

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Лавренова Виктория Николаевна

**Воздействие протеолитических ферментов микромицетов
рода *Aspergillus* на белки системы гемостаза**

1.5.11. Микробиология

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2024

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

Научный руководитель

– *Осмоловский Александр Андреевич*,
кандидат биологических наук

Официальные оппоненты

– *Кураков Александр Васильевич*, доктор
биологических наук, доцент, ФГБОУ ВО
«Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова», биологический
факультет, кафедра микологии и альгологии,
заведующий кафедрой

– *Терёшина Вера Михайловна*, доктор
биологических наук, ФГУ «ФИЦ
«Фундаментальные основы биотехнологии»
РАН», Институт микробиологии им. С.Н.
Виноградского, группа экспериментальной
микологии, руководитель группы, ведущий
научный сотрудник

– *Леонтьевская Наталья Валерьевна*,
кандидат биологических наук, ФГБУН ФИЦ
«Пушкинский научный центр биологических
исследований Российской академии наук»
РАН, Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
лаборатория биохимии клеточной
поверхности микроорганизмов, заведующая
лабораторией, ведущий научный сотрудник

Защита диссертации состоится «04» июня 2024 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/2999>

Автореферат разослан «26» апреля 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

 Н.В. Костина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень её разработанности.

Тромбообразование – это процесс формирования сгустка тромбоцитов и в меньшей степени других элементов крови, скрепленных белковыми, прежде всего фибриновыми, «сшивками». В норме тромбообразование запускается только при физическом повреждении и нарушении целостности сосудистой стенки. Патологическое тромбообразование может являться как причиной, так и следствием множества заболеваний сердечно-сосудистой и иммунной систем. Ежегодная смертность от тромбозов разного генеза составляет почти 25 миллионов человек по всему миру (Бокарев, Попова, 2014).

Лекарственными препаратами, предотвращающими формирование тромбов при различных заболеваниях, являются антикоагулянты, а вещества, которые помогают расщеплять уже существующие тромбы, называются фибринолитиками. Так как основной составляющей, поддерживающей структуру тромба, являются тяжи фибрина и фибриногена, фибринолитики по своей природе являются протеазами, способствующими расщеплению этих тяжей. Некоторые антикоагулянты также являются протеолитическими ферментами, так как имитируют или активируют реакции, катализируемые белками собственной противосвертывающей системы организма, компоненты которой являются протеазами или их ингибиторами.

В настоящее время для терапии тромбозов используют несколько протеаз бактериального происхождения: стрептокиназу (Максименко, 2012), стафилокиназу (Vanderschueren et al., 1997), серрапептазу (Nair, C, 2022), наттокиназу (Kurosawa et al., 2015). Потенциал и разнообразие грибных протеаз вряд ли уступает бактериальным ферментам. В то время как бактерии специализируются на секретиции 1-3 специфических протеолитических ферментов, микроскопические грибы, как правило, выделяют целую смесь протеаз, действие которых дополняет друг друга (Wandersman, 1989; Павлюкова, Белозерский, Дунаевский, 1998). Продуценты протеаз с антикоагулянтными и фибринолитическими свойствами известны среди представителей отделов *Mucoromycota*, *Ascomycota* и *Basidiomycota*, но наибольшая доля исследованных на данный момент продуцентов противотромботических протеаз приходится на представителей рода *Aspergillus* семейства *Aspergillaceae* отдела *Ascomycota* (Осмоловский и др., 2021; Sharma, Osmolovskiy, Singh, 2021). Широкая экологическая иррадиация данного рода, который включает более 800 видов, позволяет штаммам секретировать огромное разнообразие протеолитических ферментов, необходимых для адаптации к среде обитания.

Несмотря на наличие нескольких десятков известных продуцентов тромболитических протеаз среди микромицетов рода *Aspergillus* и других грибов, ферментов с антикоагулянтной активностью описано крайне мало (Серебрякова и др., 1977; Osmolovskiy et al., 2014; Choi et al., 2017; Choi et al., 2021; Li et al., 2021; Duan et al., 2022; Zhao et al., 2022). Более того, на данный момент не существует применяемых в медицинской практике антикоагулянтных лекарственных препаратов на основе протеаз микроорганизмов. В то же время, почти все используемые сейчас в клинической практике антикоагулянты вызывают побочные эффекты в виде кровотечений. Перспективной системой, воздействие на которую может избежать подобных побочных эффектов, является система протеина С человека – одна из противосвёртывающих систем крови. Поиск протеаз микромицетов с протеолитической активностью, похожей на активность человеческого протеина С, является актуальной задачей, так как протеазы микроорганизмов с такой активностью не были описаны ранее. Более того, нахождение

продуцента, одновременно секретирующего протеазу или комплекс протеаз с антикоагулянтными и тромболитическими свойствами, позволило бы получить препарат двойного действия, разрушающий уже существующие тромбы и препятствующий образованию новых, что, в свою очередь, упростило бы процедуры лечения многих тромботических состояний, так как сейчас в терапии используются несколько отдельных лекарственных средств с разными активностями.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы был скрининг протеолитической активности секретируемых протеаз среди малоизученных штаммов 22 видов рода *Aspergillus*, отбор продуцента протеаз с антикоагулянтной протеин С-подобной и тромболитической активностями и изучение свойств его ферментного препарата.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) измерить протеолитическую активность секретируемых ферментов 22 исследуемых штаммов по отношению к белковым и хромогенным пептидным субстратам, оценить фибринолитическую и активаторную к плазминогену активности методом фибриновых пластин;
- 2) сформулировать критерии отбора нового продуцента антикоагулянтных и тромболитических протеаз;
- 3) подобрать оптимальные условия для наработки ферментного препарата выбранного продуцента;
- 4) изучить физико-химические свойства выделенной протеазы: определить молекулярную массу, выяснить наличие гликозилирования, провести анализ субстратной специфичности и ингибиторный анализ, выявить рН-оптимум, температурный оптимум, рН-стабильность, определить температурную стабильность фермента.

Объектами исследования являлись ранее не изученные штаммы 22 видов рода *Aspergillus*, а также ферментный препарат перспективного продуцента антикоагулянтных и тромболитических протеаз – *A. tabacinus*.

Предметом исследования являлись антикоагулянтная и тромболитическая (фибриногенолитическая, прямая фибринолитическая, активаторная к плазминогену) активности изучаемых штаммов, а также субстратная специфичность, устойчивость к ингибиторам и стабильность выделенной протеазы *A. tabacinus*.

Научная новизна работы. Проведённый в работе скрининг протеолитической активности штаммов 22 видов рода *Aspergillus*, а также анализ литературных данных по другим представителям позволил выявить ранее не описанные закономерности, связывающие протеолитические активности с филогенией рода. Фибриногенолитическая, прямая фибринолитическая и активаторная к плазминогену активности, позволяющие ферментам осуществлять тромболитизис, распространены среди разных подродов рода *Aspergillus*, в то время как антикоагулянтная активность характерна для изученных представителей серий *Versicolores* и *Speluncaei* секции *Nidulantes* подрода *Nidulantes*.

Изучение способности микромицетов одновременно секретировать ферменты и с антикоагулянтной, и с тромболитической активностью позволило сформулировать критерии отбора перспективных продуцентов антикоагулянтных и противотромботических соединений.

Впервые выделена и частично очищена внеклеточная протеаза микромицета с протеин С-подобной активностью. Секретируемый негликозилированный фермент *A. tabacinus* также способен расщеплять субстраты фактора Ха, тромбина, плазмина, урокиназы и тканевого активатора плазминогена, что означает наличие у протеазы

одновременно трёх активностей: антикоагулянтной, прямой фибринолитической и активаторной к плазминогену.

