромицетов из грунтов Белого моря. Чистые культуры микромицетов хранили в пробирках со скошенным сусло-агаром при температуре 4°C. Идентификацию культур проводили по морфолого-культуральным признакам на СА и агаре Чапека с использованием определителей (Gams, 1971; Kohlmeyer, Kohlmeyer, 1979; Bissett, 1983; Zare, Gams, 2001; Klich, 2002; Rice, Currah, 2005; Crous et al., 2007; Domsch et al., 2007; Seifert et al., 2011), по генетическим признакам – с помощью секвенирования ITS-участка 5,8S рДНК. Мицелий получали культивированием чистых культур на СА или на жидком сусле при 25°C в течение 7-20 суток в зависимости от роста микромицета, отделяли от среды и растирали с жидким азотом в стерильной керамической ступке. Выделение ДНК проводили с использованием СТАВ буфера (0.5 М NaCl, 10 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 10 мМ ЭДТА, 2% (w/v) СТАВ) по стандартному протоколу экстракции (Rogers, Bendich, 1985). Для амплификации рДНК были использованы универсальные праймеры ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) и ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) с применением стандартных ПЦР-протоколов (White et al., 1990). Для ПЦР использовали HS Taq ДНК-полимеразу производства компании «Евроген» (Россия). Фрагменты ДНК разделяли электрофорезом в 1.2% агарозном геле с добавлением EtBr. В качестве буферной системы использовали Трис-ацетат-ЭДТА-буфер (ТАЕ). После электрофореза гели анализировали в УФ свете с длиной волны 360 нм. Ампликон экстрагировали из геля с помощью набора CleanUp Mini («Евроген», Россия). Секвенирование последовательностей проводила компания «Евроген». ДНК секвенировали с использованием набора BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, США) на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 xl (Applied Biosystems, CA, США). Полученные последовательности нуклеотидов использовали для поиска соответствия в базе данных GenBank (NCBI) и видовой идентификации с помощью биоинформатического программного обеспечения BLAST.

Выявление протеолитического потенциала штаммов (определение энзиматического индекса штаммов микромицетов). Выявление протеолитического потенциала штаммов микромицетов проводили в условиях поверхностного культивирования в чашках Петри на среде Чапека с добавлением различных субстратов (казеина, фибрина, фибриногена). Посев проводили уколом в центр чашки, измерения диаметров зон колоний и их гидролитической активности проводили через 7 суток. Энзиматический индекс (EI) рассчитывали как отношение диаметра зоны лизиса (D) к диаметру колонии микромицета (d).

Зависимость радиальной скорости роста микромицетов-продуцентов от рН, температуры и солености. Оптимальные условия для роста штаммов определяли при их выращивании на агаризованной среде Чапека в чашках Петри при различных температурах (4, 12, 20, 28 и 37°C) и значениях рН (4.0, 5.0, 6.0, 7.0 и 8.0). Посев проводили уколом в чашку Петри со средой в трехкратной повторности. Диаметр (мм) колонии измеряли ежедневно в течение 10 суток. Скорость радиального (линейного)

роста рассчитывали по формуле: $Kr = \Delta R / \Delta t$ (Паников, 1991), где R – размер колонии (мм), t – время (сут).

Определение концентрации белка. Концентрацию белка рассчитывали с помощью метода определения с бидинхониновой кислотой (Redinbaugh, 1986).

Получение препарата протеиназ из культуральной жидкости и его разделение на отдельные фракции методом изоэлектрофокусирования (ИЭФ). Для наработки и последующего выделения препарата протеиназ штаммы выращивали в глубинных условиях на орбитальных качалках (200 об/мин) в колбах объемом 750 мл со 100 мл питательной среды при 28°C. Посевной материал получали смывом спор микромицетов с агаризованной среды Чапека в среду, содержащую сусло, глюкозу и пептон (Батомункуева и Егоров, 2001), с дальнейшим культивированием в течение 2 суток. Затем культивирование осуществляли на ферментационной среде – посевной материал в объеме 3 мл переносили в среды культивирования – органоминеральную (среда №1) и минеральную (среда №2) по содержанию азота, и культивировали в течение 3 суток. Среда №1 имела состав (в г/л): глюкоза – 30.0, глицерин – 70.0, гидролизат рыбной муки – 5.0, NaNO_3 – 2.0, KH_2PO_4 – 0.5, MgSO_4 – 0.5; среда №2 (в г/л): глюкоза – 35.0, крахмал – 10.0, NH_4NO_3 – 5.0, NaCl – 2.0, KH_2PO_4 – 0.5, MgSO_4 – 0.5. Культуральную жидкость отделяли от биомассы фильтрованием водоструйным насосом через фильтровальную бумагу («ФС», Россия). Внеклеточные белки из полученной культуральной жидкости осаждали сульфатом аммония при 80%-ной степени насыщения. Осадок белков формировался при 4°C в течение 12 ч. Затем его отделяли центрифугированием при 15000 g (20 мин, 4°C), растворяли в минимальном объеме 0.01M Трис-НСl-буфера, рН 8.2, содержащего 0.002M ацетат кальция, и диализовали в диализных мешках против того же буфера (12 ч, 4°C). Полученный раствор белков центрифугировали в аналогичных условиях для удаления осадка и затем лиофильно высушивали.

Белковые фракции разделяли методом ИЭФ на колонке объемом 110 мл (LKB, Швеция) в градиенте плотности сахарозы 0-40% и рН 3-10, создаваемом амфолинами (Pharmacia, Швеция), при напряжении 700В в течение 36 ч (Осмоловский и др., 2013). Во фракциях (объемом 1 мл) после элюции с колонки определяли рН, содержание белка по оптической плотности при 280 нм и общую протеолитическую активность. Дальнейшие эксперименты по определению тромболитического потенциала и тромболитической активности проводили в «пиковых» фракциях после ИЭФ.

Определение общей протеолитической активности. Общую протеолитическую активность в препаратах микромицетов, а также во фракциях, полученных после ИЭФ, определяли модифицированным методом Ансона-Хагихары по количеству тирозина в неосаждаемых трихлоруксусной кислотой продуктах протеолиза после 10-минутного гидролиза 1%-ного раствора казеина в 0.1M Трис-НСl буфере (рН 8.0-8.2, 37°C) (Osmolovskiy et al., 2016). Активность выражали в мкмоль тирозина в минуту ($E_{\text{Тир}}$). Удельную активность рассчитывали на мг белка и выражали в $E/\text{мл} \times 10^{-3}$.

Определение фибринолитической активности. Способность фермента расщеплять фибрин также оценивали по количеству высвобождаемого в ходе ферментативной реакции тирозина. За единицу активности, как и в случае с

определением общей протеолитической активности, принимали количество мкмоль тирозина, отщепившегося за минуту в 1 мл исследуемой пробы.

Определение фибринолитической и активаторной к плазминогену активности методом фибриновых пластин. Фибринолитическую и активаторную к плазминогену активность в препаратах микромицетов, а также во фракциях, полученных после ИЭФ, определяли на фибриновых пластинах методом «фибриновых чашек» Аструпа-Мюллерц-Лассена (Astrup, Mullertz, 1952; Lassen, 1952).

