

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*



**Лавренова Виктория Николаевна**

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

1.5.11. Микробиология

1.5.4. Биохимия

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук  
Осмоловский Александр Андреевич

Москва – 2024

## Оглавление

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	<b>4</b>
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	<b>10</b>
1.1. Система образования и расщепления тромбов.....	10
1.1.1. Первичный гемостаз .....	10
1.1.2. Вторичный гемостаз .....	12
1.1.3. Противосвёртывающая система .....	19
1.1.4. Система фибринолиза.....	22
1.2. Противосвёртывающие и тромболитические препараты .....	25
1.2.1. Препараты, препятствующие активации и агрегации тромбоцитов ..	25
1.2.2. Антикоагулянты .....	28
1.2.3. Фибринолитики .....	32
1.2.3.1. Непрямые фибринолитики.....	32
1.2.3.2. Прямые фибринолитики .....	34
1.3. Микро- и макромицеты как перспективные продуценты антикоагулянтных и фибринолитических ферментов .....	40
1.3.1. Продуценты антикоагулянтов .....	41
1.3.2. Продуценты активаторов плазминогена .....	43
1.3.3. Продуценты прямых фибринолитиков .....	45
1.3.4. Антитромботические ферменты, продуцируемые микромицетами рода <i>Aspergillus</i> .....	58
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> .....	<b>61</b>
2.1. Объект исследования.....	61
2.2. Поверхностное культивирование микромицетов .....	63
2.3. Глубинное культивирование микромицетов .....	63
2.4. Определение энзиматических индексов.....	63
2.5. Определение протеолитической активности в культуральной жидкости с белковыми субстратами.....	64
2.6. Определение амидолитической активности с хромогенными пептидными субстратами .....	65
2.7. Измерение концентрации белка .....	66
2.8. Метод фибриновых пластин .....	66
2.9. Изучение динамики накопления протеаз в культуральной жидкости .....	67

2.10. Влияние pH и температуры на продукцию протеазы .....	67
2.11. Выделение и очистка протеазы .....	68
2.12. Электрофорез в денатурирующих условиях .....	68
2.13. Зимография .....	68
2.14. Выявление гликозилирования в геле .....	69
2.15. Анализ субстратной специфичности протеазы .....	69
2.16. Ингибиторный анализ .....	70
2.17. Определение оптимума функционирования фермента и его стабильности .....	70
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ .....</b>	<b>71</b>
3.1. Протеолитическая активность штаммов при поверхностном культивировании .....	71
3.2. Протеолитическая активность штаммов при глубинном культивировании .....	76
3.3. Амидолитическая активность штаммов при глубинном культивировании .....	81
3.4. Фибринолитическая и активаторная к плазминогену активности штаммов .....	89
3.5. Выбор перспективного продуцента .....	91
3.6. Динамика накопления протеаз <i>A. tabacinus</i> в культуральной жидкости .....	93
3.7. Влияние pH и температуры на продукцию протеаз .....	95
3.8. Выделение и очистка протеазы .....	96
3.9. Электрофоретические исследования протеазы <i>A. tabacinus</i> .....	97
3.10. Анализ субстратной специфичности протеазы .....	98
3.11. Ингибиторный анализ .....	100
3.12. Определение оптимума функционирования фермента и его стабильности .....	100
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>103</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>122</b>
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>122</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....</b>	<b>123</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>124</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### **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 [1].

Лекарственными препаратами, предотвращающими формирование тромбов при различных заболеваниях, являются антикоагулянты, а вещества, которые помогают расщеплять уже существующие тромбы, называются тромболитиками. 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 тромболитических протеаз бактериального происхождения: стрептокиназу [2], стафилокиназу [3], серрапептазу [4], наттокиназу [5]. Потенциал и разнообразие грибных протеаз вряд ли уступает бактериальным ферментам. В то время как бактерии специализируются на секреции 1-3 специфических протеолитических ферментов, микроскопические грибы, как правило, выделяют целую смесь протеаз, действие которых дополняет друг друга [6, 7]. Продуценты протеаз с антикоагулянтными и тромболитическими свойствами известны среди представителей отделов *Mucoromycota*, *Ascomycota* и *Basidiomycota*, однако наибольшая доля исследованных на данный момент продуцентов

противотромботических протеаз приходится на представителей рода *Aspergillus* семейства *Aspergillaceae* отдела *Ascomycota* [8, 9]. Широкая экологическая иррадиация данного рода, который включает более 800 видов, позволяет видам 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 [10-16]. 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 тромболизис, распространены среди разных подродов рода *Aspergillus*, в то время как антикоагулянтная активность характерна для изученных представителей серий

*Versicolores* и *Speluncei* секции *Nidulantes* подрода *Nidulantes*. Активаторная к человеческому протеину С активность характерна для исследованных в данной работе и ранее представителей подрода *Circumdati*.

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, плазмينا, 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 и активаторной к протеину С активностей с систематическим положением вида в филогении рода *Aspergillus*. В будущем поиск протеаз с такими активностями можно будет осуществлять прицельно среди представителей подродов *Nidulantes* и *Circumdati* соответственно.

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 *Speluncei* 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, плазмина, 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 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.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### *1.1. Система образования и расщепления тромбов*

Гемостаз – это сложная многокомпонентная система, существующая для сохранения целостности сосудистого русла, предотвращения кровопотерь и поддержания крови в жидком состоянии. В системе гемостаза можно выделить две составляющие. Первичный гемостаз включает реакции эндотелия на повреждения, влекущие за собой активацию и агрегацию тромбоцитов. Вторичный гемостаз, или коагуляция, включает каскад взаимодействующих белков (факторов свёртывания), последовательно активирующих друг друга за счёт конформационных изменений и/или частичного протеолиза. Противосвёртывающая система, напротив, представляет собой различные белковые факторы, ингибирующие коагуляцию для предотвращения распространения тромба на неповреждённые области сосуда. Система фибринолиза, то есть разрушения тромба, ответственна за расщепление компонентов тромба после восстановления целостности сосудистой стенки.

#### *1.1.1. Первичный гемостаз*

В первичном гемостазе принимают участие тромбоциты, а также различные компоненты стенки сосудов. Этот процесс запускается при нарушении целостности сосудистого эндотелия и заканчивается формированием так называемого белого тромба, состоящего, в основном, из активированных тромбоцитов, агрегаты которых поддерживаются за счёт белковых сшивок. Белый тромб закрывает участок повреждённого эндотелия сосуда, чем способствует остановке кровотечения.

В норме неповреждённый эндотелий обладает антитромботическими свойствами, так как в просвет сосуда экспонированы, в основном, нейтральные фосфолипиды внешнего монослоя мембраны эндотелиальных клеток и отрицательно заряженные гепарин-подобные глюкозаминогликаны межклеточного матрикса, что препятствует агрегации тромбоцитов [17, 18]. Помимо этого, нормальный эндотелий экспрессирует ферменты, препятствующие агрегации тромбоцитов, например эктоАДФазу, и секретирует вещества, способствующие расширению сосудов и предотвращающие активацию

тромбоцитов, такие как NO, простаглицлин. Также эндотелий экспрессирует вещества, препятствующие активации вторичного гемостаза, например, тромбомодулин, секретирует ингибиторы вторичного гемостаза, такие как протеин S, ингибитор пути тканевого фактора (TFPI), и активаторы фибринолиза, такие как тканевой активатор плазминогена и урокиназа [19].

Различные стрессовые воздействия – гипоксия, окислительный стресс, действие бактериальных эндотоксинов и провоспалительных цитокинов – запускают в клетках эндотелия ряд сигнальных каскадов, приводящих к смене антитромботических свойств на протромботические. Так, эндотелий начинает экспрессировать тканевой фактор, экспонировать в мембрану рецепторы IX и X факторов свёртывания, необходимые для запуска вторичного гемостаза, продуцировать фактор активации тромбоцитов (PAF), секретировать эндотелиальный ингибитор активатора плазминогена (PAI-1), препятствующий эффективному фибринолизу [17, 20].

Основным событием, запускающим образование белого тромба, является секреция крупного гликопротеина – фактора фон Виллебранда (vWF) клетками эндотелия при повреждении. Тяжи vWF и коллагеновые волокна, экспонированные в просвет сосуда в месте повреждения, а также участники вторичного гемостаза – фибриноген и фибрин, – являются платформой для прикрепления и последующей активации и агрегации тромбоцитов, которые экспрессируют рецепторы к vWF, коллагену и фибриногену/фибрину: vWF связывается с комплексом гликопротеинов I-IX-V, коллаген – с гликопротеином VI и интегрином  $\alpha 2\beta 1$ , фибриноген и фибрин – с интегрином  $\alpha 2\beta 3$  [21-23]. Взаимодействие vWF с комплексом гликопротеинов I-IX-V запускает сигнальный каскад, в итоге приводящий к выходу ионов кальция из эндополазматического ретикулума тромбоцитов и возникновению в них кальциевых осцилляций [24-26].