Теоретическая и практическая значимость. Теоретическая значимость работы заключается в установлении связи между наличием протеин С-подобной активности с систематическим положением вида в филогении рода *Aspergillus*. В будущем поиск протеаз с такой активностью можно будет осуществлять прицельно среди представителей подрода *Nidulantes*.

Практическая значимость работы заключается в выделении критериев отбора наиболее перспективных продуцентов протеаз для медицины. Внеклеточные протеазы таких микромицетов должны проявлять антикоагулянтную активность наряду с тромболитической и быть специфичны к определённым субстратам системы гемостаза. Выделенная протеаза *A. tabacinus*, имитирующая действие человеческого протеина С, соответствует обозначенным критериям и может в дальнейшем использоваться для разработки нового терапевтического средства против тромбозов.

Методология и методы исследования. Работа проведена с использованием современных микробиологических методов культивирования микромицетов и биохимических методов измерения протеолитической активности, получения ферментного препарата и оценки его свойств.

Положения, выносимые на защиту.

1. Фибриногенолитическая, прямая фибринолитическая и активаторная к плазминогену активности свойственны большинству исследованных видов рода *Aspergillus*. Протеин С-подобная, фактор Ха-подобная и тромбиноподобная активности характерны для представителей серий *Versicolores* и *Speluncaei* секции *Nidulantes* подрода *Nidulantes*.

2. Сформулированы требования, предъявляемые для перспективных продуцентов антикоагулянтных и противотромботических протеаз. Эти требования состоят в следующем: одновременная секреция продуцентом комплекса протеаз или выделение протеазы с двойственной активностью (антикоагулянтной и тромболитической), наличие субстратной специфичности по отношению к компонентам системы гемостаза.

3. Выдвинутым требованиям наиболее соответствует продуцент *A. tabacinus*.

4. Впервые выделена и очищена негликозилированная протеаза *A. tabacinus*, активная в отношении субстратов активированного протеина С, плазмينا, фактора Ха, тромбина, урокиназы, тканевого активатора плазминогена. Протеаза стабильна в диапазоне температур 25-37°C и при pH 3-12. Изученный фермент может стать новым регулятором гемостаза человека.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов определяется использованием многочисленных современных методик для всесторонней оценки протеолитического потенциала микромицетов, значительным объёмом экспериментальных данных, которые были обработаны и проанализированы. Достоверность результатов также подтверждается публикациями в рецензируемых отечественных и международных журналах. Результаты диссертации были представлены на следующих российских и международных конференциях: European Biotechnology Congress 2022 (Прага, Чехия, 2022), Ломоносов-2023 (Москва, 2023), Юбилейная конференция по медицинской микологии и микробиологии 2023 (Москва, 2023), XIII Международная научная конференция «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Беларусь, Минск, 2023), XIX Congress of European Mycologists (XIXCEM) (Perugia, 2023).

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

Структура работы. Работа состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений» и «Список литературы». Работа изложена на 149 страницах, содержит 18 рисунков и 19 таблиц. Список литературы включает 257 источников, в том числе 227 иностранных.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 3 статьи в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова. В статьях, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

Благодарности. Автор благодарит своего научного руководителя Осмоловского А.А., а также весь коллектив группы протеолитических ферментов микромицетов за помощь и моральную поддержку при подготовке диссертации.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

Обзор литературы состоит из 3 разделов. В первом разделе описаны современные представления о системе образования и расщепления тромбов. Подробно разобраны последовательности событий при активации первичного и вторичного гемостаза человека, также рассмотрены система фибринолиза и противосвёртывающая система.

Второй раздел посвящён используемым в современной клинической практике противосвёртывающим и тромболитическим препаратам. Разобраны преимущества и недостатки разных групп медикаментов, включая антиагреганты, антикоагулянты, прямые и непрямые фибринолитики.

В третьем разделе суммирована информация об известных на данный момент грибах-продуцентах антикоагулянтных и фибринолитических ферментов. Рассмотрены представители макро- и микромицетов, секретирующие белки с противосвёртывающими, активаторными к плазминогену или прямыми фибринолитическими свойствами. Отдельно проанализирован потенциал микромицетов рода *Aspergillus* по продукции антитромботических ферментов.

Материалы и методы исследования

Объект исследования. В исследованиях использовали 22 штамма, являющихся представителями 22 разных видов рода *Aspergillus*. Для индукции образования протеолитических ферментов производили глубинное культивирование на посевной среде в течение 48 часов, затем на ферментационных средах с разными источниками азота в течение 96 часов (Osmolovskiy et al., 2018).

Определение энзиматических индексов. Для выявления протеолитической активности микромицетов при поверхностном культивировании производили посев каждого штамма уколом на агаризованную среду с добавлением одного из шести белков (гемоглобин, желатин, казеин, кератин, фибрин, фибриноген). После семидневного культивирования с помощью контрастирующих агентов (10 % трихлоруксусной кислоты для казеина, фибриногена, гемоглобина, Кумасси G250 для фибрина и кератина, 39,6% раствора сульфата аммония для желатина) выявляли зону гидролиза белка и рассчитывали энзиматический индекс как отношение диаметра зоны гидролиза белка к диаметру колонии.

Определение протеолитической активности в культуральной жидкости с белковыми субстратами. Протеолитическую активность в культуральной жидкости по отношению к фибриногену и гемоглобину определяли спектрофотометрически при 37°C модифицированным методом Ансона-Хагихары (Anson, 1935; Hagihara et al., 1958). За единицу ферментативной активности принимали образование в 1 мл раствора за 1 минуту такого количества неосаждаемых 10% трихлоруксусной кислотой продуктов гидролиза, оптическое поглощение которых при 275 нм эквивалентно поглощению 1 мкг тирозина. Протеолитическую активность культуральной жидкости по отношению к азоказеину и голубому фибрину (зафиксированному в структуре частиц полимеризованного фибрина голубому декстрану (Tamura et al., 1978)) определяли по описанной выше методике спектрофотометрически при 37°C, измеряя поглощение растворимых продуктов реакции при 340 нм для азоказеина и при 620 нм для голубого фибрина. За единицу ферментативной активности принимали то количество фермента, которое вызывало изменение оптической плотности на 0,01 ед. Все измерения проводили на начальном линейном участке скорости реакции.

Определение амидолитической активности с хромогенными пептидными субстратами. Специфическую ферментативную активность определяли спектрофотометрически при длине волны 405 нм по накоплению пара-нитроанилина после гидролиза различных хромогенных пептидных субстратов при 37°C (Звонарева и др., 2018). Активаторные активности по отношению к белкам плазмы определяли с помощью 5-минутной прединкубации ферментативной пробы с плазмой крови человека. За единицу ферментативной активности принимали число мкмоль пара-нитроанилина, образовавшегося в 1 мл раствора за 1 минуту. Все измерения проводили на начальном линейном участке скорости реакции.

Измерение концентрации белка. Концентрацию белка в пробах измеряли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976).

Метод фибриновых пластин. Измерение фибринолитической и активаторной к плазминогену активностей культуральной жидкости производили по методу Аструпа – Мюллерца – Лассена (Astrup, Mullertz, 1952; Lassen, 1953). Для приготовления фибриновых пластин смешивали 200 мкл (2 мг/мл) тромбина в физиологическом растворе и 900 мкл 3% бычьего фибриногена (содержит примесь плазминогена) в физиологическом растворе, после чего ожидали окончания полимеризации. Для измерения только прямой фибринолитической активности фибриновые пластины прогревали в течение 30 минут при 86°C для инактивации плазминогена. Для измерения общей фибринолитической активности (прямой + активаторной к плазминогену) использовали непрогретые фибриновые пластины. Пробы культуральных жидкостей в объёме 30 мкл наносили на фибриновые пластины и оставляли при 37°C на 3 часа, после чего измеряли диаметр зоны разрушения фибрина, по которому рассчитывали площадь зоны гидролиза. За единицу активности принимали 1 мм² зоны фибринолизиса.