Определение протеолитической активности в отношении отдельных белков системы гемостаза. Протеолитическую активность в культуральной жидкости, препаратах и отдельных фракциях микромицетов после ИЭФ в отношении отдельных белков системы гемостаза определяли по гидролизу хромогенных пептидных субстратов (ХПС) (Osmolovskiy et al., 2012), имеющих в качестве хромофора пара-нитроанилидную группу (-pNA): плазмينا (HD-Val-Leu-Lys-pNA; For-Ala-Phe-Lys-pNa), тромбина (Tos-Gly-Pro-ArgpNA и H-D-Phe-Pip-Arg-pNA), сериновых протеаз (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA), урокиназы (pGlu-Gly-Arg-pNA), фактора Ха (HD-Ile-Pro-Arg-pNa), субтилизина (Z-Ala-Ala-Leu-pNa), эластазы (Suc-Ala-Ala-Ala-pNa) и трипсина (Bz-Arg-pNa). За единицу активности (Е) во всех случаях принимали количество мкМ отщепившегося пара-нитроанилина.

Изучение динамики накопления протеиназ, образуемых штаммами микромицетов. Динамику накопления протеиназ изучали в течение 5 суток глубинного культивирования штаммов в ферментационной среде с глюкозой (на 100 мл воды: глюкоза – 4 г, крахмал – 1 г, гидролизат рыбной муки – 0.5 г, пептон – 0.5 г, NaCl – 0,2 г, K_2HPO_4 – 0.05 г, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.005 г) по изменению параметров концентрации белка, pH, общей протеолитической активности, специфической протеолитической активности с хромогенным субстратом (плазминоподобной, субстрат – HD-Val-Leu-Lys-pNA), а также по фибринолитической и активаторной к плазминогену активностям. На основании полученных данных определяли штаммы с наиболее высоким тромболитическим потенциалом.

Определение pH- и температурного оптимума активности, и оптимума стабильности препарата. pH-оптимум активности препаратов микромицетов, а также во фракциях, полученных после ИЭФ, определяли в 0.4М универсальном (натрий-ацетат- фосфат-боратном) буфере с pH от 3.0 до 11.0. К 150 мкл буфера с соответствующим значением pH добавляли 100 мкл раствора фермента и 100 мкл раствора субстрата. Для определения pH-стабильности препаратов микромицетов, а также фракций, полученных после ИЭФ, проводили инкубацию препарата в растворах буфера с разными значениями pH при 37°C в течение 2 ч, после чего определяли казеинолитическую активность. Полученные результаты выражали в % от исходной общей протеолитической активности.

Температурный оптимум активности препаратов микромицетов, а также во фракциях, полученных после ИЭФ, определяли в 0.05М Трис-HCl буфере, pH 8.2, по казеинолитической активности при 25, 30, 37, 45, 55 и 65°C. Термостабильность препаратов микромицетов, а также фракций, полученных после ИЭФ, изучали при

инкубации фермента при заданных температурах в течение 2 ч и выражали в % от исходной общей протеолитической активности фермента.

Определение тромболитического эффекта (степени эффективности тромболиза). Для исследования тромболитического эффекта (степень тромболиза) препаратов микромицетов, а также фракций, полученных после ИЭФ, формировали фибриновый сгусток в пробирках типа Eppendorf путем добавления в каждую пробирку 100 мкл человеческой плазмы, полученной из крови донора, и 20 мкл тромбина, фиксировали массу пробирки до, во время (после каждого этапа) и после эксперимента. Добавляли к каждому образцу фибринового сгустка препарат протеиназ и фиксировали изменение массы через равные промежутки времени (30, 60 и 90 мин). По остаточной массе сгустка (выраженной в % от его первоначальной массы) определяли степень протекания тромболиза в образцах в динамике (Kotb et al., 2015).

Препаративный электрофорез белков. Электрофоретическое разделение белков препаратов микромицетов, а также фракций, полученных после ИЭФ, проводили в ПААГ по методу Дэвиса в трис-глициновом буфере, pH 8.3, с концентрацией акриламида в верхнем геле 6.0% и в нижнем – 7.5%.

Определение углеводного компонента в составе препаратов протеиназ. Углеводный компонент в составе молекул протеиназ микромицетов определяли с помощью периодной кислоты и реактива Шиффа методом дот-блоттинга на нитроцеллюлозных мембранах (Thronton et al., 1996). В качестве положительного контроля использовали раствор внеклеточной дрожжевой инвертазы (0.5 мг/мл), а в качестве отрицательного – 0.5 мг/мл БСА.

Выявление коагулазной активности. Наличие коагулазной активности в препаратах микромицетов, а также в отдельных фракциях, полученных после ИЭФ, выявляли по визуализации фибринового волокна в экспериментах со свертыванием фибриногена человека (Fibrinogen from Human Plasma, Sigma-Aldrich, США) и быка (Bovine fibrinogen 9001-32, H2B Medical, США), а также в экспериментах с плазмой человека и плазмой кролика. В пробирки типа Eppendorf добавляли 0,1 мл препарата протеиназ и 0,2 мл 0.4% раствора фибриногена. В качестве контроля использовали 0.1% раствор протромбина.

Обработка результатов. Все эксперименты проводили в трех-пяти повторностях, данные в таблицах и на графиках представлены средним арифметическим значением с учетом стандартного отклонения. Гистограммы и графики построены с учетом пределов погрешностей полученных значений. Обработку данных проводили в программах Microsoft Excel, STATISTICA 8.0, GraphPad Prism.

Глава 3. Результаты и обсуждение

Молекулярно-генетическая идентификация изолятов микромицетов из грунтов Белого моря

Идентификацию изолятов микромицетов первоначально проводили по морфолого-культуральным признакам, затем для подтверждения видовой принадлежности и построения филогенетического древа штаммов осуществляли идентификацию по молекулярно-генетическим признакам.

В результате идентификации штаммов-изолятов до вида по последовательности 5,8S рДНК установлено, что выделенные штаммы относились к видам *Tolypocladium inflatum* и *Tolypocladium cylindrosporum*, но не были идентифицированы как на 100% идентичные известным штаммам. Штаммам были присвоены идентификационные наименования *Tolypocladium cylindrosporum*: 150а; *Tolypocladium inflatum*: 13а; 14а; 30а; 49а; 62а; 126а. Помимо видовой идентификации штаммов, проводили выравнивание полученных последовательностей модулем программ BLAST, а также строили филогенетическое древо (рис. 1) взаимосвязи полученных штаммов (кладограмма) с помощью пакета программ ClustalW, согласно которому полученные штаммы можно условно разделить на отдельные подгруппы в зависимости от их филогенетической близости друг к другу. В первую группу вошел *T. cylindrosporum* 150а, во вторую – *T. inflatum* 30а, *T. inflatum* 49а и *T. inflatum* 126а, в третью – штаммы *T. inflatum* 13а, *T. inflatum* 14а и *T. inflatum* 62а.

Изучение зависимости радиальной скорости роста микромицетов от рН, температуры и солености

Согласно полученным результатам, температура культивирования значительно влияет на радиальную скорость роста всех выделенных штаммов рода *Tolypocladium*. При значениях температуры 4°C и 37°C практически не происходит роста мицелия на чашках Петри со средой Чапека. При значениях температуры от 12°C до 20°C скорость роста достигает умеренных промежуточных показателей по сравнению со скоростью роста при 28°C, при которых достигается наиболее эффективный максимально быстрый рост всех штаммов (в среднем радиальная скорость роста при данном значении температуры выше скоростей при 20°C на 20%, при 12°C на 45%, при 4°C на 75%, при 37°C на 90%). В целом, относительно профилей радиальных скоростей роста выделенных штаммов, можно заключить, что они находятся в области относительно близких значений.