Возникновение в цитоплазме тромбоцитов кальциевых осцилляций приводит к нескольким важным последствиям: реорганизации цитоскелета, экзоцитозу содержимого гранул и стимуляции дальнейшей агрегации [27-29], усилению синтеза эйкозаноидов [30] и транслокации отрицательно заряженных

фосфолипидов во внешний монослой мембраны [31]. Транслокация отрицательно заряженных фосфолипидов, например, фосфатидилсерина, во внешний монослой мембраны активированных тромбоцитов связывает первичный гемостаз с процессом коагуляции, так как благодаря электростатическим взаимодействиям на мембране таких тромбоцитов сорбируются ионы кальция, необходимые для сборки комплексов ряда факторов свёртывания.

### *1.1.2. Вторичный гемостаз*

Вторичный гемостаз или коагуляция – это каскад взаимодействующих белков (факторов свёртывания), последовательно активирующих друг друга за счёт конформационных изменений и/или частичного протеолиза. Итогом вторичного гемостаза является образование фибриновых сгустков, поддерживающих структуру тромба. Традиционно выделяли два пути активации коагуляции – внешний, вызванный взаимодействием фактора VII с тканевым фактором (TF), и внутренний, происходящий в результате активации белков плазмы крови прекалликреина и высокомолекулярного кининогена. Считалось, что внутренний путь активации коагуляции запускается, в основном, при воспалении и играет малую роль в нормальном тромбообразовании, возникающем, например, в результате физического повреждения стенки сосуда. Однако, согласно современным представлениям, внутренний путь лишь ускоряет процесс образования тромбина, инициированный внешним путём коагуляции [32].

Тканевой фактор (TF) – это мембранный гликопротеин, принадлежащий к суперсемейству цитокиновых рецепторов, который конститутивно экспрессируется в клетках подэндотелиального слоя стенки сосудов (гладкомышечных клетках, перицитах, фибробластах) и некоторых других тканях [33]. При повреждении эндотелия и экспонировании подэндотелиального слоя в просвет сосуда TF взаимодействует с секретиром гепатоцитами в плазму фактором VII и индуцирует его конформационные изменения, что приводит к демаскировке сайта протеолиза для сериновых протеаз плазмы крови [34]. Следует отметить, что при стрессовых воздействиях TF также экспрессируется тромбоцитами, моноцитами, эндотелиальными клетками [35], которые могут

производить экстраклеточные везикулы, содержащие TF и циркулирующие в плазме. Такие везикулы также вносят свой вклад в процессы гемостаза [36]. Кроме того, существует более короткий по последовательности растворимый TF с отсутствующим трансмембранным доменом, образующийся в результате альтернативного сплайсинга. Однако эта форма TF, скорее всего, участвует в регуляции клеточной пролиферации и ангиогенезе, а не в процессах свёртывания [37].

В результате частичного протеолиза сериновыми протеазами плазмы крови (среди которых факторы IXa, Xa, XIIa, протеаза, активирующая фактор VII, комплекс TF-VIIa, тромбин, плазмин) фактор VII активируется и становится формой VIIa. Далее комплекс TF-VIIa может осуществлять частичный протеолиз секретируемых гепатоцитами в плазму крови факторов IX и X, конвертируя их в формы IXa и Xa, соответственно [38]. Примечательно, что тканевой фактор может существовать в двух конформациях: активной в процессах коагуляции и неактивной (криптической). Обе конформации способны связывать фактор VII и его активированную форму [39]. Баланс между двумя конформациями TF влияет на скорость коагуляции, однако до сих пор не известны детали процесса перехода между ними. По-видимому, в нём участвуют отрицательно заряженные фосфолипиды (фосфатидилсерин) и протеин-дисульфид-изомераза. Отрицательно заряженные фосфолипиды также необходимы для формирования прочного комплекса между TF и фактором VIIa, так как отрицательно заряженные мембранные фосфолипиды могут связываться с ионами кальция, которые, в свою очередь, также связываются с остатками карбоксиглутаминовой кислоты фактора VIIa.

Фактор Xa совместно с фактором Va формирует на мембранах активированных тромбоцитов комплекс, называемый протромбиназой [40]. Для формирования этого комплекса так же, как и для комплекса TF-VIIa, необходимы ионы кальция, выполняющие роль ионных мостиков между отрицательно заряженными фосфолипидами внешнего монослоя мембраны активированных тромбоцитов и остатками карбоксиглутаминовой кислоты фактора Xa. Следует

отметить, что для формирования протромбиназного комплекса фактор V, секретлируемый, как и остальные факторы, клетками печени, должен быть подвергнут ограниченному протеолизу под действием тромбина. Часть молекул фактора V может подвергаться рецептор-опосредованному эндоцитозу тромбоцитами, в эндосомах которых тоже может происходить частичный протеолиз этого фактора. Подвергнутый протеолизу фактор V может экзоцитироваться из  $\alpha$ -гранул активированных тромбоцитов [41].

Фактор IXa совместно с фактором VIIIa формирует на мембране активированных тромбоцитов комплекс, аналогичный комплексу Xa-Va. В образовании этого комплекса вновь принимают участие кальциевые мостики между фосфолипидами и остатками карбоксиглутаминовой кислоты фактора IXa. Комплекс IXa-VIIIa, называемый теназой, необходим для дополнительной активации фактора X. Для сборки этого комплекса осуществляется протеолиз фактора VIII под действием тромбина или фактора Xa [41]. Существование путей дополнительной активации протромбиназы обеспечивает регуляцию образования фибринового сгустка по механизму положительной обратной связи.

Для сборки упомянутых выше комплексов факторов свёртывания необходимы домены, богатые остатками карбоксиглутаминовой кислоты, присутствующие у факторов VII, IX и X. Карбоксилирование глутаминовой кислоты – это посттрансляционная модификация, производимая специальным витамин K-зависимым ферментом, экспрессирующимся в эндоплазматическом ретикулуме клеток печени. Таким образом, созревание и последующее нормальное функционирование факторов VII, IX и X напрямую зависит от баланса витамина K в организме [42].

Так называемый внутренний путь коагуляции начинается с ограниченного протеолиза фактора XII. Для протеолиза фактора XII необходимо изменение конформации, в результате которого демаскируется сайт расщепления сериновыми протеазами. Существует несколько активаторов конформационных изменений фактора XII: полифосфаты, которые секретруются из активированных тромбоцитов, отрицательно заряженные глюкозаминогликаны, например,

хондроитинсульфат, циркулирующие в крови нуклеиновые кислоты, высвобождаемые при нетозе нейтрофилов, а также некоторые патоген-ассоциированные молекулы [43]. Протеолиз фактора XII может осуществляться самим фактором XII, а также калликреином и плазмином. Далее активированная форма XIIa осуществляет протеолиз прекалликреина и фактора XI. Высокомолекулярный кининоген в присутствии атомов цинка может связываться с цитоплазматическими мембранами клеток и способствовать взаимодействию фактора XII со своими субстратами [44]. Взаиморасщепление прекалликреина фактором XIIa и фактора XII калликреином формирует петлю положительной обратной связи, служащую для быстрой активации коагуляции. Калликреин также может осуществлять протеолиз кининогенов до кининов, которые участвуют в реализации воспалительных реакций и регуляции артериального давления [38].

Активированный в результате протеолиза фактором XIIa фактор XIa осуществляет протеолиз фактора IX, необходимого для сборки теназного комплекса, который, в свою очередь, осуществляет протеолиз фактора X и способствует сборке протромбиназного комплекса. Таким образом, итогом нескольких способов активации коагуляции (рис. 1) и многочисленных положительных обратных связей является образование большого количества протромбиназы, осуществляющей протеолиз протромбина до тромбина, который, в свою очередь, расщепляет фибриноген до фибрина и необходим для образования так называемого «красного» тромба. Следует отметить, что протромбин, как и факторы VII, IX и X, содержит домен, богатый остатками карбоксиглутаминовой кислоты, а следовательно его нормальное созревание зависит от витамина K.