Изучение влияния условий культивирования на секрецию протеазы. Для подбора оптимальных условий продукции протеаз изучали динамику накопления протеолитических ферментов с целевыми активностями в культуральной жидкости. Также исследовали влияние различных начальных значений pH среды (4,0, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 и 8,0) и температуры культивирования (26°C, 28°C, 30°C, 32°C) на уровень протеолитической активности внеклеточных протеаз продуцента.

Выделение и очистка протеазы. Для выделения фермента проводили высаливание белков сульфатом аммония из 2 л культуральной жидкости, после чего осуществляли диализ осадка, супернатант после которого лиофильно высушивали. Очистку протеазы из полученного лиофильного препарата проводили с помощью колоночного изоэлектрофокусирования в градиенте амфолинов (pH 2-12) и в градиенте плотности сахарозы (0-40%) при 4°C и напряжении 800 В в течение 36 часов (Осмоловский и др., 2014; Звонарева и др., 2015).

Электрофорез в денатурирующих условиях. Для выяснения белкового состава фракции с наибольшей протеолитической активностью проводили электрофорез в денатурирующих условиях по методу Лэммли (Laemly, 1970).

Зимография. Для определения протеолитически активного компонента во фракции, представлявшей собой белковую смесь, использовали зимографию (Hu et al., 2019). Для этого проводили электрофорез в денатурирующих условиях по методу Лэммли с добавлением в разделяющий гель казеина до конечной концентрации 0,2%. После электрофореза производили отмывку геля в денатурирующем буфере.

Выявление гликозилирования в геле. Определение углеводного компонента у целевой протеазы проводили в геле после денатурирующего электрофореза с использованием реактива Шиффа (Thornton, Carlstedt, Sheehan, 1994).

Анализ субстратной специфичности протеазы. Для определения субстратной специфичности использовали следующие хромогенные пептидные субстраты (Beypou, Bond, 2001): субстрат плазмина Н-D-Val-Leu-Lys-pNA (S-2251), фактора Ха – Bz-Ile-Glu(γ -OR)-Gly-Arg-pNA (S-2222) и Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA (S-2765), урокиназы – pGlu-Gly-Arg-pNA (S-2444), тромбина – Tos-Gly-Pro-Arg-pNA (Chromozym TH) и Н-D-Phe-Pip-Arg-pNA (S-2238), тканевого активатора плазминогена – Н-D-Ile-Pro-Arg-pNA (S-2288), активированного протеина С – pGlu-Pro-Arg-pNA; а также хромогенные субстраты трипсина Bz-Arg-pNA и химотрипсина Ac-Phe-pNA, использовали субстраты с разным сочетанием аминокислот в хромопептиде: Ac-Leu-Gly-Arg-pNA, Z-Ala-Ala-Met-Lys-pNA, Z-Ala-Ala-Phe-Lys-pNA, For-Ala-Phe-Lys-pNA, Z-Gly-Gly-Leu-pNA.

Ингибиторный анализ. В работе использовали следующие ингибиторы (в скобках указаны концентрации, при которых инкубировали фермент): ингибитор сериновых протеаз фенилметилсульфонилфторид (PMSF, 0,5 мМ и 0,05 мМ), ингибиторы трипсин-подобных протеаз тозиллизилхлорметилкетон (TLCK, 0,5 мМ и 0,05 мМ) и соевый ингибитор трипсина (25 мкМ и 2,5 мкМ), ингибитор химотрипсин-подобных протеаз тозилфенилаланилхлорметилкетон (TPCK, 0,5 мМ и 0,05 мМ), ингибитор цистеиновых протеаз пара-хлормеркурибензоат (СМВ, 0,5 мМ и 0,05 мМ), ингибитор металлопротеаз ЭДТА (1 мМ и 0,1 мМ). Ферментативную активность контрольной пробы (без ингибитора) выражали как 100%, активности в присутствии ингибиторов выражали относительно активности в контрольной пробе.

Определение оптимума функционирования фермента и его стабильности. Для исследования рН-оптимума использовали 0,4 М универсальный (натрий-ацетат-фосфат-боратный) буфер со значениями рН от 3,0 до 13,0. Определение амидолитической активности проводили по методике, описанной выше, заменяя только буферный раствор в реакционной смеси. Для анализа стабильности проводили двухчасовую прединкубацию фермента с соответствующим буфером, после чего доводили рН до 8,2 и проводили реакцию. Для выявления температурного оптимума реакцию проводили при 25°C, 30°C, 37°C, 45°C, 55°C, 65°C. Для определения температурной стабильности проводили двухчасовую прединкубацию фермента при указанных температурах, затем проводили реакцию при 37°C по стандартной методике, описанной выше.

Результаты

Протеолитическая активность штаммов при поверхностном культивировании. Основной протеолитической активностью, необходимой для расщепления тромбов, является фибринолитическая активность. При поверхностном культивировании на среде, содержащей фибрин, такая активность была обнаружена у 16 из 22 исследуемых видов. Однако, так как в составе тромба содержится много молекул фибриногена, фибриногенолитическая активность также может быть связана с тромболизисом, более того, у многих продуцентов проявляются сразу обе упомянутые активности. Из 16 видов-фибринолитиков фибриногенолитическая активность была обнаружена у 12, причём у всех этих видов энзиматический индекс по фибриногену превышал таковой для фибрина. Помимо видов, способных расщеплять фибрин, но не фибриноген, были также обнаружены виды, способные расщеплять фибриноген, но не фибрин: *A. caespitosus*, *A. penicilloides*, *A. pseudoglaucus*.

Среди 22 исследованных видов 1 вид (*A. melleus*) проявлял протеолитическую активность по отношению ко всем исследованным белкам, а 7 видов (*A. aureolatus*, *A. calidoustus*, *A. creber*, *A. domesticus*, *A. jensenii*, *A. penicilloides*, *A. protuberus*) расщепляли 5 из 6 изученных белков, что свидетельствует о низкой субстратной специфичности протеаз данных микромицетов, которые вряд ли могут подойти для разработки терапевтических препаратов.

Протеолитическая активность штаммов при глубинном культивировании. Способность микромицетов выделять специфичные по отношению к разным белкам протеазы была также изучена после глубинного культивирования в двух разных ферментационных средах, так как при поверхностном и глубинном культивировании штаммы могут секретировать разные протеазы в разном количестве. Целевые активности, необходимые для тромболизиса, – фибринолитическую и фибриногенолитическую, определяли по способности культуральной жидкости гидролизовать фибриноген и голубой фибрин в растворе.

17 изученных штаммов проявляли значимую протеолитическую активность (>15 Е) в отношении фибриногена хотя бы на одной ферментационной среде. Фибринолитическая активность по отношению к голубому фибрину для большинства исследованных штаммов оказалась не очень высокой, однако у пяти штаммов она превышала соответствующую активность культуральной жидкости известного продуцента тромболитиков *Sarocladium strictum* (Лукьянова и др., 2020). Самую высокую фибринолитическую активность показали *A. pseudoglaucus* и *A. tamaritii*.