Также полученные при изучении поверхностного культивирования данные указывают на то, что оптимум рН для большинства выделенных штаммов рода *Tolypocladium* находится в пределах значений от 5.5 до 7.5. При данных значениях рН среды достигается максимальная радиальная скорость роста штаммов на чашках, которая превышает скорость при больших или меньших значениях рН в среднем на 15%.

Максимальное возможное значение радиальной скорости – 0,27 мм/ч, среди всех штаммов при наблюдаемых оптимумах температуры 28°C и рН 6.5 зафиксировано для штамма *T. inflatum* 62а (рис. 2).

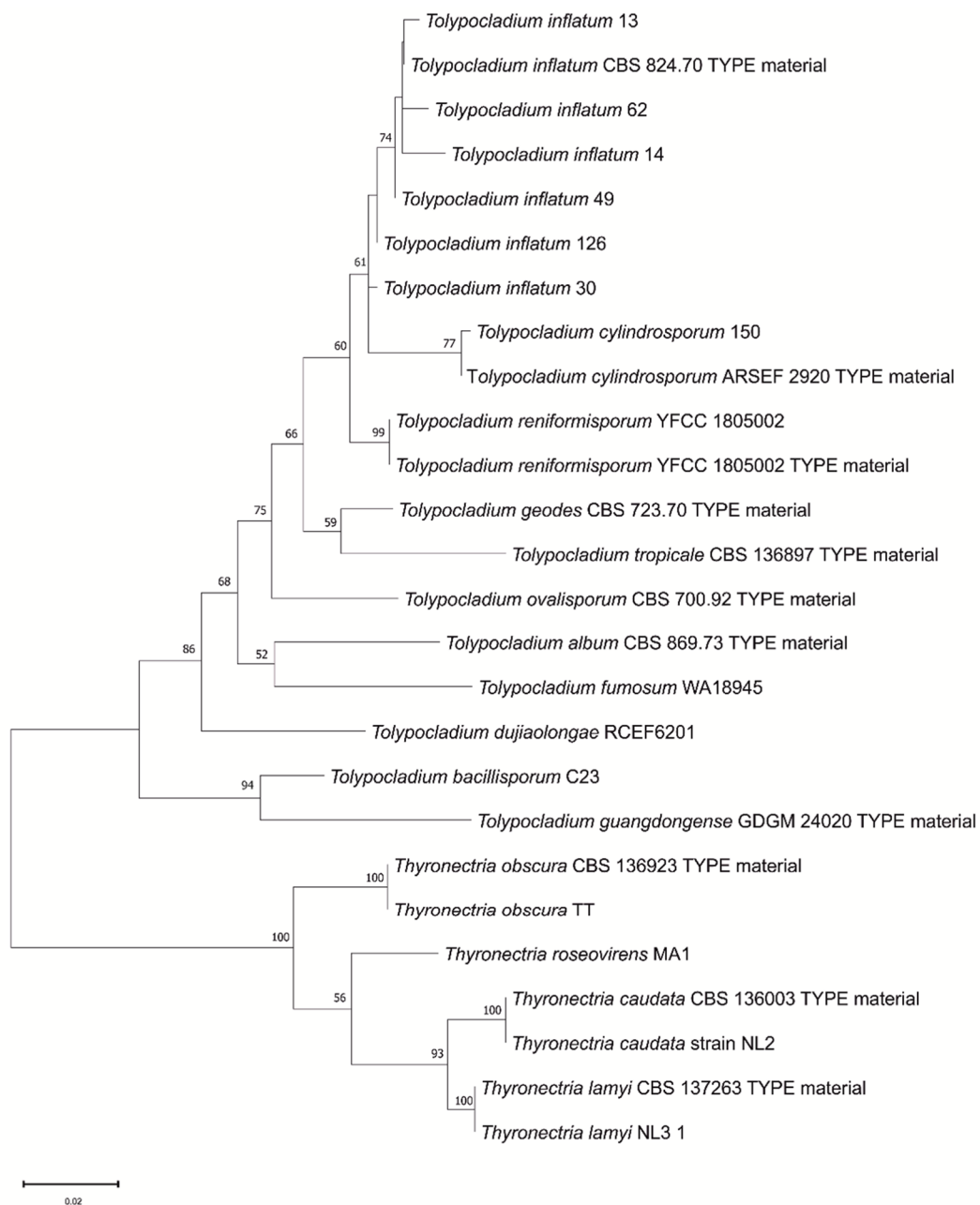


Рисунок 1. Филогенетическое древо изолятов рода *Tolypocladium*, выделенных из грунтов Белого моря

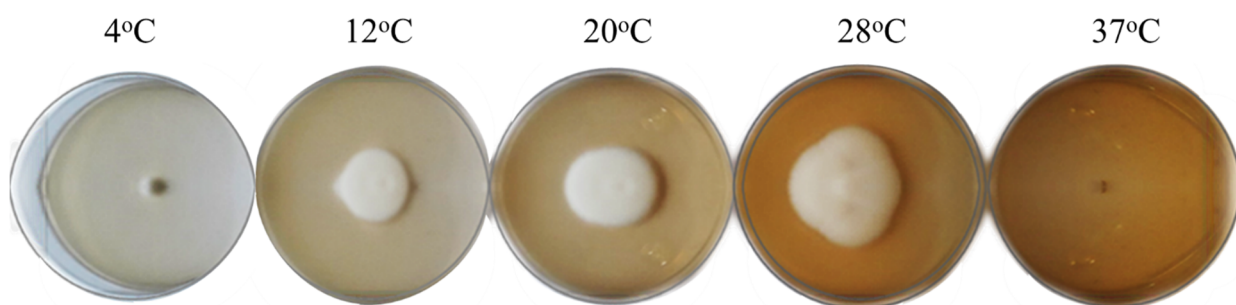


Рисунок 2. Рост штамма *Tolypocladium inflatum* 62a на пятые сутки на среде Чапека при разных температурах от 4 до 37°C и pH 6.5

В результате исследования влияния солености на рост штаммов-изолятов рода *Tolyposcladium* показано, что при значениях солености среды до 10‰ и более 50‰ наблюдается минимальная скорость роста микромицетов. Полученные экспериментальные данные соотносятся с условиями, в которых изначально находились выделенные штаммы микромицетов рода *Tolyposcladium*, а именно с условиями солености Белого моря в пределах Кандалакшского залива. Согласно данным литературы, в данном географическом ареале наблюдаемые значения солености морской воды находятся в интервале от 25 до 30‰. При этом высокая радиальная скорость роста для всех выделенных штаммов микромицетов рода *Tolyposcladium* достигалась при значениях солености в пределах 26-31‰, а максимальная – при значении 26‰. Наиболее высокая радиальная скорость роста была зафиксирована для штамма *T. inflatum* 62а, и она составила 6,15 мм/сут при солености среды в 26‰. Минимальная радиальная скорость роста при солености среды в 26‰ была зафиксирована для штамма *T. inflatum* 13а, и она составила 5,55 мм/сут.

Выявление протеолитического потенциала штаммов (определение энзиматического индекса штаммов микромицетов)

Для штаммов микромицетов *T. inflatum* 14а, *T. inflatum* 49а, *T. cylindrosporum* 150а значения энзиматического индекса на средах с фибрином, казеином и фибриногеном оказались сопоставимыми друг с другом (табл. 1). Можно предположить, что проявление протеолитической активности у данных продуцентов не связано со специфичностью образуемых ими протеиназ, они способны гидролизовать глобулярные и фибриллярные белки в равной степени. Штамм *T. inflatum* 126а продемонстрировал большее сродство к глобулярным белкам, т.к. значения энзиматического индекса на среде с казеином превышали аналогичные значения для сред с фибрином и фибриногеном.