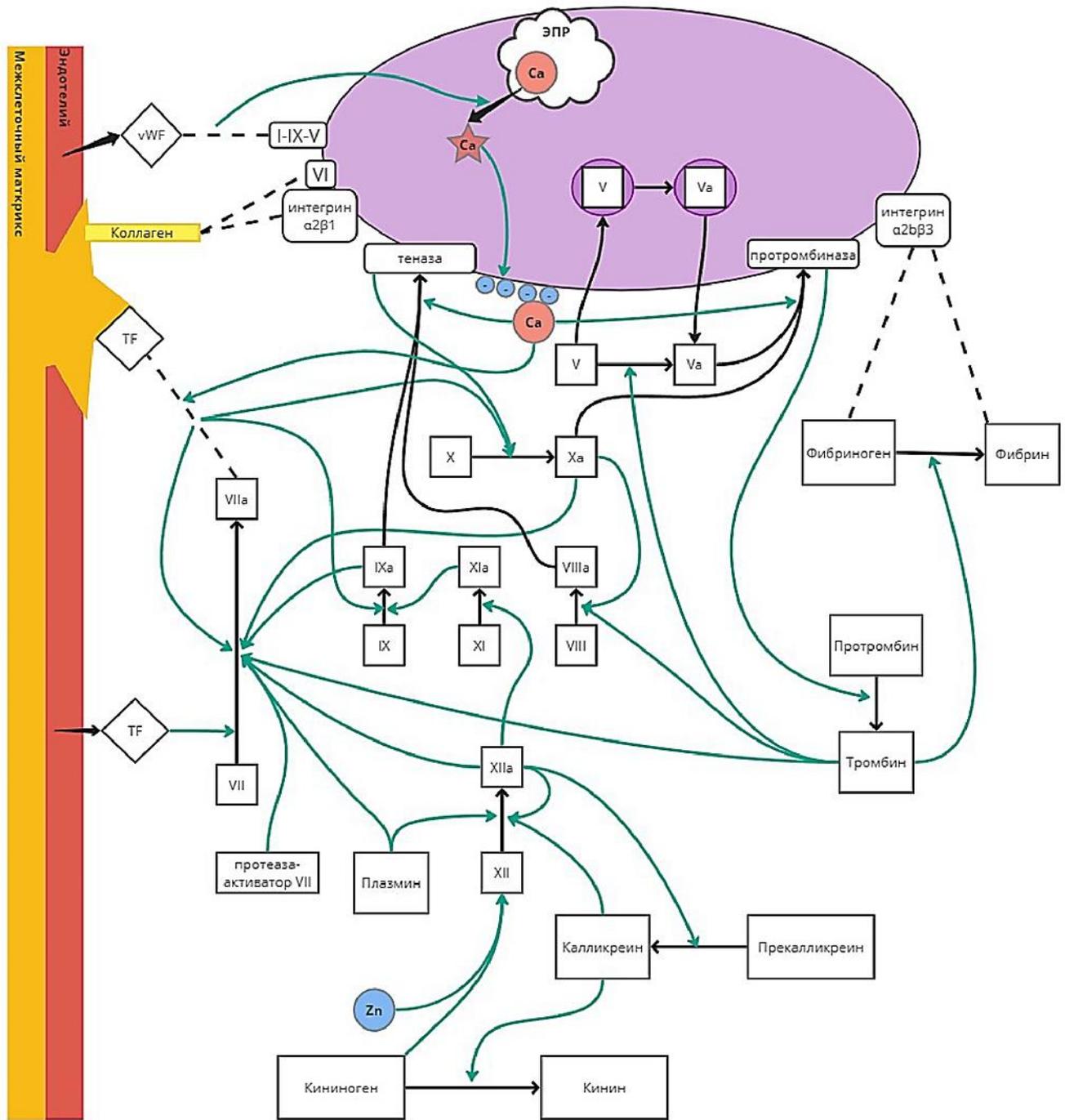


Рис. 1. Схема процессов первичного и вторичного гемостаза

Фибриноген, как и факторы свёртывания, секретируется в плазму клетками печени. В составе фибриногена присутствуют три полипептида:  $A\alpha$ ,  $B\beta$  и  $\gamma$ . Они синтезируются рибосомами, прикреплёнными к эндоплазматическому ретикулуму, и далее процессируются в и комплексе Гольджи. Процессинг включает посттрансляционные модификации (гликозилирование и др.) и олигомеризацию цепей. Сначала образуются димеры  $A\alpha$ - $\gamma$  и  $B\beta$ - $\gamma$ , затем из димеров и одиночных  $A\alpha$ -

или В $\beta$ -цепей образуются тримеры А $\alpha$ -В $\beta$ - $\gamma$ , далее два тримера взаимодействуют N-концевыми участками и агрегируют благодаря образованию дисульфидной связи [45]. В таком виде фибриноген циркулирует в крови. Тромбин отщепляет по небольшому пептиду от А $\alpha$ - и В $\beta$ -цепей, эти пептиды называются фибринопептидами А и В, соответственно. После отщепления фибринопептида А на N-конце  $\alpha$ -цепи оказывается новая последовательность, за счёт которой N-конец  $\alpha$ -цепи может взаимодействовать с определёнными участками  $\gamma$ -цепи другой молекулы фибрина: формируются так называемые “knob-hole A-a” взаимодействия [46]. Благодаря таким взаимодействиям происходит олигомеризация фибрина и образование протофибрилл. Как только протофибриллы достигают пороговой длины, начинается их латеральная агрегация. Взаимодействия, за счёт которых происходит упомянутый процесс, до сих пор точно не идентифицированы, однако предполагается, что в нём могут участвовать “knob-hole B-b” взаимодействия, связи, формируемые гликозилированными аминокислотными остатками, а также C-концевыми участками  $\alpha$  и  $\gamma$ -цепей [45]. Непосредственное образование тромба связано с фазовым переходом золь-гель фибринового сгустка. Известно, что для такого перехода достаточно лишь конвертации 15-20% фибриногена в составе тромба в фибрин [47].

Функцию стабилизации фибринового сгустка выполняет трансклутаминаза (фактор XIII). Данный фермент активируется в результате частичного протеолиза под действием тромбина и катализирует образование изопептидной связи между остатками глутаминовой кислоты и лизина между  $\gamma$ -цепями фибрина, за счёт чего формируются кросс-сшивки, стабилизирующие структуру фибринового сгустка [48]. Общая схема образования фибрина из фибриногена показана на рис. 2.

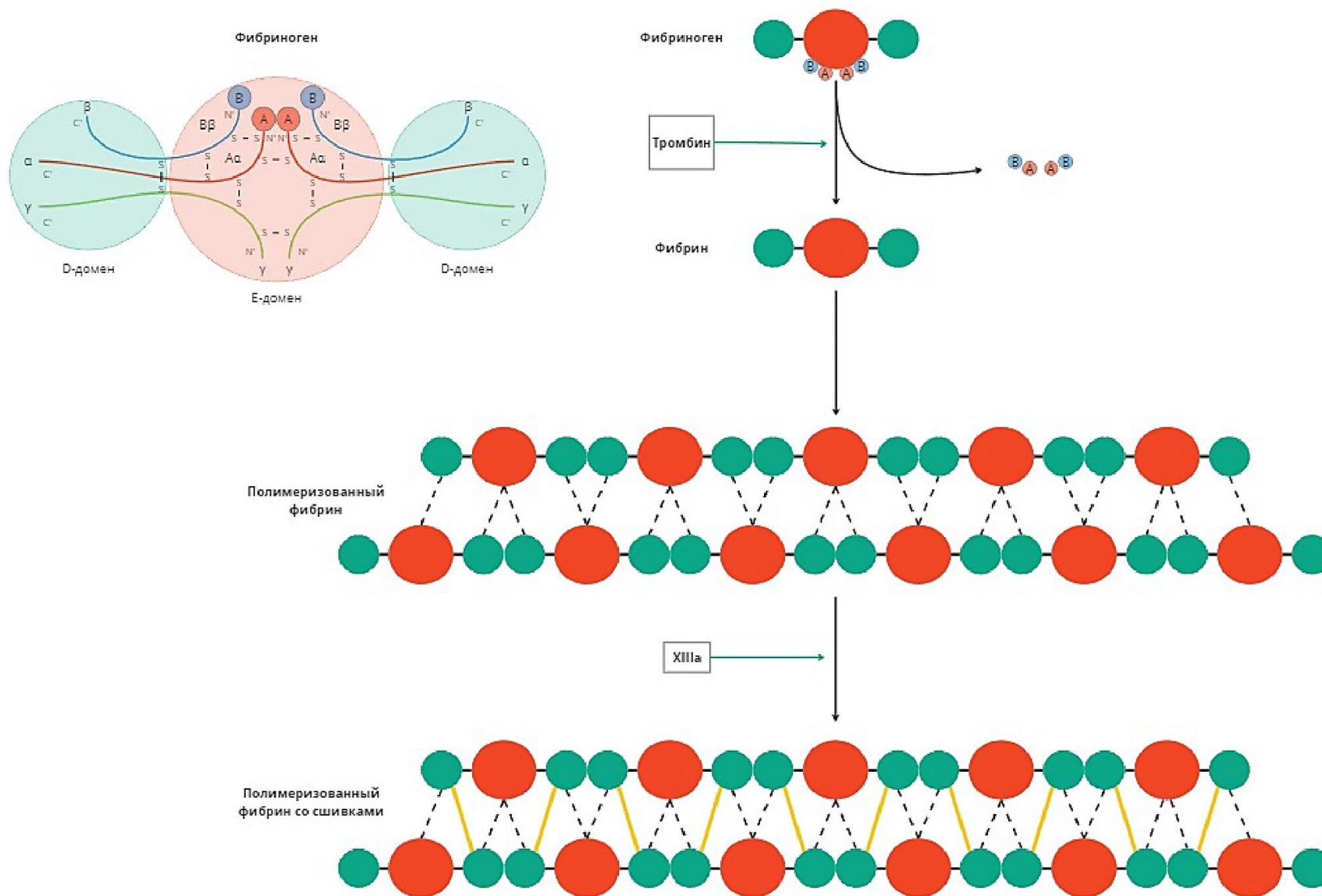


Рис. 2. Схема полимеризации фибрина

### *1.1.3. Противосвёртывающая система*

Противосвёртывающая система представляет собой несколько белковых ингибиторов и модуляторов протеолитической активности ферментов каскада коагуляции. К компонентам противосвёртывающей системы относятся антитромбин и другие ингибиторы суперсемейства серпинов, в том числе протеин Z-зависимый ингибитор протеаз; также противодействуют коагуляции ингибитор пути тканевого фактора и система тромбомодулина-протеина С-протеина S [49].