Амидолитическая активность штаммов при глубинном культивировании. Первичный скрининг продуцентов фибрино- и фибриногенолитических протеаз можно производить, оценивая способность секретлируемых ферментов расщеплять соответствующие белки. Однако поиск продуцентов антикоагулянтных протеаз требует проведения более специфических реакций с субстратами различных компонентов гемостаза и противосвёртывающей системы. Для скрининга использовали субстраты следующих протеаз: тромбина (Chromozym TH, S-2238), фактора Ха (S-2765, S-2222), протеина С (S-2366), также использовали субстраты ферментов фибринолиза плазмينا (S-2251) и урокиназы (S-2444).

По результатам экспериментов было обнаружено, что 14 из 22 исследуемых видов (*A. amstelodami*, *A. athecus*, *A. caespitosus*, *A. calidoustus*, *A. domesticus*, *A. europaeus*, *A. glaucus*, *A. penicilloides*, *A. phoenicis*, *A. proliferans*, *A. pseudoglaucus*, *A. tamaritii*, *A. tubingensis*, *A. wentii*) обладают низкой протеолитической активностью ($\leq 15 \times 10^{-3}$) по отношению ко всем использованным субстратам, следовательно их протеазы не могут

быть перспективными для разработки противотромботических средств. Среди остальных видов (таблица 1) секретлируемые протеазы *A. aureolatus* и *A. tenesseeensis* были способны эффективно расщеплять субстраты Chromozym TH, S-2251, S-2765, S-2444, S-2366, что говорит о низкой субстратной специфичности выделяемых ферментов этих штаммов. Выделяемые ферменты *A. creber*, *A. jensenii* и *A. melleus* эффективно расщепляли Chromozym TH. Культуральные жидкости *A. creber* и *A. jensenii* также были активны по отношению к S-2366 и S-2765, *A. melleus* – к S-2251. Секретлируемые протеазы *A. tabacinus* расщепляли Chromozym TH, S-2765, S-2366 и чуть хуже S-2238, S-2444. *A. protuberus* расщеплял субстраты S-2238, S-2765 и в большей степени S-2366. *A. ruber* после культивирования на обеих средах выделял узкоспецифичные протеазы, гидролизующие только S-2366.

Для всех штаммов с низкими значениями активностей по определённым субстратам ($<15 \text{ E} \times 10^{-3}$) были проведены измерения активаторных активностей, так как некоторые штаммы *Aspergillus* не способны сами расщеплять определённые субстраты, но при добавлении в пробу плазмы крови способны протеолитически активировать плазменные ферменты, расщепляющие эти субстраты (Звонарева и др., 2015). По результатам эксперимента было обнаружено, что подавляющее большинство всех измеренных активаторных активностей незначительны ($<15 \text{ E} \times 10^{-3}$), что не представляет интереса для последующей работы. Единственным перспективным продуцентом активаторной протеазы оказался *A. melleus* после роста на ферментационной среде 2, его активаторная активность по отношению к субстрату S-2366 составила более $40 \text{ E} \times 10^{-3}$.

Фибринолитическая и активаторная к плазминогену активности, измеренные методом фибриновых пластин. Измерение фибринолитической и активаторной к плазминогену активностей по методу фибриновых пластин Аструпа – Мюллерца – Лассена позволило исследовать эти ферментативные активности в системе, имитирующей настоящий фибриновый сгусток, в то время как измерение активности по отношению к фибриногену, голубому фибрину или субстратам плазмина (S-2251) и урокиназы (S-2444) показало ферментативные активности протеаз только в растворе.

Прямой фибринолитической активностью после культивирования хотя бы на одной среде обладали 13 исследуемых видов, при этом все они также обладали активаторной активностью разной степени выраженности. Помимо этого, только активаторная, то есть непрямая фибринолитическая активность, была обнаружена ещё у трёх видов (*A. calidoustus*, *A. penicilloides*, *A. ruber*), остальные виды не представляли практического интереса, так как не проявляли способности к лизису в условиях реального фибринового сгустка.

Выбор перспективного продуцента. Для выбора наиболее перспективного продуцента протеаз с антикоагулянтной и тромболитической активностями по результатам скрининговых экспериментов были выбраны следующие критерии:

- 1) по данным эксперимента с измерением энзиматических индексов перспективными продуцентами считались штаммы со значениями энзиматических индексов больше 1 на фибрине и/или фибриногене, имеющие субстратную специфичность в отношении исследованных белков, то есть способные расщеплять не более 4 из 6 исследованных белков;
- 2) по данным исследования протеолитической активности культуральных жидкостей перспективными продуцентами считались штаммы, проявляющие значимую ($>15 \text{ E}$) фибрино- и/или фибринолитическую активности;

Таблица 1. Прямые активности культуральных жидкостей штаммов исследуемых видов по отношению к хромогенным пептидным субстратам (данные представлены в виде «среднее значение±стандартное отклонение», n=3). ФС – ферментационная среда

Микроцист	ФС	Амидолитическая активность по отношению к конкретному субстрату, E×10 ⁻³							
		Chromozum TH (тромбин)	S-2238	S-2251	S-2765	S-2222	S-2444	S-2366	
<i>A. aureolatus</i> BEOFB3320m	1	52,98±8,56	9,31±0,28	25,23±2,26	33,64±2,32	4,00±0,99	35,35±4,26	40,75±6,82	
	2	53,88±19,08	9,28±2,26	116,17±9,69	76,27±6,55	8,96±0,38	85,99±1,60	60,61±17,86	
<i>A. creber</i> BEOFB3250m	1	4,55±0,38	0,00	4,00±0,00	7,63±0,03	0,00	0,00	9,72±2,58	
	2	20,97±0,73	8,73±0,26	6,12±0,38	15,69±1,60	3,68±0,38	6,26±0,93	62,90±2,12	
<i>A. jensenii</i> BEOFB3200m	1	15,57±0,38	7,16±1,17	5,05±0,29	13,80±5,45	0,00	0,00	47,56±3,94	
	2	24,07±1,10	6,35±0,65	9,08±1,31	23,95±1,04	11,10±9,38	4,81±0,12	65,51±2,76	
<i>A. melleus</i> BEOFB3180m	1	36,80±0,44	0,00	68,27±15,02	0,00	0,00	0,00	0,00	
	2	55,85±5,68	5,63±2,44	69,98±6,58	3,05±0,84	16,97±0,15	5,19±1,02	0,00	
<i>A. protuberus</i> BEOFB3240m	1	0,00	15,08±5,08	6,93±0,26	19,98±5,02	6,90±0,52	0,00	65,22±0,38	
	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	73,37±7,37	
<i>A. ruber</i> BEOFB3150m	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	68,59±5,36	
	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	111,85±2,52	
<i>A. tabacinus</i> BEOFB3260m	1	50,37±10,59	17,05±17,05	9,40±0,93	31,93±7,16	6,99±1,25	15,43±3,89	69,46±5,65	
	2	0,00	3,92±2,64	0,00	0,00	0,00	0,00	9,86±1,62	
<i>A. tennesseensis</i> BEOFB3310m	1	53,33±1,19	8,90±8,90	25,52±9,05	34,19±0,38	4,15±0,09	10,03±0,87	52,69±7,11	
	2	76,21±2,49	9,19±0,03	87,09±5,08	77,92±4,79	5,80±0,00	59,91±44,44	80,10±2,73	

- 3) по данным исследования амидолитической активности культуральных жидкостей перспективными продуцентами считались штаммы со значимой прямой или активаторной активностью в отношении субстрата протеина С ($>15 \text{ E} \times 10^{-3}$);
- 4) по опыту с фибриновыми пластинами перспективными продуцентами считались штаммы, проявившие прямую и/или активаторную к плазминогену активности хотя бы на одной из двух сред.