Таблица 1. Определение энзиматических индексов выделенных штаммов микромицетов на средах с фибрином, казеином и фибриногеном

Изолят <i>Tolyposcladium</i>	ЕI _{фибр} (среда с фибрином)	ЕI _{каз} (среда с казеином)	ЕI _{фг} (среда с фибриногеном)	ЕI _{каз} /ЕI _{фибр}	ЕI _{каз} /ЕI _{фг}
13а	2,22	2,10	2,18	0,94	1,04
14а	1,43	1,48	1,39	1,03	1,06
30а	1,71	1,53	1,72	0,89	0,86
49а	2,39	2,30	2,24	0,96	0,98
62а	1,88	1,65	1,80	0,87	0,92
126а	1,63	2,10	1,81	1,28	1,16
150а	1,75	1,81	1,87	1,03	0,97

Согласно полученным отношениям $E_{I_{каз}}/E_{I_{фибр}}$, а также $E_{I_{каз}}/E_{I_{фг}}$, можно сделать вывод о том, что протеиназы оставшихся выделенных штаммов обладают выраженной эффективностью действия по отношению к фибриллярным белкам, при этом наиболее перспективными для дальнейшего изучения тромболитических свойств оказались штаммы *T. inflatum* 30а и *T. inflatum* 62а, т.к. для них были характерны не только

достаточно высокие значения энзиматических индексов на средах с фибрином и фибриногеном, но и наиболее высокая среди остальных штаммов специфичность по отношению к фибриллярным белкам (в среднем на 30% выше остальных штаммов). Штамм *T. inflatum* 13а показал сопоставимые энзиматические индексы на средах с фибрином и казеином, тем не менее, он также был отобран для дальнейшего исследования как перспективный продуцент, поскольку показал высокие значения энзиматического индекса на среде с фибрином среди всех выделенных изолятов микромицетов.

Дальнейшие эксперименты проводили с препаратами выбранных штаммов микромицетов.

Исследование эффективности тромболизиса препаратов, полученных из штаммов-изолятов *Tolyposcladium*

Согласно полученным данным среди препаратов микромицетов, выделенных в результате глубинного культивирования штаммов на ферментационной среде, содержащей в своем составе крахмал, наилучший тромболитический потенциал продемонстрировали препараты протеиназ, выделенные из культуральной жидкости штаммов *T. inflatum* 62а, *T. inflatum* 13а, *T. inflatum* 49а, а также референтного штамма *T. inflatum* k1 с итоговыми показателями степени тромболизиса – 78,9%, 76,6%, 74,8% и 80,9%, соответственно. Наиболее низкое значение степени тромболизиса было зарегистрировано для штамма *T. inflatum* 126а, и оно составило 69,4%. Препараты, полученные из штаммов-изолятов при культивировании на ферментационной среде, содержащей в своем составе глицерин, продемонстрировали более выраженный тромболитический эффект в отношении фибриновых сгустков. В среднем степень тромболизиса данных препаратов была на 12,3% выше, чем препаратов, полученных в результате культивирования микромицетов на среде с крахмалом. Наилучший тромболитический потенциал при культивировании микромицетов на среде с глицерином продемонстрировали препараты протеиназ, выделенные из культуральной жидкости штаммов *T. inflatum* 62а, *T. inflatum* 30а, *T. inflatum* 13а, а также референтного штамма *T. inflatum* k1 с итоговыми показателями степени тромболизиса – 91,3%, 88,3%, 87% и 86%, соответственно. Наиболее низкое значение степени тромболизиса было зарегистрировано также для штамма *T. inflatum* 126а и оно составило 79,7%.

Изучение динамики накопления протеиназ, образуемых штаммами микромицетов

Динамику накопления протеиназ, образуемых изолятами рода *Tolyposcladium*, изучали на трех штаммах, препараты которых в ходе глубинного культивирования продемонстрировали наиболее высокие значения степени тромболизиса. Для экспериментов были отобраны штаммы – *T. inflatum* 13а, *T. inflatum* 30а и *T. inflatum* 62а. Согласно полученным данным, штамм *T. inflatum* 62а был выбран наиболее перспективным для дальнейшего исследования, т.к. максимумы фибринолитической и активаторной к плазминогену, а также максимум протеолитической активности для данного микромицета совпадали по времени и приходились на пятые сутки, при этом

не происходило значительного снижения концентрации белка, как в случае других штаммов микромицетов.

Определение температурного и рН-оптимумов, а также оптимумов термо- и рН-стабильности препарата протеиназ штамма *Tolypocladium inflatum* 62a

Определение температурного оптимума активности исследуемого препарата протеиназ *T. inflatum* 62a выявило, что препарат проявлял активность в интервале температур 25-55°C. Максимальную активность препарата наблюдали при 35-37°C, т.е. температуре, соответствующей физиологическим условиям в кровотоке человека. Изучение термостабильности исследуемого препарата показало, что он сохранял активность при температуре от 25 до 37°C в течение 2 ч. При температуре 45°C активность значительно снижалась (на 50%) и полностью отсутствовала при 65°C (снижение на 90%). Определение зависимости активности препарата протеиназ *T. inflatum* 62a от рН показало, что он проявляет активность в интервале рН от 4.0 до 8.5. При более низких значениях рН – 3.0 и ниже препарат был неактивен, в щелочных условиях при рН 11.0 – практически полностью инактивировался. Максимальное значение активности наблюдали при рН 6.0-7.0. Препарат был стабилен в интервале рН 6.0-8.0 в течение 2 ч, сохраняя 100% активности фермента. При рН 9.0 за то же время активность сохранялась лишь на 45%. Таким образом, согласно полученным экспериментальным данным, оптимум действия протеиназ препарата *T. inflatum* 62a находится в пределах физиологических параметров крови человека (Т – 36,6°C, рН ~ 7,5).

Фракционирование препарата протеиназ культуральной жидкости штамма *Tolypocladium inflatum* 62a методом изоэлектрофокусирования

В результате ИЭФ препарата белков (удельная протеолитическая активность – 2,3 Е/мл $\times 10^{-3}$), полученного после глубинного культивирования (рис. 3), было обнаружено, что фракции, обладающие максимальными значениями искомых типов активности – фибринолитической, активаторной к плазминогену и казеинолитической, сходили с колонки единым пиком и имели изоэлектрическую точку рI 5,65-5,85. Дальнейшие эксперименты проводили с фракцией препарата №13 (рI–5,75), значения тромболитической активности которой были максимальны. Для фракции №13 удельная протеолитическая активность составила 0,78 Е/мл $\times 10^{-3}$. Фибринолитическая и активаторная к плазминогену активности оказались выше, чем для аналогичных параметров препарата протеиназ и культуральной жидкости, и составили для данной фракции 597 усл. ед./мг и 413 усл. ед./мг белка, соответственно.

Тест показал достаточно высокую способность протеиназ фракции №13 расщеплять молекулу субстрата по остаткам лизина и лейцина (27,21 и 14,01 Е/мл $\times 10^{-3}$) и низкую (практически отсутствующую) способность расщеплять молекулу субстрата по остаткам аргинина, таким образом, протеиназы фракции №13 обладают субстратной специфичностью в отношении отдельных белков системы гемостаза человека.