Антитромбин – это секретируемый гепатоцитами гликопротеин, относящийся к суперсемейству серпинов – ингибиторов сериновых протеаз [50]. Антитромбин способен ингибировать все сериновые протеазы каскада коагуляции за счёт ковалентной модификации активного центра, однако основными мишенями этого белка являются фактор Ха, тромбин и в меньшей степени фактор IXa [51]. Циркулирующий в плазме крови антитромбин находится в криптической конформации, то есть его активный центр, необходимый для связывания с сериновыми протеазами, скрыт. Для экспонирования активного центра ингибитора наружу необходимо связывание гепарина или подобных ему глюкозаминогликанов, экспонированных на поверхности эндотелия, например, гепарансульфата [49]. В норме эндогенный уровень гепарина в плазме очень низкий, поэтому активация антитромбина происходит за счёт глюкозаминогликанов стенки сосуда.

Антитромбин – не единственный эндогенный серпин, ингибирующий протеазы каскада коагуляции. Другими серпинами с похожим действием являются кофактор II гепарина, С1-ингибитор, протеаза нексин 1,  $\alpha$ 1-антитрипсин [52]. Все упомянутые ингибиторы, кроме протеазы нексина 1, секретируются клетками печени и циркулируют в плазме крови. Протеаза нексин 1 экспрессируется в клетках различных органов, например мозга, сердца, почек, селезёнки, лёгких, а в крови присутствует благодаря экзоцитозу содержимого  $\alpha$ -гранул тромбоцитов [53]. Так же, как и антитромбин, все упомянутые ингибиторы, кроме  $\alpha$ 1-антитрипсина, для активации нуждаются в связывании глюкозаминогликанов, а  $\alpha$ 1-антитрипсин, напротив, ингибируется в присутствии гепарина [54].

Присутствующие в крови серпины имеют разную субстратную специфичность. По сравнению с антитромбином кофактор II гепарина сильнее ингибирует тромбин, но значительно слабее ингибирует фактор Ха и другие прокоагулянтные протеазы [55]. Основными мишенями С1-ингибитора являются факторы XIa, XIIa и калликреин [56-58], однако этот ингибитор может проявлять также и антифибринолитические свойства, так как способен ингибировать тканевой активатор плазминогена и плазмин [59, 60]. Протеаза нексин 1 значительно ингибирует активность тромбина, фактора XIa и в меньшей степени фактора Ха и так же, как С1-ингибитор, проявляет антифибринолитические свойства, ингибируя активность урокиназы и плазмина [61, 62]. Основными мишенями  $\alpha$ 1-антитрипсина, белка острой фазы воспаления, являются протеазы нейтрофилов, однако этот серпин также способен ингибировать факторы Ха и XIa [63, 64].

Протеин Z – это секретируемый клетками печени в плазму гликопротеин, содержащий домен, богатый остатками карбоксиглутаминовой кислоты, образующимися с участием витамина K. Протеин Z работает как кофактор, необходимый для активации протеин Z-зависимого ингибитора протеаз (PZPI), который относится к суперсемейству серпинов [65]. Комплекс протеина и PZPI является высокоэффективным ингибитором фактора Ха, в то время как свободный PZPI также обладает ингибиторной активностью по отношению к факторам IXa и XIa [66, 67].

Ингибитор пути тканевого фактора (TFPI) действует на сериновые протеазы каскада коагуляции и имеет несколько ингибиторных доменов Куниц-типа [68]. Важную роль в регуляции коагуляции играют две изоформы TFPI, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга: TFPI $\alpha$  и TFPI $\beta$ . TFPI $\alpha$  – это растворимый белок, циркулирующий в плазме крови, секретируемый тромбоцитами [69, 70]. TFPI $\beta$  экспрессируется на поверхности эндотелиальных клеток и моноцитов [71, 72]. TFPI $\alpha$  состоит из N-концевого участка, содержащего кислые аминокислотные остатки, трёх ингибиторных доменов Куниц-типа (K1-K3) и C-концевого участка с основными аминокислотными остатками, который может связываться с

глюкозаминогликанами и другими отрицательно заряженными полимерами [73, 74]. TFP1 $\beta$  состоит из N-концевого участка, содержащего кислые аминокислотные остатки, двух ингибиторных доменов Куниц-типа (K1, K2) и C-концевой последовательности для присоединения GPI-якоря, необходимого для прикрепления белка к мембране [75]. Обе изоформы ингибируют комплекс TF с фактором VIIa в присутствии фактора Ха, так как домен K2 отвечает за связывание фактора Ха, а домен K1 – за связывание фактора VIIa в комплексе с TF. Без связывания фактора Ха эффективное ингибирование фактора VIIa невозможно [76]. Изоформа TFP1 $\alpha$  также способна связывать протеин S за счёт K3-домена [73] и частично активированный фактор V за счёт C-концевого участка с основными аминокислотными остатками [77]. Связывание TFP1 $\alpha$  фактора V замедляет дальнейший протеолиз, необходимый для активации этого фермента, тем самым ингибируя каскад коагуляции на этапе протромбиназы. Для эффективного ингибирования в данном случае также необходимо связывание K2-доменом фактора Ха [78].

Системой, ответственной за прямое ингибирование тромбина, а также за инактивацию факторов Va и VIIa, является система мембранного белка тромбомодулина и витамин K-зависимых протеина C и протеина S. Тромбомодулин – это белок, экспрессирующийся на поверхности эндотелиальных клеток и являющийся рецептором для тромбина. Связывание тромбина с тромбомодулином индуцирует конформационные изменения, которые ингибируют протеолитическую активность тромбина в отношении факторов свёртывания и фибриногена, тем самым препятствуя коагуляции [79]. После изменения конформации тромбин, однако, становится протеолитически активным в отношении протеина C. Но ограниченный протеолиз протеина C может произойти только после связывания последнего со своим эндотелиальным рецептором (EPCR), то есть после формирования комплекса тромбин-тромбомодулин-протеин C-EPCR [80]. Активированный протеолизом протеин C способен осуществлять гидролиз определённых пептидных связей в факторах Va и VIIa, тем самым обеспечивая их инактивацию [81]. Протеолитическая активность

активированного протеина С в отношении упомянутых факторов усиливается в присутствии протеина S [82]. Помимо кофакторной функции к протеину С и кофакторной функции к TFPI, которая была описана выше, протеин S обладает также собственным антикоагулянтным эффектом, так как является ингибитором фактора IXa [83].

Протеин С является циркулирующей в плазме сериновой протеазой, и, как и для многих протеаз-участников или регуляторов процесса вторичного гемостаза, для него существует специфический серпин – ингибитор протеина С (РСІ). Будучи ингибитором протеина С, РСІ проявляет прокоагулянтную активность, однако этот серпин также способен проявлять антикоагулянтную активность, ингибируя тромбин, факторы Ха, XIa и калликреин [84]. Ингибиторная активность РСІ по отношению к тромбину значительно усиливается при связывании тромбина с тромбомодулином [85]. Компоненты противосвёртывающей системы и их мишени представлены на рис. 3.

#### *1.1.4. Система фибринолиза*

Центральным ферментом процесса фибринолиза является сериновая протеаза плазмин, которая секретируется в плазму гепатоцитами в виде неактивного предшественника плазминогена. Плазмин расщепляет фибрин и фибриноген до растворимых продуктов деградации. Эндогенными активаторами плазминогена являются сериновые протеазы – тканевой активатор плазминогена (tPA) и урокиназа (uPA). tPA секретируется клетками эндотелия и способен эффективно активировать плазминоген только после связывания с фибрином [86]. Секретируемая урокиназа и её мембранный рецептор (uPAR) экспрессируются в клетках эндотелия, гладкомышечных клетках, фибробластах, моноцитах, макрофагах [87]. Свободная урокиназа способна активировать циркулирующий в плазме свободный плазминоген, а связанная с uPAR урокиназа способна активировать плазминоген, связанный с мембранным рецептором плазминогена Plg-R<sub>KT</sub> [88].