Согласно этим критериям перспективными штаммами являются *A. ruber*, *A. tabacinus*, *A. tennesseensis*. Однако *A. ruber* в опыте с фибриновыми пластинами продемонстрировал только активаторную к плазминогену активность, в то время как ферменты других двух штаммов работали также и как прямые фибринолитики, что является более перспективным. Из оставшихся двух штаммов *A. tennesseensis* уступает *A. tabacinus*, так как проявляет широкую специфичность по отношению к хромогенным пептидным субстратам. Таким образом, для дальнейшего выделения и очистки протеаз был выбран *A. tabacinus*. По результатам первичного скрининга, этот штамм секретировал ферменты одновременно с антикоагулянтными, активаторными к плазминогену и фибрин(оген)олитическими свойствами.

Изучение влияния условий культивирования на секрецию протеазы. Для получения максимального выхода препарата протеолитических ферментов изучали динамику накопления протеаз в культуральной жидкости при росте *A. tabacinus* на разных ферментационных средах. При росте на ФС1 максимальная активность по S-2366 была на пятые сутки культивирования ($39 \text{ E} \times 10^{-3}$), по Chromozym ТН – на четвертые сутки ($22 \text{ E} \times 10^{-3}$). При росте на ФС2 были достигнуты более высокие значения активностей: максимальная активность по S-2366 и по Chromozym ТН была на седьмые сутки культивирования ($87 \text{ E} \times 10^{-3}$ и $73 \text{ E} \times 10^{-3}$ соответственно). Следует отметить, что активности культуральной жидкости по хромогенным пептидным субстратам, обнаруженные при культивировании на ФС2, превысили уровни аналогичных протеолитических активностей для 7 изученных ранее представителей рода *Aspergillus* (Осмоловский и др., 2014).

Исследование влияния рН и температуры на продукцию протеаз *A. tabacinus* проводили при культивировании на ФС2 в течение семи суток. Было обнаружено, что оптимальным начальным значением рН среды культивирования является 7-8 (рис. 1). Влияние температуры на продукцию протеаз *A. tabacinus* исследовали с использованием ФС2, начальное значение рН которой составляло 7. Было обнаружено, что оптимальной температурой для продукции протеаз является 28°C . При культивировании на данной температуре удельная протеин С-подобная активность культуральной жидкости составила более $250 \text{ E}/\text{мг}$ белка.

Выделение и очистка протеазы. Секретируемая протеаза *A. tabacinus* была выделена из 2 л культуральной жидкости и частично очищена с помощью последовательных процедур высаливания, диализа осажденных белков, лиофильной сушки препарата. Фибринолитическая активность полученного лиофильного препарата составила $779 \text{ E}/\text{мг}$ белка. Дальнейшая очистка была проведена методом колоночного изоэлектрофокусирования, после которого была выявлена фракция с наибольшей активностью по отношению к субстратам S-2366 и Chromozym ТН. Она соответствовала рН 2,9 и области наибольшей оптической плотности при 280 нм (рис. 2, фракции 1-3). Скорее всего, такие значения оптической плотности объясняются не высокой концентрацией белка во фракциях, а поглощением света пигментом, так как для представителей рода *Aspergillus* описано выделение меланинов, интенсивно

поглощающих ультрафиолет (Gonçalves et al., 2012). Вероятнее всего, исследуемая протеаза *A. tabacinus* является пигмент-ассоциированным белком. Активность фракции 3 по субстрату S-2366 составила $81 \text{ E} \times 10^{-3}$, по субстрату Chromozym TH – $69 \text{ E} \times 10^{-3}$.