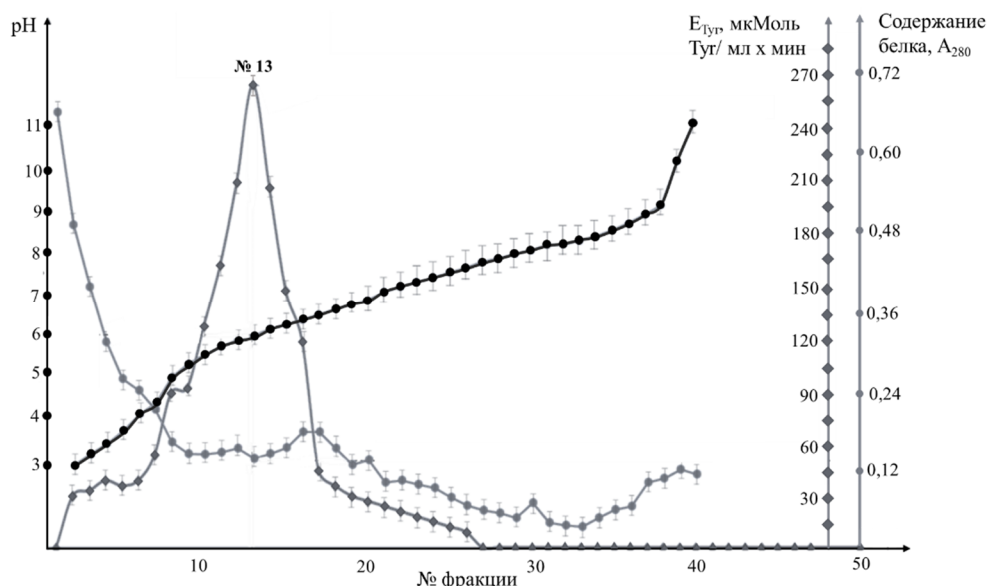


Рисунок 3. Изоэлектрофокусирование препарата *Tolypocladium inflatum* 62a

Определение углеводного компонента во фракциях препарата протеиназ культуральной жидкости штамма *Tolypocladium inflatum* 62a

Определение углеводного компонента методом дот-блоттинга с помощью реакции на гликопротеины в изучаемой пиковой фракции после ИЭФ показало, что протеиназы, входящие в состав фракции №13, не гликозилированы.

Определение наличия коагулазной активности во фракции препарата протеиназ культуральной жидкости штамма *Tolypocladium inflatum* 62a

В пиковой фракции после ИЭФ (№13) не наблюдали наличие фибринового волокна по сравнению с контролем (при добавлении тромбина), что свидетельствует об отсутствии коагулазной активности и является характерным для любых фибринолитических препаратов.

Исследование тромболитических свойств ближайшего аналога микромицета-продуцента *Tolypocladium inflatum* k1

Для сравнения тромболитических свойств препаратов и отдельных фракций микромицетов рода *Tolypocladium*, выделенных из грунтов Белого моря, с ближайшим аналогом, исследовали свойства почвенного штамма *Tolypocladium inflatum* k1.

Культивирование штамма-ближайшего аналога *Tolypocladium inflatum* k1, получение препарата протеиназ

Микромицет *T. inflatum* k1 представляет анаморфу *Elaphocordyceps subsessilis* и относится к семейству *Ophiocordycipitaceae*, порядка *Hypocreales*, класса *Sordariomycetes*, отдела *Ascomycota*. Культуральная жидкость микромицета *T. inflatum* k1, полученная по окончании срока культивирования продуцента, после удаления биомассы представляла собой прозрачную жидкость светло-коричневого цвета. После фильтрования культуральной жидкости, осаждения внеклеточных белков сульфатом аммония, диализа и лиофильной сушки был получен белковый препарат *T. inflatum* k1 с удельной протеолитической активностью $2,7 \text{ Е/мл} \times 10^{-3}$.

Исследование препарата, полученного из культуральной жидкости штамма *Tolyprocladium inflatum* k1, в экспериментах по тромболизису

Тромболитический потенциал белкового препарата, полученного из культуральной жидкости микроциста *T. inflatum* k1, анализировали в экспериментах по определению степени тромболизиса. В результате эксперимента через 30 мин лизис фибринового сгустка (уменьшение его массы под действием препарата) составил 32,1%, через 60 мин – 68,6%, а через 90 мин – 91,3%. Данные показатели свидетельствуют о высокой тромболитической активности препарата.

Определение температурного и рН-оптимумов, а также оптимумов термо- и рН-стабильности препарата протеиназ штамма *Tolyprocladium inflatum* k1

Определение температурного оптимума активности исследуемого препарата протеиназ *T. inflatum* k1 выявило, что препарат проявлял активность в интервале температур 20-65°C. Максимальную активность препарата наблюдали при 37°C, т.е. температуре, соответствующей физиологическим условиям в кровотоке человека. Изучение термостабильности исследуемого препарата показало, что препарат сохранял активность при температуре от 25 до 37°C в течение 2 ч. При температуре 45°C активность значительно снижалась (на 55%) и полностью отсутствовала при 65°C. Определение зависимости активности препарата протеиназ *T. inflatum* k1 от рН показало, что он проявляет активность в интервале рН от 3.5 до 10.5. При более низких значениях рН – 3.0 и ниже препарат не был активен, в щелочных условиях при рН 11.0 – практически полностью инактивировался. Максимальное значение активности наблюдали при рН 8.0. Препарат был стабилен в интервале рН 6.5-8.5 в течение 2 ч, сохраняя 100% активности фермента. При рН 9.0 за то же время активность сохранялась лишь на 45%. Таким образом, согласно полученным экспериментальным данным, оптимум действия протеиназ, входящих в состав препарата *T. inflatum* k1, находится в пределах физиологических параметров крови человека (Т – 36,6°C, рН ~ 7,5), что также характерно для препаратов внеклеточных протеиназ других микроцистов, например, для *Aspergillus terreus* (Звонарева и др., 2018) и *Sarocladium striatum* (Корниенко и соавт., 2020).

Фракционирование препарата протеиназ культуральной жидкости штамма *Tolyprocladium inflatum* k1 методом изоэлектрофокусирования

Протеиназы, активные в отношении белков системы гемостаза, были выделены из белкового препарата микроциста *T. inflatum* k1 по результатам проведения ИЭФ на колонке и соответствовали трем пиковым фракциям №24, 28, 53 (рис. 4). Для фракции №24 (рН – 5,9) удельная протеолитическая активность составила $0,2 \text{ Е/мл} \times 10^{-3}$, для фракции 28 (рН – 6,8) – $0,35 \text{ Е/мл} \times 10^{-3}$, а для фракции 53 (рН – 10,7) – $0,86 \text{ Е/мл} \times 10^{-3}$.

Далее в культуральной жидкости микроциста на 5 сутки культивирования, а также в препарате протеиназ и в отдельных фракциях препарата, полученных после ИЭФ (№24, 28, 53) определяли фибринолитическую и активаторную к плазминогену активность. Белковый препарат обладал несколько более выраженной фибринолитической и активаторной к плазминогену активностью по сравнению с культуральной жидкостью, что согласуется с полученными ранее данными (Шаркова и др., 2016). В то же время во фракциях ИЭФ выявлена значительно более высокая

фибринолитическая и активаторная к плазминогену активность. Максимальные значения наблюдались для фракций № 28 (582 и 373 усл. ед./мг белка), №24 (481 и 180 усл. ед./мг белка) и №53 (255 и 91,5 усл. ед./мг белка), соответственно.