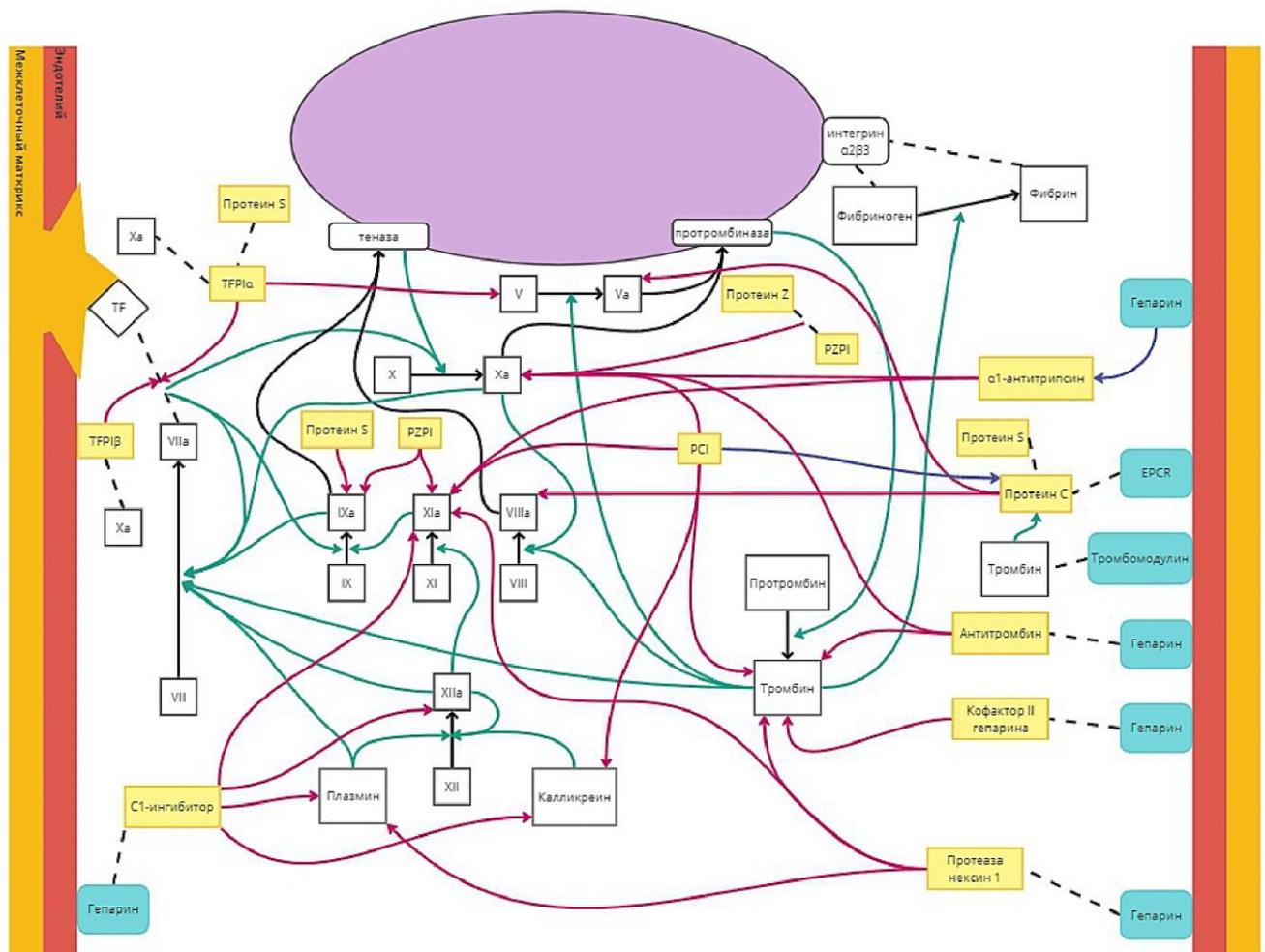


Рис. 3. Компоненты противосвёртывающей системы и их мишени

Для достижения необходимого баланса между формированием тромба при повреждении сосудистой стенки и процессом фибринолиза после заживления стенки сосуда существуют ингибиторы фибринолиза: ингибиторы активаторов пламиногена (PAI-1, PAI-2),  $\alpha 2$ -антиплазмин и активируемый тромбином ингибитор фибринолиза (TAFI) [89, 90]. PAI-1 – это серпин, экспрессируемый в разных типах клеток, включая эндотелиоциты, гладкомышечные клетки, фибробласты [91-93]. Циркулирующий в плазме PAI-1 секретируется из  $\alpha$ -гранул тромбоцитов [94]. PAI-2 – это так называемый «скрытый» серпин, который экспрессируется в моноцитах, гранулоцитах, эпителиальных и эндотелиальных клетках [95-97] и не секретируется во внешнюю среду, так как не имеет сигнальной последовательности для экзоцитоза [98]. Несмотря на это, данный серпин, скорее всего, принимает участие в регуляции фибринолиза *in vivo*, так как мыши,

нокаутные по гену PAI-2, страдают от тромбоза [99]. Серпин  $\alpha 2$ -антиплазмин секретируется в плазму крови гепатоцитами [100] и далее, благодаря деятельности трансглутаминазы, ковалентно связывается с фибрином, где инактивирует плазмин, активированный локализованным на фибрине tPA [101, 102]. Активируемый тромбином ингибитор фибринолиза (TAFI) секретируется в плазму гепатоцитами, активируется благодаря частичному протеолизу под действием тромбина в комплексе с тромбомодулином [103]. В активированном состоянии TAFI проявляет карбоксипептидазную активность и отщепляет С-концевые остатки лизина и аргинина у фибрина, чем снижает число доступных сайтов для связывания плазминогена и плазмينا, тем самым замедляя процесс фибринолиза [104]. Различные участники процесса фибринолиза представлены на рис. 4.

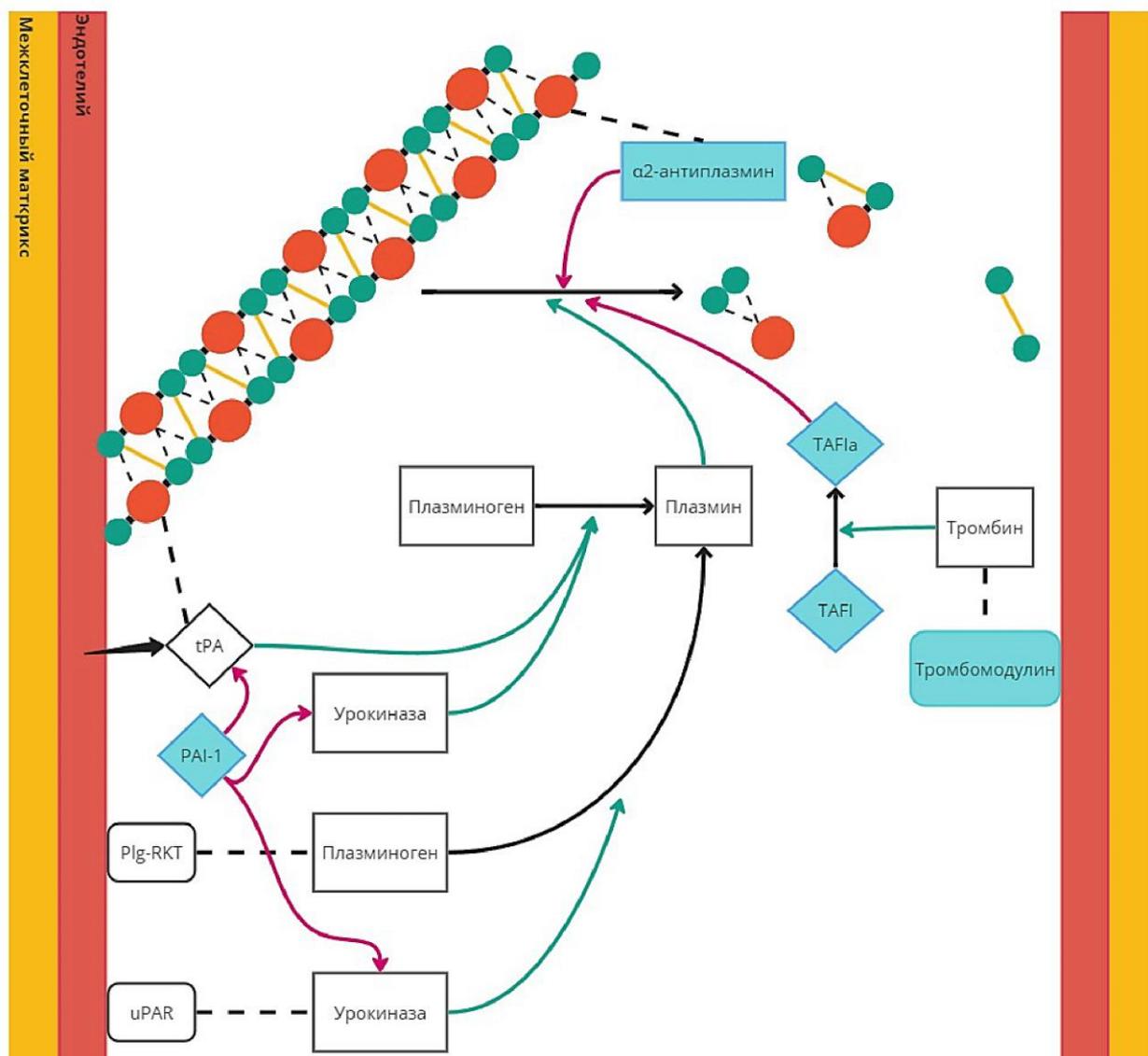


Рис. 4. Участники процесса фибринолиза

Тромбообразование является очень сложным многокомпонентным процессом, в котором участвует несколько десятков различных белков. Итогом данного процесса является формирование тромбоцитарного агрегата, поддерживаемого сшитыми тяжами фибрина. В норме размер тромба ограничивается только участком повреждённой стенки сосуда благодаря работе противосвёртывающей системы, а время существования тромба регулируется системой фибринолиза. Различные генетические, инфекционные, онкологические и аутоиммунные заболевания могут приводить к дисбалансу естественных антикоагулянтов и фибринолитиков по отношению к компонентам гемостаза, что приводит к избыточному формированию тромбов внутри сосудов и ингибированию их разрушения. В таких случаях необходим приём препаратов, ингибирующих первичный и/или вторичный гемостаз, а также активирующих тромболизис.