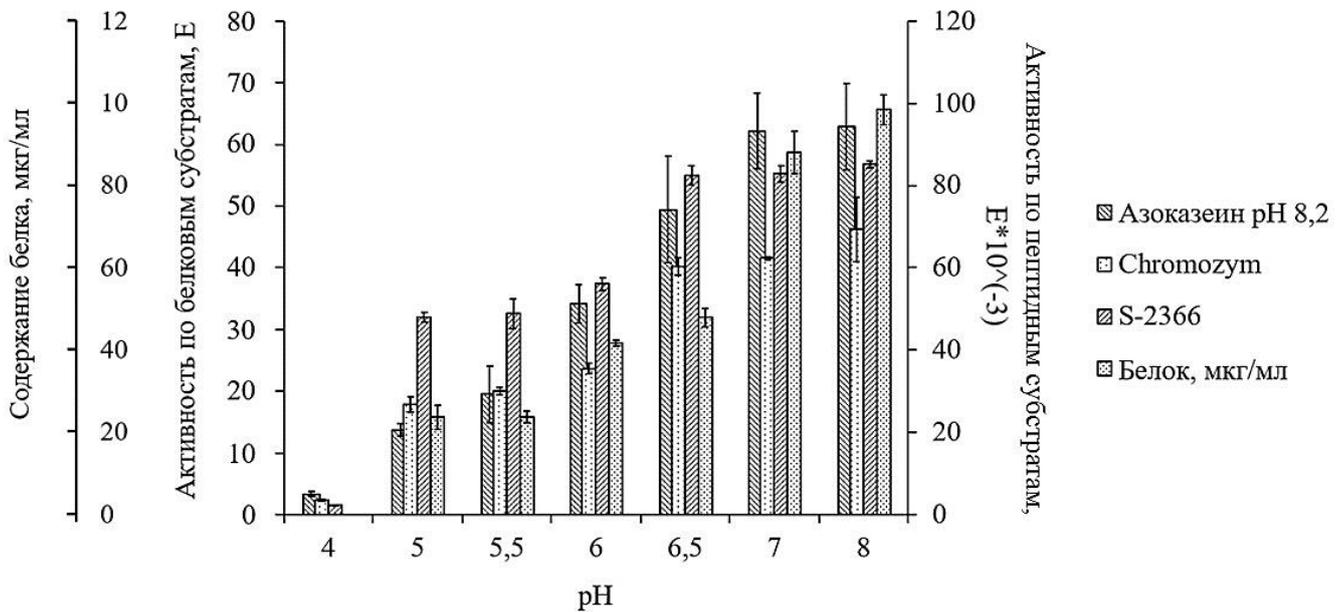


Рис. 1. Влияние рН ферментационной среды 2 на продукцию протеаз *A. tabacinus*

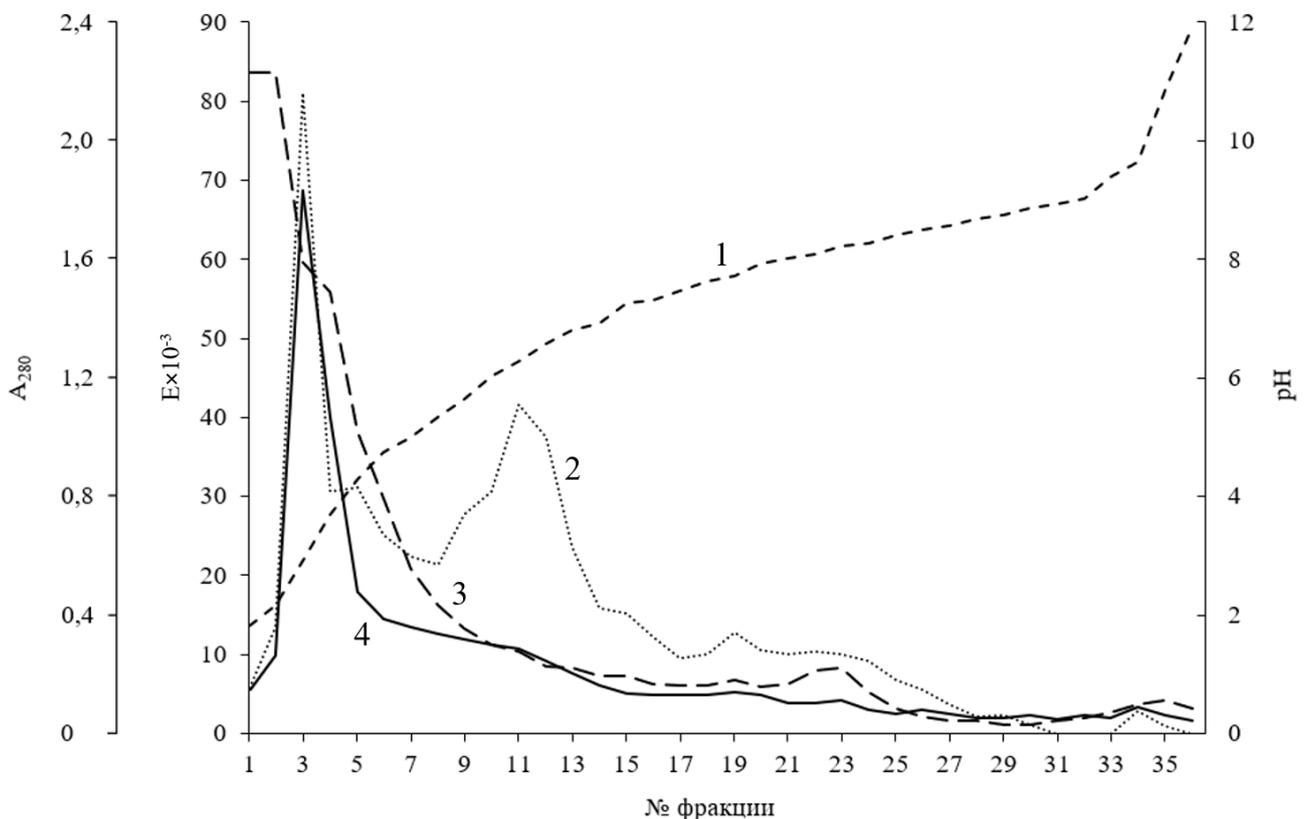


Рис. 2. Изоэлектрофокусирование внеклеточных белков культуральной жидкости *A. tabacinus*. 1 – рН. 2 – активность по отношению к субстрату S-2366 ($\text{E} \times 10^{-3}$). 3 – A_{280} . 4 – активность по отношению к субстрату Chromozym TH ($\text{E} \times 10^{-3}$)

По результатам изоэлектрофокусирования также был выявлен второй секретируемый протеолитический фермент, неактивный в отношении субстрата Chromozym TH, но активный в отношении S-2366 (рис. 2, фракция 11). Активность этой фракции по субстрату S-2366 составила $42 \text{ E} \times 10^{-3}$, что ниже, чем соответствующая активность фракции 3. Для дальнейших исследований фракция 11 не использовалась по причине меньшей протеин С-подобной активности и отсутствия тромбиноподобной активности, которая может приводить к активации человеческого протеина С при использовании протеазы в качестве медикамента.

Электрофоретические исследования протеазы *A. tabacinus*. Электрофорез по Лэммли фракции 3 (после изоэлектрофокусирования) выявил наличие в ней нескольких белков (рис. 3, дорожка 1). Для идентификации протеолитически активного компонента была проведена казеиновая зимография (рис. 3, дорожка 3), по результатам которой во фракции была выявлена единственная протеаза с молекулярной массой около 30 кДа. Выявление гликозилированных белков проводили после денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (рис. 3, дорожка 2). Был идентифицирован только один высокомолекулярный гликозилированный белок, не являющийся протеолитически активным. Отсутствие у протеазы *A. tabacinus* углеводного компонента сближает ее с другими внеклеточными протеазами, продуцируемыми представителями рода *Aspergillus* (Осмоловский и др., 2015), а также делает ее перспективным кандидатом для разработки препаратов протеолитических ферментов, так как гетерологичная экспрессия негликозилированных белков является более экономически выгодной.

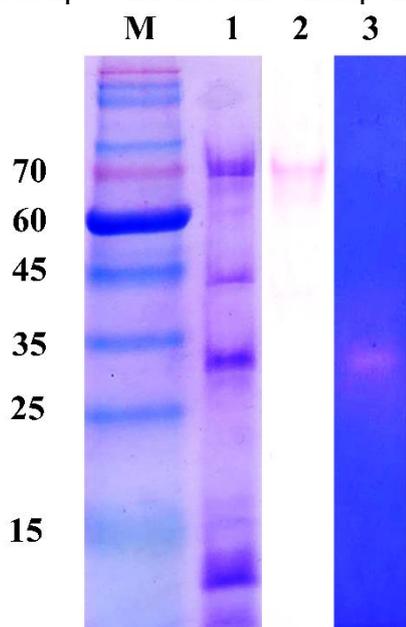


Рис. 3. Электрофоретический анализ внеклеточной протеазы *A. tabacinus* в ПААГ с ДСН-Na. М – маркеры, массы указаны в кДа. 1 – электрофореграмма по Лэммли. 2 – окраска на наличие углеводного компонента. 3 – казеиновая зимограмма

Анализ субстратной специфичности протеазы. При анализе субстратной специфичности протеазы *A. tabacinus* было обнаружено, что фермент неактивен в отношении субстратов трипсин- (Bz-Arg-pNA) и химотрипсин-подобных (Ac-Phe-pNA) протеаз, но проявляет значительную активность в отношении субстратов белков системы гемостаза: тромбина (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA), протеина С (pGlu-Pro-Arg-pNA), плазмина (H-D-Val-Leu-Lys-pNA), фактора Ха (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA) урокиназы (pGlu-Gly-Arg-pNA), тканевого активатора пламиногена (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA).

Ингибиторный анализ. Фермент устойчив к классическим ингибиторам цистеиновых (СМВ) и металлопротеаз (ЭДТА). Универсальный ингибитор сериновых протеаз PMSF и ингибиторы трипсин-подобных (TLCK) и химотрипсин-подобных протеаз (TPCK) также не влияли на функционирование протеазы *A. tabacinus*, в то время как соевый ингибитор трипсина подавлял активность фермента в дозозависимой манере.

Определение оптимума функционирования фермента и его стабильности. При исследовании влияния pH реакционной смеси на стабильность и активность протеазы *A. tabacinus* по отношению к субстрату S-2366 было выявлено, что фермент стабилен в диапазоне pH от 3 до 12 и проявляет максимальную активность при pH 7-12 (рис. 4). Полученные результаты позволяют предположить, что исследуемый фермент является щелочной протеазой, что характерно для других протеаз, секретируемых микромицетами рода *Aspergillus* (Chakrabarti, Matsumura, Ranu, 2000).

При исследовании влияния температуры на стабильность и активность протеазы *A. tabacinus* по отношению к субстрату S-2366 было выявлено, что фермент стабилен в диапазоне температур от 25 до 37°C и проявляет максимальную активность при температуре 55°C (рис. 5). Нахождение максимума активности при нефизиологических температурах, скорее всего, связано с физическим ускорением всех реакций при повышении температуры, что также было описано для других протеаз микромицетов рода *Aspergillus* (Звонарева и др., 2023). Сохранение высокой ферментативной активности при температуре тела человека делает протеазу *A. tabacinus* перспективным кандидатом для разработки терапевтических препаратов.