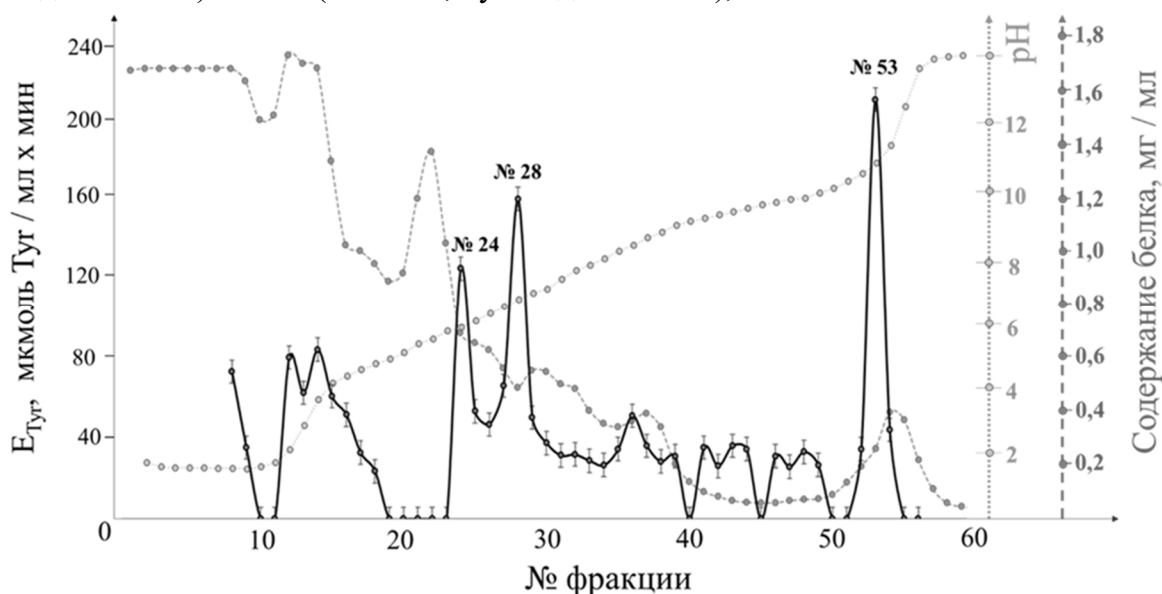


Рисунок 4. Изоэлектрофокусирование препарата *Tolypocladium inflatum* k1

Способность к образованию микромицетом *T. inflatum* k1 внеклеточных протеолитических ферментов, обладающих активностью некоторых протеиназ системы гемостаза человека, была изучена по расщеплению специфичных для протеиназ гемостаза хромогенных пептидных субстратов, как для препарата протеиназ, образуемого микромицетом, так и для отдельных пиковых фракций препарата, полученных после ИЭФ (№24, 28, 53). Показано, что и препарат, и отдельные фракции после ИЭФ, обладают протеолитической активностью и способны расщеплять использованные субстраты. Так, белковый препарат обладает выраженной субстратной специфичностью и способен расщеплять широкий спектр хромогенных субстратов, однако при этом его удельная активность ниже по сравнению с удельной активностью пиковых фракций в отношении отдельных субстратов. В случае фракции №53 наблюдается высокая субтилизин-подобная активность – порядка $33,5 \text{ Е/мл} \times 10^{-3}$ при расщеплении субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNa. Для фракции №24 аналогично характерна субтилизин-подобная активность, а также отмечена выраженная тромбиноподобная, плазминоподобная и эластазная активности. В случае же фракции №28 можно наблюдать схожее действие в отношении аналогичных субстратов, но с несколько более выраженным эффектом для тромбиноподобной, плазминоподобной и субтилизин-подобной активностей по сравнению с фракцией №24, и значительно большую эластазную активность в отношении субстрата Suc-Ala-Ala-Ala-pNa, которая превосходит аналогичную активность препарата и составляет $19,3 \text{ Е/мл} \times 10^{-3}$. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о широкой субстратной специфичности препарата протеиназ *T. inflatum* k1 и узкой, но более высокой специфичности отдельных фракций препарата после ИЭФ (№24, 28, 53), т.к. они способны гидролизовать конкретные хромогенные пептидные субстраты протеиназ системы гемостаза.

Определение углеводного компонента во фракциях препарата протеиназ культуральной жидкости штамма *Tolypocladium inflatum* k1

Показано, что протеиназы, входящие в состав фракций №24 и №28, гликозилированы, а в составе фракции №53 – не гликозилированы.

Определение наличия коагулазной активности во фракциях препарата протеиназ культуральной жидкости штамма *Tolypocladium inflatum* k1

Во всех пиковых фракциях после ИЭФ (№24, 28, 53) не наблюдали наличие фибринового волокна по сравнению с контролем (при добавлении тромбина), что свидетельствует об отсутствии коагулазной активности и является характерным для любых фибринолитических препаратов.

Электрофорез препаратов протеиназ, выделенных из культуральной жидкости штаммов-изолятов

Электрофоретическое исследование препаратов протеиназ, выделенных из культуральной жидкости исследуемых штаммов-микромикетов, позволило выявить наиболее близкий штамм к ближайшему аналогу – микромицету-продуценту тромболитических препаратов *Tolypocladium inflatum* k1. Согласно полученным данным, электрофореграмма штамма *Tolypocladium inflatum* 62a структурно наиболее соотносится с электрофореграммой *T. inflatum* k1 по сравнению с другими исследованными штаммами.

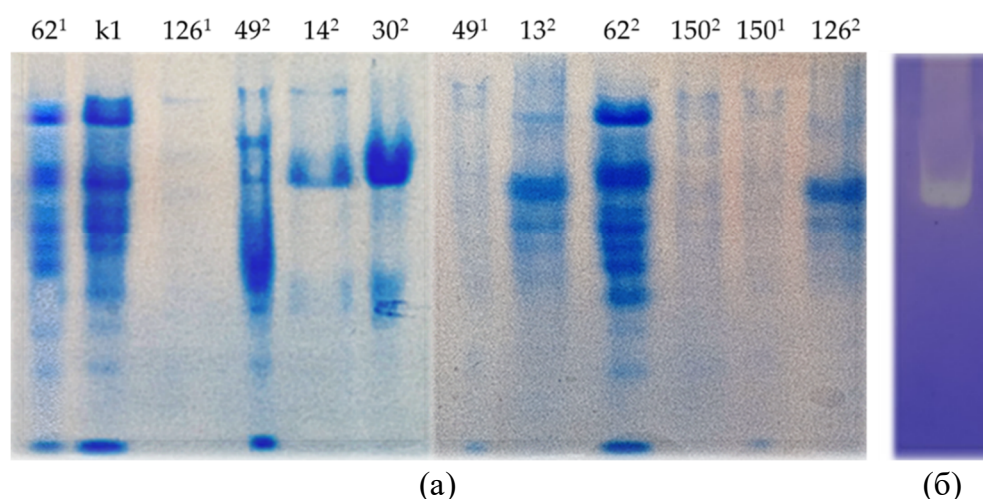


Рисунок 5. (а) – электрофорез препаратов протеиназ штаммов рода *Tolypocladium* по методу Дэвиса (индекс 1 – препарат, получен на среде с крахмалом, 2 – с глицерином) (б) – Наличие фибринолитической активности у препарата протеиназ штамма *Tolypocladium inflatum* 62a: на зимограмме

На рис. 5а показано, что соотношение, количество и характер расположения полос у этих двух штаммов рода *Tolypocladium* очень похожи, что, вероятно, может указывать также и на схожесть секретируемых в культуральную жидкость белков при глубинном культивировании, находящихся в составе полученных препаратов. Следует отметить, что профили полос на электрофореграмме совпадают со штаммом *T. inflatum* 62a, полученным при глубинном культивировании микромицета на среде с глицерином.