## *1.2. Противосвёртывающие и тромболитические препараты*

### *1.2.1. Препараты, препятствующие активации и агрегации тромбоцитов*

Препараты, препятствующие активации и агрегации тромбоцитов (таблица 1), можно разделить на несколько групп: вещества, ингибирующие активацию под действием тромбоксана А<sub>2</sub>, антагонисты пуринорецепторов,  $\alpha$ IIb $\beta$ III-интегринов и рецепторов коллагена. К препаратам, препятствующим активации тромбоцитов под действием тромбоксана А<sub>2</sub>, относятся ингибиторы циклооксигеназы. Одним из самых известных ингибиторов циклооксигеназы является аспирин. Аспирин широко используется для предотвращения вторичных артериальных тромбозов, а также в постинфарктной и постинсультной терапии, хотя его эффективность как профилактического препарата, предупреждающего развитие сердечно-сосудистых заболеваний не доказана [105, 106]. Более того, регулярный предварительный приём аспирина может увеличить риск развития инфаркта миокарда, что называется «аспириновым парадоксом» или «аспириновой дилеммой». Также аспирин может вызывать нежелательные побочные эффекты, такие как кровотечения и осложнения со стороны пищеварительной системы.

Таблица 1. Препараты, препятствующие активации и агрегации тромбоцитов

Название	Действие	Побочные эффекты
Аспирин	Ингибитор циклооксигеназы	Кровотечения, осложнения с ЖКТ, риск инфаркта миокарда
Клопидогрел	Необратимый ингибитор P2Y <sub>12</sub> -рецептора	Кровотечения
Прасугрел	Необратимый ингибитор P2Y <sub>12</sub> -рецептора	Кровотечения
Тикагрелор	Обратимый ингибитор P2Y <sub>12</sub> -рецептора	Кровотечения
Кангрелор	Обратимый ингибитор P2Y <sub>12</sub> -рецептора	Кровотечения
Абциксимаб	Антагонист αIIbβ3-интегринов	Кровотечения, тромбоцитопения
Тирофибан	Антагонист αIIbβ3-интегринов	Кровотечения, тромбоцитопения
Эптифибатид	Антагонист αIIbβ3-интегринов	Кровотечения, тромбоцитопения
Антитела к гликопротеину VI	Блокатор рецептора коллагена тромбоцитов	Возможно усиление свертывания крови

Антагонисты метаботропных пуринорецепторов P2Y<sub>12</sub> блокируют активацию тромбоцитов под действием АДФ, выделяющегося при экзоцитозе содержимого плотных гранул. Применяемые в медицинской практике антагонисты P2Y<sub>12</sub>-рецептора можно разделить на две группы, исходя из их химического строения, – тиенопиридины и прочие. Тиенопиридины – это необратимые ингибиторы P2Y<sub>12</sub>-рецептора. Так как тромбоциты являются фрагментами мегакариоцитов и не имеют собственного ядра, нефункциональные пуринорецепторы не могут быть заменены новосинтезированными, поэтому

действие тиенопиридинов на тромбоцит продолжается на протяжении всего времени его существования. Подобное действие тиенопиридинов может приводить к нежелательным побочным эффектам в виде кровотечений. Примерами тиенопиридинов являются препараты для перорального приёма клопидогрел и прасугрел. Действие клопидогрела развивается достаточно медленно, так как для его конверсии в активный метаболит, являющийся ингибитором P2Y<sub>12</sub>-рецептора, необходимы модификации, осуществляемые системой цитохромов P<sub>450</sub> в печени. В отличие от клопидогрела, прасугрелу не нужна дополнительная активация при попадании в организм [107]. В медицинской практике также используются обратимые ингибиторы P2Y<sub>12</sub>-рецепторов нетиенопиридиновой природы – тикагрелор и кангрелор. Эти препараты вводятся внутривенно и высоко эффективны, например, при лечении острого коронарного синдрома, однако так же, как и тиенопиридины, могут приводить к возникновению кровотечений [108]. Следует также отметить, что для предотвращения тромбообразования зачастую используется двойная антитромбоцитарная терапия, подразумевающая приём пациентом одновременно аспирина и ингибитора P2Y<sub>12</sub>-рецепторов.

Антагонисты  $\alpha$ IIb $\beta$ III-интегринов (абциксимаб, тирофибан, эптифибатид) блокируют взаимодействие тромбоцитов с фибриногеном, чем ингибируют агрегацию тромбоцитов. Абциксимаб – это химерное моноклональное антитело с Fab-фрагментом мыши и Fc-фрагментом человека. Абциксимаб специфичен к определённому мотиву  $\beta$ III-субъединицы, но проявляет кросс-реактивность к интегринам  $\alpha$ V $\beta$ III и  $\alpha$ M $\beta$ II, из-за чего оказывает также противовоспалительные эффекты [109]. Эптифибатид – это циклический гептапептид, а тирофибан – низкомолекулярный ингибитор непептидной природы. Побочные эффекты антагонистов  $\alpha$ IIb $\beta$ III-интегринов заключаются в кровотечениях и тромбоцитопении. Однако тирофибан и эптифибатид обладают очень коротким периодом полужизни, поэтому нежелательные эффекты от их приёма быстро обращаются [108, 110].

Перспективной мишенью для разработки противосвёртывающих препаратов является рецептор коллагена гликопротеин VI, антагонисты которого способны

предотвратить активацию и агрегацию тромбоцитов, а также обладают противовоспалительным эффектом. Данный рецептор экспрессируется исключительно в мегакариоцитах и тромбоцитах, что делает действие его ингибиторов селективным. Более того, применение антагонистов гликопротеина VI не приводит к кровотечениям, в отличие от большинства противосвёртывающих препаратов [111]. Блокируют связывание гликопротеина VI с коллагеном специфические моноклональные антитела к гликопротеину VI. Однако в мембране тромбоцитов гликопротеин VI образует комплекс с Fc-рецептором, поэтому использование антител будет способствовать олигомеризации описанных комплексов вследствие активации Fc-рецептора. Олигомеризация комплексов гликопротеин VI-Fc-рецептор – это один из начальных этапов активации сигнальных процессов в тромбоцитах, таким образом, применение антител может оказать на свёртывание противоположный эффект. В связи с этим для терапевтического использования разрабатывают препараты на основе Fab- и scFv-фрагментов специфических антител [112, 113].

### *1.2.2. Антикоагулянты*

Антикоагулянтами принято называть вещества, ингибирующие вторичный гемостаз и/или активирующие компоненты противосвёртывающей системы. Среди распространённых в медицинской практике антикоагулянтов следует выделить четыре группы: гепарин и гепарин-подобные препараты, кумарины и индандионы, ингибиторы фактора Ха, ингибиторы тромбина (таблица 2). Также нельзя не упомянуть разработку лекарственных препаратов, содержащих рекомбинатные белки противосвёртывающей системы.

Гепарин – сульфатированный полисахарид, состоящий из остатков глюкуроновой кислоты и N-ацетил-глюкозамина, – это антикоагулянт для парэнтерального применения, который впервые был использован ещё в первой половине XX века [114]. В организме гепарин секретируется из активированных тучных клеток, например, при аллергических реакциях. Гепарин ингибирует вторичный гемостаз, так как активирует антитромбин и прочие серпины [108]. Гепарин применяется при различных заболеваниях, приводящих к тромбозам

артерий и вен, однако имеет побочные эффекты в виде кровотечений, тромбоцитопении. Более того, доза принимаемого гепарина требует строгого контроля, так как активированные тромбоциты выделяют фактор PF4, который нейтрализует антикоагулянтное действие гепарина.

Низкомолекулярные гепарины – небольшие фрагменты гепарина со средней молекулярной массой 5 кДа – обладают рядом преимуществ перед гепарином. Они имеют более долгий период полужизни, более лабильны и эффективны вследствие небольшого по сравнению с гепарином размера. Риск кровотечений и тромбоцитопении при приёме низкомолекулярных гепаринов также ниже, чем при приёме гепарина. Однако выведение низкомолекулярных гепаринов из организма происходит через почки, поэтому приём этих препаратов при почечной недостаточности не рекомендован [108].

Кумарины и индандионы – это ингибиторы витамин К-эпоксид-редуктазы, фермента, необходимого, для процессинга протромбина, витамин К-зависимых факторов свёртывания (VII, IX, X), а также протеина C, протеина S и протеина Z. Эти белки содержат в своём составе домен Gla, обогащённый остатками карбоксиглутаминовой кислоты. Карбоксилирование глутаминовой кислоты происходит посттрансляционно ферментом  $\gamma$ -глутамил-карбоксилазой с участием витамина К в качестве кофактора. В процессе реакции витамин К окисляется до эпоксида и для дальнейшего использования должен быть восстановлен витамин К-эпоксид-редуктазой. Ингибиторы витамин К-эпоксид-редуктазы препятствуют регенерации кофактора, необходимого для карбоксилирования глутаминовой кислоты, таким образом, нарушая процессинг факторов свёртывания. Одним из самых известных кумаринов является варфарин. Он хорошо растворим в воде и принимается перорально. Действие варфарина начинается не сразу после приёма, так как циркулирующие в крови факторы свёртывания представляют собой уже процессированные белки с остатками карбоксиглутаминовой кислоты, а варфарин действует лишь на процесс созревания белков в гепатоцитах, предшествующий их секреции в плазму [115]. Побочными эффектами варфарина являются кровотечения и невозможность употребления при беременности, так как варфарин

проходит через плацентарный барьер. Кроме того, ингибиторы витамин К-эпоксид-редуктазы могут вызывать дисбаланс естественных антикоагулянтов, так как они нарушают процессинг протеина С, протеина S и протеина Z.