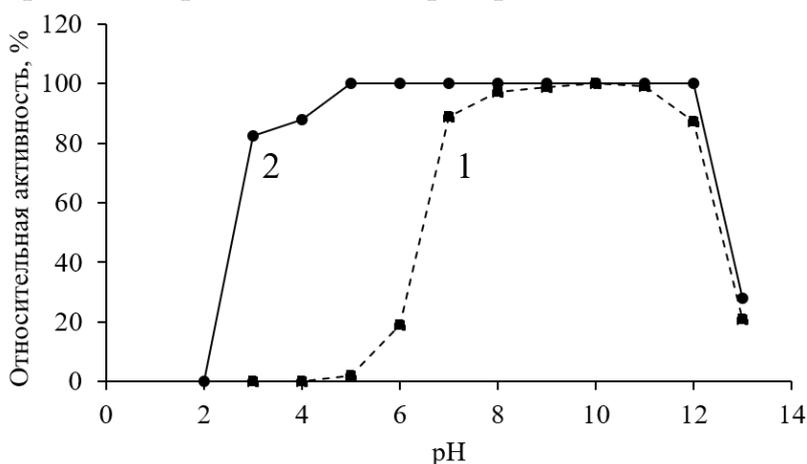


Рис. 4. Влияние pH на активность (1) и стабильность (2) протеазы *A. tabacinus*

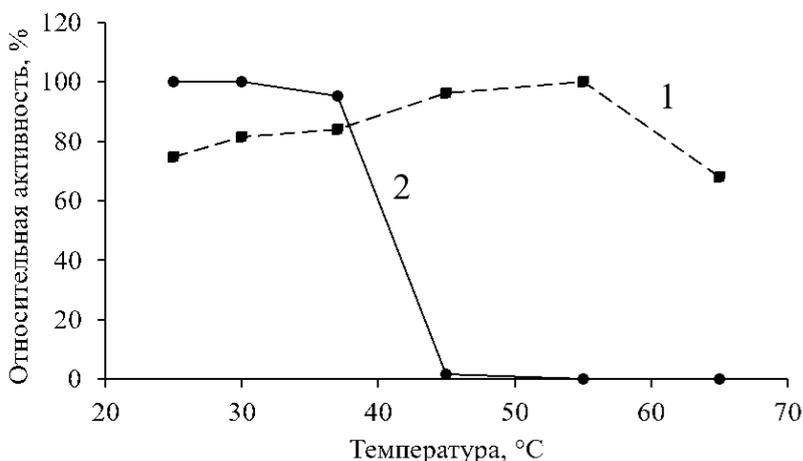


Рис. 5. Влияние температуры на активность (1) и стабильность (2) протеазы *A. tabacinus*

Обсуждение

Исследованные виды рода *Aspergillus* являются представителями 4 подродов, 8 секций и 13 серий. Положение на филогенетическом дереве изученных видов такого признака, как протеин С-подобная активности (рис. 6) показывает, что этот признак характерен для представителей серий *Versicolores* и *Speluncae* секции *Nidulantes*, которые составляют одну филогенетическую ветвь на изображённом дереве. Появление признака у *A. ruber*, скорее всего, является независимым эволюционным событием. В то же время, как было описано в разделе «Результаты» фибриногенолитическая, фибринолитическая и активаторная к плазминогену активности, судя по всему, свойственны большинству представителей рода *Aspergillus*. Только отдельные виды, видимо, вторично утратили в ходе эволюции какие-то из этих способностей.

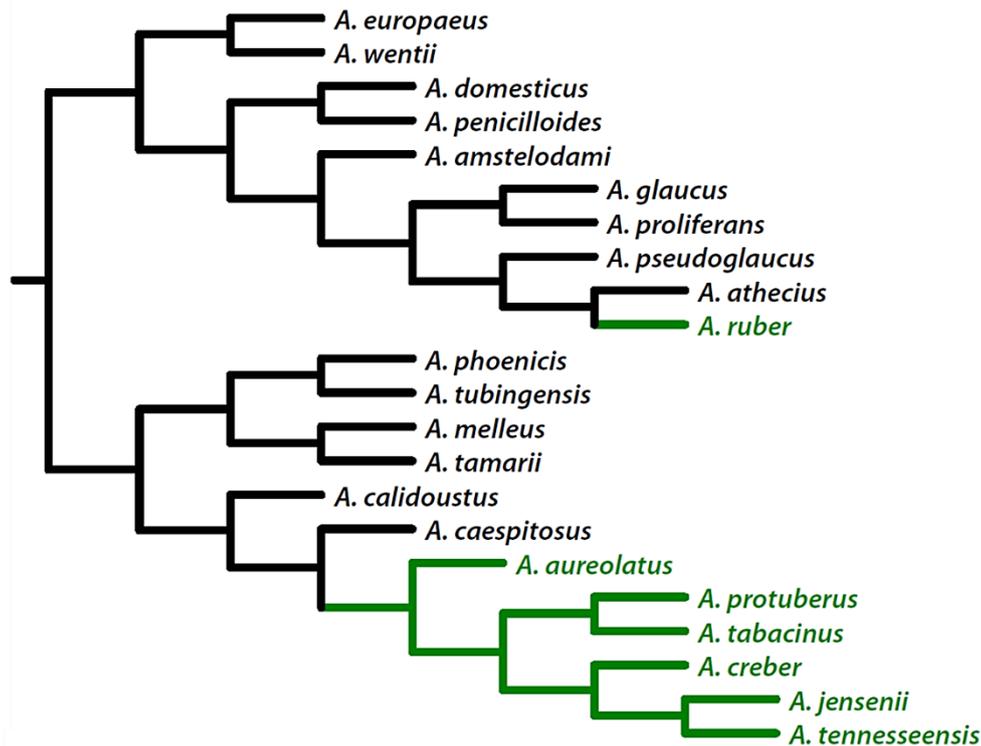


Рис. 6. Положение протеин С-подобной активности на филогенетическом дереве исследованных представителей рода *Aspergillus*. Зелёный цвет означает наличие активности, чёрный – отсутствие

В качестве наиболее перспективного продуцента противосвёртывающих и противотромботических протеаз согласно критериям, предложенным в разделе «Результаты», был выбран представитель серии *Versicolores* *A. tabacinus*, так как по результатам первичного скрининга данный продуцент проявляет антикоагулянтную, фибриногенолитическую, прямую фибринолитическую и активаторную к плазминогену активности.

Для более подробного изучения проявляемых культуральной жидкостью активностей была произведена частичная очистка фермента. После высаливания, диализа и лиофилизации протестировали полученный ферментный препарат на предмет сохранения тромболитической активности на примере фибриногенолитической активности. Выявленная удельная фибриногенолитическая активность была значительно больше, чем у ранее изученных продуцентов фибриногенолитических и фибринолитических протеаз (таблица 2).

Таблица 2. Сравнение фибринолитической активности лиофильно высушенного препарата протеаз *A. tabacinus* с другими продуцентами

Продуцент	Фибринолитическая активность, Е/мг белка
<i>A. tabacinus</i> ВЕОFB3260m	779
<i>A. terreus</i> 2 (Osmolovskiy et al., 2014)	348
<i>A. fumigatus</i> D-1 (Osmolovskiy et al., 2021)	103
<i>Sarocladium strictum</i> 203 (протеиназа III) (Корниенко и др., 2021)	218

Очистка методом изоэлектрофокусирования привела к выделению фракции со значительной антикоагулянтной протеин С-подобной активностью. Эта фракция не обладала способностью расщеплять фибриноген, но расщепляла субстраты фактора Ха, тромбина, плазмина и с меньшей активностью субстраты урокиназы и тканевого активатора плазминогена. Эти данные коррелируют со свойствами недавно описанной протеазы другого продуцента серии *Versicolores A. versicolor*. Для протеазы этого микромицета также было описано проявление антикоагулянтной, фибринолитической и активаторной к плазминогену активности, но не была исследована субстратная специфичность в отношении субстратов конкретных компонентов гемостаза (Zhao et al., 2022).