Кроме того, с препаратом протеиназ штамма *T. inflatum* 62a, полученном в результате культивирования на ферментационной среде с глицерином, также была

получена зимограмма (рис. 5б), на которой присутствует яркая полоса, подтверждающая наличие у препарата протеиназ выраженной энзиматической активности.

Сопоставление свойств препаратов протеиназ и отдельных фракций микромицетов *Tolyposcladium inflatum* 62a и *Tolyposcladium inflatum* k1

Согласно полученным экспериментальным данным, возможно выделить ряд сходств и различий между препаратами протеиназ штаммов микромицетов *T. inflatum* 62a и *T. inflatum* k1.

Тромболитический потенциал препаратов:

Препараты обоих штаммов микромицетов показали высокую эффективность при сходной удельной протеолитической активности. На ферментационной среде с крахмалом степень лизиса фибринового сгустка обоими препаратами была сопоставима – $78,9 \pm 5\%$ для штамма *T. inflatum* 62a и $80,9 \pm 5\%$ для *T. inflatum* k1, а на ферментационной среде с глицерином препарат штамма *T. inflatum* 62a показал лучший результат – $91,3 \pm 5\%$ в сравнении с $85 \pm 5\%$ для *T. inflatum* k1. Для препаратов, полученных на органоминеральной среде, была характерна более высокая степень по сравнению с минеральной.

Физико-химические оптимумы препаратов:

Температурные оптимумы и рН-оптимумы препаратов *T. inflatum* 62a и *T. inflatum* k1 очень близки и находятся в пределах физиологических параметров крови человека ($T - 36,6^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} \sim 7,5$), что делает их пригодными для использования в тромботерапии, диагностике патологий системы гемостаза и позволяет исключить инактивацию или недостаточную эффективность воздействия вследствие физико-химических свойств крови в случае терапевтического применения (например, внутривенного введения).

Фракции после ИЭФ, обладающие тромболитическим потенциалом, и их свойства:

После ИЭФ из препарата протеиназ *T. inflatum* 62 была выделена одна пиковая фракция, перспективная с точки зрения тромболитического потенциала, в случае *T. inflatum* k1 были выделены три соответствующих фракции. Сравнение свойств фракций штаммов-продуцентов представлено в таблице 2.

Фракция препарата *T. inflatum* 62a №13 демонстрирует большие значения фибринолитической и активаторной к плазминогену активности, чем фракция №53, для которой в случае препарата *T. inflatum* k1 отмечаются наиболее высокие показатели данных активностей среди ранее исследованных представителей рода *Tolyposcladium*. Изоэлектрическая точка фракции №13 находится по своему значению ближе к физиологическому значению рН крови, что позволяет предположить большую эффективность данной фракции для тромботерапии и большую перспективность применения именно этого штамма-продуцента для наработки тромболитических препаратов. Для фракции №13 также отмечается высокая в сравнении с фракцией №53 плазминоподобная активность, помимо этого, она также, как и №53, обладает субтилизин-подобной активностью. В отличие от фракции №13 для фракции №53 отмечается наличие тромбиноподобной и выраженной эластазной активности. Обе фракции не являются гликозилированными и для них также нехарактерна коагулазная

активность, что является оптимальным для тромболитических препаратов. Отсутствие данной посттрансляционной модификации позволяет рассматривать потенциальную возможность клонирования и экспрессии гена, кодирующего образование протеиназы, в прокариотических клетках (Попова и др., 2015).

Таблица 2. Сравнение фракций после ИЭФ *T. inflatum* 62a и *T. inflatum* k1

Параметр	Фракция №13 <i>T. inflatum</i> 62a	Фракция №53 <i>T. inflatum</i> k1
Фибринолитическая активность, усл.ед./мг белка	597	582
Активаторная к плазминогену активность, усл.ед./мг белка	413	373
Активность по отношению к белкам системы гемостаза (удельная активность, Е/мл $\times 10^{-3}$)	Плазминоподобная (27,21), субтилизин-подобная (14,01)	Тромбиноподобная (6,43), плазминоподобная (10,6), субтилизин-подобная (11,33), эластазная (19,3)
pI фракции	5,74	10,7
Реакция на гликопротеины	Не гликозилирована	Не гликозилирована
Коагулазная активность	Отсутствует	Отсутствует

Тромболитический потенциал препаратов, вырабатываемых микромицетом *Tolypocladium inflatum* 62a

Препарат, выделенный из культуральной жидкости микромицета *T. inflatum* 62a, после культивирования на среде с глицерином демонстрировал высокую тромболитическую активность в отношении фибриновых сгустков, будучи стабильным в физиологических интервалах значений температуры и pH. Фракция препарата, полученная после ИЭФ, проявляла высокую фибринолитическую и активаторную к плазминогену активность, превосходящую по своим значениям ближайший штамм-аналог *T. inflatum* k1. По изоэлектрической точке данная фракция находилась ближе к естественному pH крови и обладала, помимо выраженной плазминоподобной, также и эластазной активностью, что свидетельствует о высоком потенциале для ее применения с целью купирования тромботических состояний. Другой уникальной особенностью как препарата, так и фракции, полученной после ИЭФ, являлся так называемый «продолженный тромболитический эффект». Особенностью данного эффекта являлось то, что в течение 24 ч после взаимодействия препарата с фибриновым гелем происходил постепенный стабильно возрастающий лизис фибрина, который достигал максимума через сутки после аппликации вплоть до полного разрушения фибриновой пластины. Данный эффект не был характерным для препарата протеиназ *Tolypocladium inflatum* k1 (в его случае полная терминация лизиса фибринового геля происходила в течение 3-4 ч после аппликации). Подобный эффект может найти применение в препаратах пролонгированного действия как при наружном использовании в составе гелей против гематом и раневых повязок, так и в случаях, требующих длительного

применения тромболитического средства при профилактике тяжелых тромботических состояний в организме (ТЭЛА и инфаркта миокарда), позволяя значительно сократить количество вводимого препарата, тем самым уменьшая риск кровотечений при использовании. Применение тромболитических препаратов для наружного использования возможно, например, в комбинации с гепарином для повышения стабильности препарата и увеличения тромболитического эффекта. Особенно актуальным это может быть в случае терапии флеботромбозов и тромбозов.