Таблица 2. Антикоагулянты

<b>Название</b>	<b>Действие</b>	<b>Побочные эффекты</b>
Гепарин и гепарин-подобные препараты	Активация антитромбина и других серпинов	Кровотечения, тромбоцитопения
Варфарин (кумарин)	Ингибитор витамин К-эпоксид-редуктазы	Кровотечения, противопоказан при беременности, дисбаланс естественных антикоагулянтов
Фондапаринукс	Ингибитор фактора Ха	Кровотечения
Ривароксабан	Ингибитор фактора Ха	Кровотечения
Апиксабан	Ингибитор фактора Ха	Кровотечения
Эндоксабан	Ингибитор фактора Ха	Кровотечения
Бивалирудин	Ингибитор тромбина	Кровотечения
Аргатробан	Ингибитор тромбина	Кровотечения
Дабигатрана этексилат	Ингибитор тромбина	Кровотечения
АТryn	Рекомбинантный антитромбин	-
Рекомбинантные серпины	Ингибирование прокоагулянтных протеаз	Ингибирование антикоагулянтных протеаз
Рекомбинантный активированный протеин С	Восполнение недостатка протеина С	-

Среди ингибиторов фактора Ха достаточно широко распространены фондапаринукс, ривароксабан, апиксабан и эндоксабан. Фондапаринукс – это синтетический пентасахарид, связывающийся с антитромбином и способствующий ингибированию антитромбином фактора Ха, но не тромбина. Фондапаринукс принимают перорально для лечения острого коронарного синдрома и тромбоэмболии после хирургических вмешательств [116]. Ривароксабан, апиксабан и эндоксабан относятся к группе новых оральных антикоагулянтов (НОАК), преимущества которых заключаются в быстром эффекте и непродолжительном периоде полужизни. Недостатком НОАК по-прежнему является риск кровотечений, хотя риск внутричерепных кровотечений при приёме ингибиторов фактора Ха ниже, чем при приёме других антикоагулянтов [117].

Применяемые в медицинской практике ингибиторы тромбина можно разделить на парэнтеральные и пероральные. К парэнтеральным ингибиторам относятся бивалирудин, аргатробан. Бивалирудин – это синтетический пептид, состоящий из 20 аминокислотных остатков, являющийся аналогом гирудина медицинской пиявки. N-концевая последовательность бивалирудина связывается с активным сайтом тромбина, а С-концевая – с субстрат-связывающим доменом. Аргатробан – низкомолекулярное производное аргинина, обратимо ингибирующее тромбин. Пероральные ингибиторы тромбина относятся к группе НОАК, самым известным среди них является низкомолекулярное вещество дабигатрана этексилат. Побочным эффектом для всех применяемых сейчас ингибиторов тромбина является риск кровотечений [108].

Среди препаратов, содержащих рекомбинантные белки противосвёртывающей системы, наиболее перспективными являются серпины и белки системы протеина С. В настоящее время для терапии, а также в различных клинических и доклинических исследованиях, связанных с тромботическими состояниями, используется рекомбинантный антитромбин АТryn [118]. Недостатки использования остальных серпинов связаны с их широкой субстратной специфичностью, которая приводит к ингибированию как прокоагулянтных, так и антикоагулянтных протеаз. Для решения этой проблемы с помощью генетической

инженерии получают серпины, в которых произведены определённые аминокислотные замены, сужающие субстратную специфичность серпина до конкретной сериновой протеазы. Так, замены некоторых аминокислотных остатков в  $\alpha 1$ -антитрипсине привели к получению серпина, специфичного к калликреину. Этот серпин показал свою эффективность на модели артериального тромбоза мышей [119].

Рекомбинантный активированный протеин С используется в клинической практике при дефиците этого компонента противосвёртывающей системы, а также при ДВС-синдроме (синдроме диссеминированного внутрисосудистого свёртывания), который часто сопровождает сепсис [120]. Помимо этого, существуют препараты на основе рекомбинантных белков, которые активируют эндогенный протеин С, например, препарат АВ002. Это рекомбинантный аналог тромбина, который не обладает его прокоагулянтными свойствами, но может связываться с тромбомодулином и осуществлять ограниченный протеолиз протеина С [121].

### *1.2.3. Фибринолитики*

#### *1.2.3.1. Непрямые фибринолитики*

История фибринолитической или тромболитической терапии уходит корнями ещё в первую половину двадцатого века: в 1933 году впервые было обнаружено, что вещества, выделяемые гемолитическим стрептококком, способны разрушать тромбы [122]. Первое применение стрептокиназы в клинике относится к 1947 году [123]. Стрептокиназа, как и урокиназа, относится к фибринолитикам первого поколения [2]. Однако, в отличие от урокиназы, стрептокиназа не может сразу напрямую осуществлять ограниченный протеолиз плазминогена, поэтому относится к так называемым непрямым активаторам плазминогена. При попадании в плазму стрептокиназа формирует комплекс с плазминогеном в соотношении 1:1, и только в таком комплексе проявляет протеолитическую активность по отношению к другим молекулам плазминогена [124]. Основными недостатками стрептокиназы являются её иммуногенность из-за бактериального происхождения и отсутствие сайта связывания фибрина, из-за чего активация плазминогена

происходит не на поверхности или внутри тромба, а в плазме крови, что не является эффективным, а также может привести к фибриногеновой недостаточности и последующим проблемам со свёртыванием, так как плазминоген способен расщеплять не только фибрин, но и фибриноген [125].

Урокиназа представляет собой фермент с четвертичной структурой, состоящий из двух полипептидных цепей, которые образуются при процессинге единого полипептида – проурокиназы. Недостатки урокиназы заключаются в её небольшом времени полужизни в плазме крови, ингибировании серпинами PAI-1, PAI-2, протеазой нексином 1, а также отсутствии сайта связывания фибрина [126]. Один из этих недостатков, а именно отсутствие сайта связывания фибрина, не является характеристикой проурокиназы, которая относится к фибринолитикам второго поколения [127]. Несмотря на это, остальные недостатки урокиназы присущи и проурокиназе.

Другим фибринолитиком второго поколения является рекомбинантный tPA, называемый алтеплазой. Алтеплаза осуществляет активацию плазминогена, будучи связанной с фибрином, однако имеет небольшое время полужизни и ингибируется серпинами PAI-1, PAI-2 и протеазой нексином 1 [126]. Большая часть фибринолитиков третьего поколения является модифицированными с помощью технологий генетической инженерии вариантами алтеплазы. Внесение определённых мутаций позволило увеличить время полужизни и специфичность связывания с фибрином у ретеплазы и тенектеплазы, которые используются для терапии тромбозов разного генеза. Также были разработаны и другие модифицированные варианты алтеплазы (дутеплаза, монтеплаза, ланотеплаза, памитеплаза, амедиплаза), которые обладают увеличенным временем полужизни и более устойчивы к действию ингибиторов [128].

К фибринолитикам третьего поколения также относятся два фермента, не являющиеся модификациями человеческого tPA: десмотеплаза из слюны кровососущих летучих мышей и бактериальная стафилокиназа. Десмотеплаза является прямым активатором плазминогена, имеет сайт связывания фибрина, обладает значительным временем полужизни, устойчива к ингибиторам, а также

эффективно ингибируется транексамовой кислотой, которая может быть использована для предотвращения осложнений в виде кровотечений [129]. Недостатком десмотеплазы является иммуногенность для человека. Стафилокиназа, подобно стрептокиназе, является непрямым активатором плазминогена, и показала себя более эффективной, чем алтеплаза, в ряде клинических исследований [3]. Однако стафилокиназа иммуногенна для человека, обладает не очень большим временем жизни, её комплекс с плазминогеном может быть инактивирован  $\alpha$ 2-антиплазмином [127].

Помимо активаторов плазминогена, для эффективного фибринолиза можно использовать ингибиторы серпинов, инактивирующих активаторы плазминогена, например, ингибиторы PAI-1 тилактинин [130] и TM5275 [131]. Это низкомолекулярные вещества синтетического происхождения, эффективность использования которых была доказана на различных моделях тромбозов у животных [130, 131]. Однако данные молекулы пока не были включены в клинические испытания, так как предполагается, что они могут ингибировать только свободный PAI-1, но не связанный в комплекс с плазменным белком витронектином [132]. Краткая информация о непрямах фибринолитиках представлена в таблице 3.