Сравнение свойств протеазы *A. tabacinus* с другими известными антикоагулянтными протеазами микромицетов рода *Aspergillus* (таблица 3) показало, что протеаза *A. tabacinus* активна по отношению к большему количеству субстратов компонентов гемостаза, чем протеазы *A. ochraceus* и *A. terreus*, следовательно новая протеаза проявляет более комплексное противотромботическое действие, чем уже известные. Различная чувствительность сравниваемых ферментов к ингибиторам, скорее всего, является следствием различий в структурных особенностях активного центра, которые требуют дальнейшего изучения. Температурные оптимумы и диапазоны температурной стабильности четырех протеаз отличаются не сильно, все указанные протеазы проявляют высокую активность при температуре тела человека, однако протеаза *A. terreus* не стабильна при длительном нахождении внутри организма, что делает ее неперспективной для разработки медицинского препарата. Аномально широкий по сравнению с другими протеазами диапазон рН-стабильности протеазы *A. tabacinus* может быть следствием высокой структурной стабильности нового фермента, что является положительным признаком для кандидата на разработку терапевтического препарата.

Таблица 3. Сравнение свойств антикоагулянтных протеаз, секретируемых разными представителями рода *Aspergillus*

Продуцент Свойство	<i>A. tabacinus</i> BEOFB3260m	<i>A. terreus</i> 2 (Osmolovskiy et al., 2014)	<i>A. ochraceus</i> ВКМ F4104-D (Osmolovskiy et al., 2021)	<i>A. versicolor</i> ZLH-1 (Zhao et al., 2022)
Компоненты системы гемостаза, в отношении субстратов которых активна протеаза микромицета	Протеин С, фактор Ха, тромбин, плазмин, урокиназа, тканевой активатор плазминогена	Тромбин, плазмин	Тромбин, плазмин	н/д
Ингибитор	Соевый ингибитор трипсина	PMSF	PMSF, TPCK, TLCK, соевый ингибитор трипсина, <i>n</i> -ХМБ	ЭДТА, ЭГТА
рН-оптимум	7-12	9-10	8-10	4-7
Диапазон рН-стабильности	3-12	10	5-10	4-7
Температурный оптимум	30-55°C	25-55°C	25-55°C	35-50°C
Диапазон температурной стабильности	25-37°C	25-30°C	30-45°C	10-40°C

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Протеин С является одним из важнейших компонентов противосвёртывающей системы человека, однако среди используемых в современной медицинской практике антикоагулянтов присутствует только один препарат, действующий на систему протеина С, – рекомбинантный активированный протеин С человека. В связи с отсутствием при применении этого препарата классических побочных эффектов приёма антикоагулянтов (кровотечений), сейчас ведётся активная работа по дизайну белковых активаторов протеина С (Barranco-Medina S. et al., 2017). Альтернативой такому подходу является поиск протеолитических ферментов микроорганизмов, имитирующих активность протеина С человека. Ферменты, имитирующие активность протеина С, являются потенциально более универсальными противосвёртывающими средствами, чем активаторы человеческого протеина С, так как у ряда пациентов встречается резистентность к активированному протеину С (Rosén S.B. et al., 1997).

В рамках данной работы было показано, что антикоагулянтная протеин С-подобная активность наряду с тромболитической активностью встречается у внеклеточных протеаз микромицетов серий *Versicolores* и *Speluncei* секции *Nidulantes* подрода *Nidulantes* рода *Aspergillus*. На основании данных о ферментативных активностях и о субстратной специфичности, полученных разными методами, из исследованных микромицетов был выбран наиболее перспективный продуцент противосвёртывающих и противотромботических ферментов – *A. tabacinus*. Следует отметить, что для разработки нового высокоэффективного противотромботического средства стоит использовать протеолитический препарат с несколькими активностями, так как в современной терапии, как правило, используют одновременно два или три лекарства со следующими свойствами: антиагрегант, антикоагулянт, прямой фибринолитик, активатор пламиногена. Протеаза *A. tabacinus* показала свою способность работать как антикоагулянт (расщепляет субстрат активированного протеина С), прямой фибринолитик и активатор пламиногена. Помимо этого, если ферменты продуцента окажутся нетоксичными и неиммуногенными для человека, как некоторые уже известные препараты на основе грибных протеаз (Трихолизин, Лонголитин), возможна разработка терапевтического препарата не на основе очищенной протеазы, а на основе ферментатного препарата, полученного после высаливания, диализа и лиофилизации секретируемых белков. Обнаруженная в данном препарате фибринолитическая активность может дополнительно способствовать антиагрегантным свойствам при применении препарата *in vivo*.

Потенциальным недостатком ферментов *A. tabacinus* может быть их активность в отношении субстратов прокоагулянтов тромбина и фактора Ха, но это также может быть и плюсом, так как фактор Ха, тромбин и протеин С работают в системе, где Ха активирует тромбин, а тромбин активирует протеин С. Таким образом, обладая всеми перечисленными активностями, протеолитический препарат *A. tabacinus* может формировать петлю положительной обратной связи, приводящей к усиленной активации противосвёртывающей системы. По сравнению с рекомбинантным человеческим протеином С протеолитический препарат *A. tabacinus* может быть более перспективным, так как введение чужеродного белкового агента вряд ли приведёт к дисбалансу естественных антикоагулянтных факторов, а введение собственного человеческого белка может иметь такой эффект.

ВЫВОДЫ

1. Тромболитическая активность свойственна большинству исследованных видов рода *Aspergillus*. Антикоагулянтная активность характерна для представителей серий *Versicolores* и *Speluncae* секции *Nidulantes* подрода *Nidulantes*.

2. По совокупности параметров было установлено, что секретируемые ферменты *A. tabacinus* в наибольшей степени соответствуют требованиям, предъявляемым к перспективным антикоагулянтным и тромболитическим препаратам.

3. Разработаны оптимальные методы, позволяющие добиться максимального уровня секреции антикоагулянтного протеолитического фермента *A. tabacinus*.

4. Впервые выделена протеаза микромицета с протеин С-подобной активностью. Протеаза *A. tabacinus* является негликозилированным белком с массой около 30 кДа, ингибируется соевым ингибитором трипсина, проявляет субстратную специфичность в отношении субстратов протеина С, плазмина, фактора Ха, тромбина, урокиназы, тканевого активатора плазминогена. Частично очищенный фермент стабилен при физиологических температурах и обладает широким оптимумом рН.

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

1. Surkova D., **Lavrenova V.**, Klyagin S., Shestakova A., Osmolovsky A. Screening of proteases produced by *Aspergillus* micromycetes active against proteins of the hemostasis system // Current Medical Mycology. – 2023. – V. 9. – №1. – P. 8-13. DOI: 10.18502/cmm.2023.150674. (IF SJR = 0,32 Q3). Вклад автора в печатных листах: (0,375/0,225) (Здесь и далее в скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах).
2. Shestakova A., Osmolovsky A., **Lavrenova V.**, Surkova D., Nikolić B., Savković Ž. A Novel Approach for Assessing the Proteolytic Potential of Filamentous Fungi on the Example of *Aspergillus spp.* // Microbiology and Biotechnology Letters. – 2023. – V. 51. – № 4. – P. 457-464. DOI: 10.48022/mbl.2309.09006. (IF SJR = 0,189 Q4). (0,5/0,275)
3. **Lavrenova V.**, Kreyer V., Savković Ž., Osmolovskiy A. Properties of Extracellular Protease – Regulator of Hemostasis Produced by Micromycete *Aspergillus tabacinus* // Applied Biochemistry Microbiology. – 2024. – V. 60. – №1. – P. 118-123. DOI: 10.1134/S0003683824010101. (IF SJR = 0,244 Q3). (0,375/0,3)