Диагностическое применение обусловлено созданием нового набора для выявления возможных патологий системы гемостаза. Существующие на рынке диагностические наборы предполагают использование тромболитического агента в своем составе (например, «Ренам-плазминоген») и отличаются достаточно высокой стоимостью за одно исследование. Использование препарата *T. inflatum* 62a в качестве тромболитического агента может снизить стоимость набора за счет более простого и менее затратного процесса наработки препарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате работы были идентифицированы штаммы микромицетов рода *Tolyposcladium* до вида по последовательности 5,8S рДНК. Установлено, что четыре выделенных штамма совпадают с ранее описанными штаммами, а именно с *Tolyposcladium inflatum* 13a, *Tolyposcladium inflatum* 14a, *Tolyposcladium inflatum* 30a, *Tolyposcladium inflatum* 49a. Остальные изоляты не совпадали с ранее известными и им были присвоены наименования *Tolyposcladium inflatum* 62a, *Tolyposcladium inflatum* 126a. Штамм 150a по видовой принадлежности относился к виду *Tolyposcladium cylindrosporium*. Помимо видовой идентификации штаммов было проведено выравнивание полученных последовательностей модулем программ BLAST, а также построено филогенетическое древо взаимосвязи полученных штаммов (кладограмма).

Проведено исследование оптимальных условий культивирования штаммов. Согласно полученным результатам, температура культивирования значительно влияет на радиальную скорость роста всех выделенных штаммов рода *Tolyposcladium*. При крайних значениях температуры (4°C и 37°C) фактически не происходит роста мицеллия, тогда как при значениях температуры от 12°C до 20°C скорость роста достигает умеренных промежуточных показателей по сравнению со скоростью роста при 28°C, при которых достигается наиболее эффективный максимально быстрый рост всех штаммов. Оптимум рН для большинства выделенных штаммов рода *Tolyposcladium* находится в пределах значений от 5,5 до 7,5. При данных значениях рН среды достигается максимальная радиальная скорость роста штаммов на чашках. Наиболее высокая радиальная скорость роста была зафиксирована для штамма *T. inflatum* 62a и она составила 6,15 мм/сут при солёности среды в 26‰.

Наиболее перспективными для дальнейшего изучения тромболитических свойств с точки зрения энзиматического индекса и исследования динамики роста был штамм *T. inflatum* 62a, т.к. для него были характерны не только достаточно высокие значения энзиматических индексов на средах с фибрином и фибриногеном, но и наиболее высокая среди остальных штаммов специфичность по отношению к фибриллярным белкам.

Также были исследованы тромболитические свойства препарата протеиназ *T. inflatum* 62a и тромболитические свойства фракции, полученной после ИЭФ препарата. Удельная протеолитическая активность препарата составила $2,3 \text{ Е/мл} \times 10^{-3}$, степень тромболизиса – 91,3%, а для выделенной фракции №13 после ИЭФ (рI = 5,74) фибринолитическая активность – 597 усл. ед/мг белка, активаторная активность – 413 усл. ед/мг белка. Препарат протеиназ штамма микромицета *Tolypocladium inflatum* 62a по сравнению с препаратом штамма *Tolypocladium inflatum* k1 проявлял более выраженную фибринолитическую и активаторную к плазминогену активность, и для него был характерен выраженный продолжительный тромболитический эффект.

Продемонстрированные препаратом штамма *T. inflatum* 62a фибринолитические и активаторные к плазминогену свойства могут найти применение как в тромботерапии, так и в диагностике патологий системы гемостаза.

ВЫВОДЫ

1. Шесть идентифицированных на основе анализа участка ITS1–5.8S–ITS2 рДНК штаммов *Tolypocladium*, выделенных из грунтов Белого моря, были отнесены к виду *Tolypocladium inflatum*, один штамм – к виду *Tolypocladium cylindrosporum*.

2. Наиболее перспективным штаммом-продуцентом, демонстрирующим тромболитические свойства и наиболее высокую специфичность в отношении фибриллярных белков при поверхностном культивировании на диагностических средах среди семи выделенных из донных грунтов Белого моря изолятов микромицетов рода *Tolypocladium*, является штамм *Tolypocladium inflatum* 62a: его энзиматический индекс на диагностической среде с казеином равен 1,65, на среде с фибрином – 1,88, на среде с фибриногеном – 1,80.

3. Подобраны наиболее оптимальные условия для культивирования штамма микромицета *Tolypocladium inflatum* 62a в лабораторных условиях. Наиболее высокая скорость роста наблюдалась на органоминеральной ферментационной среде при температуре 28°C, значениях рН в интервале от 6,5 до 7,0 и солености 26‰.

4. Выделен препарат протеиназ из культуральной жидкости штамма *Tolypocladium inflatum* 62a, для которого удельная протеолитическая активность составила $2,3 \text{ Е/мл} \times 10^{-3}$, степень лизиса фибринового тромба в *in vitro* модели – 91,3%, оптимум действия находился при температуре 36-37°C, оптимум рН при значениях 6,5-7,0. Также получена фракция после изоэлектрофокусирования №13 с изоэлектрической точкой – 5,74, фибринолитическая активность составила 597 усл. ед./мг белка, активаторная активность – 413 усл. ед./мг белка, не гликозилирована, коагулазная активность отсутствует.

5. Препарат протеиназ штамма микромицета *Tolypocladium inflatum* 62a проявлял более выраженную фибринолитическую (на 7%) и активаторную к плазминогену активность (на 15%) по сравнению с препаратом штамма *Tolypocladium inflatum* k1. Доля активаторной активности от фибринолитической для препарата *Tolypocladium inflatum* 62a также была выше (на 20%) и для него был характерен выраженный продолжительный тромболитический эффект при аппликации препарата на фибриновом геле (до 24 ч).

6. Возможными вариантами применения и коммерциализации препарата протеиназ микромицета *Tolypocladium inflatum* 62a являются создание лекарственного препарата (в т.ч. комбинированного) для тромботерапии, аппликационного ангиопротекторного средства для наружного применения или создание диагностического набора для исследования резерва плазминогена и состояния фибринолитической системы.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ
в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Scopus, WoS и
RSCI:**

1. **Fokichev N.S**, Kokaeva L.Yu., Popova E.A., Kurakov A.V., Osmolovskiy A.A. Thrombolytic potential of micromycetes from the genus *Tolyrocladium*, obtained from White Sea soils: screening of producers and exoproteinases properties // *Microbiology research*. 2022. V. 13. № 4. P. 898–908. doi: 10.3390/microbiolres13040063. IF(WoS): 0.98, Q2. Вклад автора в печатных листах: (0,63/0,56) (здесь и далее в скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах).
2. **Фокичев Н.С.**, Корниенко Е.И., Крейер В.Г., Шаркова Т.С., Осмоловский А.А. Тромболитическая активность и свойства препарата протеиназ, образуемых микромицетом *Tolyrocladium inflatum* k1 // *Микология и фитопатология*. 2021. Т. 55. № 6. С. 449–456. doi: 10.31857/S002636482106009X. IF(РИНЦ): 0.915. (0,44/0,39).
3. **Фокичев Н.С.**, Корниенко Е.И., Крейер В.Г., Осмоловский А.А. Исследование тромболитического потенциала экзопротеиназ, образуемых микромицетом *Tolyrocladium inflatum* 62a, выделенным из грунтов Белого моря // *Микология и фитопатология*. 2023. Т. 57. № 2. С. 95–103. doi: 10.31857/S0026364823020071. IF(РИНЦ): 0.915. (0,50/0,45).

Патенты РФ:

Фокичев Н.С., Осмоловский А.А., Лукьянова А.А., Корниенко Е.И., Налобин Д.С. Способ оценки тромболитического потенциала микромицетов. // Патент RU 2788697, МПК С12Q 1/37, С12N 9/50, С12N 1/14 № 2020123049, Заявл. (10.07.2020); Опубл. (24.01.2023) (0,94/0,84).