#### *1.2.3.2. Прямые фибринолитики*

Прямые фибринолитики – это ферменты, разрушающие определённые пептидные связи в молекуле фибрина. Они имеют некоторые преимущества перед непрямыми фибринолитиками, например, в большинстве случаев не приводят к фибриногеновой недостаточности, так как не расщепляют фибриноген, и не вызывают побочных эффектов в виде кровотечений [133]. К прямым фибринолитикам (таблица 4) относятся плазмин, мини-плазмин, микро-плазмин, дельта-плазмин, алфимепраза, лебетаза, лумброкиназа, сerraпептаза, наттокиназа [127].

Таблица 3. Непрямые фибринолитики

Название	Действие	Особенности
Стрептокиназа	Непрямой активатор плазминогена	Иммуногенность, отсутствие сайта связывания фибрина
Урокиназа	Активатор плазминогена	Отсутствие сайта связывания фибрина, небольшое время полужизни, ингибирование протеазой нексином 1, PAI-1, PAI-2
Проурокиназа	Активатор плазминогена	Небольшое время полужизни, ингибирование протеазой нексином 1, PAI-1, PAI-2
Алтеплаза	Рекомбинантный tPA (активатор плазминогена)	Небольшое время полужизни, ингибирование протеазой нексином 1, PAI-1, PAI-2
Модификации алтеплазы (ретеплаза, тенектеплаза, дутеплаза, монтеплаза, ланотеплаза, памитеплаза, амедиплаза)	Рекомбинантный tPA (активатор плазминогена)	Большое время полужизни, малая чувствительность к ингибиторам

Десмотеплаза	Рекомбинантный белок слюны кровососущих летучих мышей (активатор плазминогена)	Большое время полужизни, малая чувствительность к ингибиторам, эффективно ингибируется транексамовой кислотой. Иммуногенность
Стафилокиназа	Непрямой активатор плазминогена	Более эффективна, чем алтеплаза. Иммуногенность, небольшое время полужизни, инактивируется $\alpha$ 2-антиплазмином
Типлакстинин	Ингибитор PAI-1	Предположительно ингибирует только свободный PAI-1
TM5275	Ингибитор PAI-1	Предположительно ингибирует только свободный PAI-1

Таблица 4. Прямые фибринолитики

Название	Описание	Особенности
Плазмин	Стандартный фермент человека	Инактивируется $\alpha$ 2-антиплазмином
Мини- плазмин	Рекомбинантная укороченная форма плазмина	Хуже плазмина ингибируется $\alpha$ 2-антиплазмином, ингибируется $\alpha$ 2-макроглобулином
Микро- плазмин	Рекомбинантная укороченная форма плазмина	Гораздо хуже плазмина ингибируется $\alpha$ 2- антиплазмином, ингибируется $\alpha$ 2-макроглобулином

Дельта-плазмин	Модификация плазмينا	Имеет сайт связывания фибрина, эффективность сравнима с плазмином. Инактивируется $\alpha 2$ -антиплазмином и $\alpha 2$ -макроглобулином
Алфимепраза	Рекомбинантный аналог фибролазы змеи <i>Agkistrodon contortrix contortrix</i> , цинк-зависимая металлопротеаза $\alpha$ -фибриногеназа	Нет сайта связывания плазмينا, быстро ингибируется $\alpha 2$ -макроглобулином, вызывает гипотензию
Лебетаза	Металлопротеаза из яда змеи <i>Vipera lebetina</i> с $\alpha$ - и $\beta$ -фибриногеназными активностями	Способна ингибировать АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов, ингибируется $\alpha 2$ -макроглобулином
Лумброкиназа	Сериновая протеаза червя <i>Lumbricus rubellus</i> , обладает прямой фибринолитической и активаторной к плазминогену активностями	Кардиопротекторные и противовоспалительные свойства. Слабее ингибируется $\alpha 2$ -макроглобулином
Серрапептаза	Цинк-зависимая сериновая металлопротеаза бактерии <i>Serratia sp. E-15</i>	Сильный фибринолитический эффект. Выраженные противовоспалительные и ранозаживляющие свойства
Наттокиназа	Сериновая протеаза бактерии <i>Bacillus subtilis</i>	Очень большое время полужизни, способна расщеплять и дезактивировать PAI-1. Более высокая фибринолитическая активность, чем у плазмينا

Плазмин является основной фибринолитической протеазой человека и применяется, в основном, при непосредственной доставке к месту расположения тромба катетером. При таком способе доставки подавляющая часть молекул плазмина оказывается сразу внутри тромба, где осуществляет эффективный фибринолиз. При выходе из тромба в кровоток большая часть молекул плазмина инактивируется  $\alpha 2$ -антиплазмином, что предотвращает развитие кровотечений [134]. Мини-плазмин – это получаемая с помощью генетических технологий молекула, представляющая собой фрагмент плазмина. Данный вариант в два раза хуже ингибируется  $\alpha 2$ -антиплазмином, однако довольно эффективно ингибируется универсальным ингибитором протеаз  $\alpha 2$ -макроглобулином [135, 136]. Микроплазмин – другой укороченный вариант плазмина, который не имеет сайта связывания фибрина, в 100 раз хуже плазмина ингибируется  $\alpha 2$ -антиплазмином, но всё ещё ингибируется  $\alpha 2$ -макроглобулином [137]. Дельта-плазмин имеет сайт связывания фибрина, эффективно ингибируется упомянутыми выше ингибиторами, и в *in vitro* исследованиях показал эффективность фибринолиза, сравнимую с таковой у плазмина [138].

Алфимепраза – это рекомбинантный аналог фермента фибролазы змеи *Agkistrodon contortrix contortrix*. Алфимепраза является цинк-зависимой металлопротеазой из семейства  $\alpha$ -фибриногеназ, то есть расщепляет определённую пептидную связь в полипептиде A $\alpha$  в составе фибриногена [139]. Алфимепраза не содержит сайта связывания фибрина, но, несмотря на это, способствует разрушению тромбов в различных моделях тромбозов животных [140-142]. Недостатки алфимепразы состоят в её быстром ингибировании  $\alpha 2$ -макроглобулином, а также способностью вызывать гипотензию из-за расщепления низкомолекулярного кининогена до брадикинина [143].

Лебетаза – это металлопротеаза, выделенная из яда змеи *Vipera lebetina*, проявляющая  $\alpha$ - и  $\beta$ -фибриногеназную активность [144]. Последовательность зрелой формы лебетазы на 63% идентична последовательности фибролазы *Agkistrodon contortrix contortrix* [145]. Преимуществом лебетазы является

способность ингибировать агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ [146], а недостатком – ингибирование под действием  $\alpha$ 2-макроглобулина [147].

Лумброкиназа – это сериновая протеаза червя *Lumbricus rubellus*, которая обладает одновременно прямой фибринолитической и активаторной к плазминогену активностями [148, 149]. Помимо фибринолитических свойств, фермент также обладает кардиопротекторными и противовоспалительными характеристиками, что было показано на модели ишемии-реперфузии миокарда у крыс [150]. Активность лумброкиназы *in vitro* снижается на 65% в присутствии  $\alpha$ 2-макроглобулина, но при добавлении в реакционную смесь плазмы ингибирование составляет лишь 30% [151].

Серрапептаза – это цинк-зависимая сериновая металлопротеаза бактерии *Serratia sp.* E-15, выделенной из кишечника шелкопряда [152]. Позже были выделены изоформы серрапептазы из других представителей рода *Serratia*. *In vitro* исследования показали, что серрапептаза расщепляет тромб на 38% за 3 часа, что превосходит фибринолитический эффект стрептокиназы [153]. Помимо фибринолитической активности, серрапептаза обладает также выраженными противовоспалительными и ранозаживляющими свойствами [4].

Наттокиназа – сериновая протеаза, продуцируемая бактерией *Bacillus subtilis*, выделенная из традиционного японского ферментированного блюда под названием натто [154]. Доказано, что после перорального приёма наттокиназа обнаруживается в кровотоке [155], где может расщеплять тромбы благодаря своей фибринолитической активности, что продемонстрировано в ряде доклинических [156] и клинических испытаний [5, 157]. Наттокиназа обладает очень большим временем полужизни и может оставаться активной до 12 часов [158]. Наттокиназа способна расщеплять и дезактивировать серпин PAI-1 [159], а также проявляет более высокую фибринолитическую активность, чем плазмин [158].

Итак, тромботические состояния, обычно являющиеся следствием дисбаланса естественных прокоагулянтных и антикоагулянтных факторов, связаны с избыточным образованием тромбов внутри сосудов. Для лечения таких состояний обычно применяют несколько разных лекарственных препаратов:

антиагрегант и/или антикоагулянт для предотвращения образования новых тромбов и фибринолитик для разрушения уже существующих. Многие используемые в медицинской практике антиагреганты и антикоагулянты имеют нежелательные побочные эффекты, что создаёт необходимость в разработке новых лекарственных препаратов. Разрабатываемые на данный момент противосвёртывающие препараты, в основном, являются рекомбинантными ферментами или антителами, регулирующими функционирование тромбоцитов или компонентов каскада коагуляции. Производство таких белков является дорогостоящим и трудозатратным. Стоит также отметить, что применяемые сейчас на практике фибринолитики также являются рекомбинантными белками. Таким образом, современная эффективная терапия тромбозов является довольно дорогостоящей и подразумевает сложную схему лечения пациента с применением нескольких препаратов. Возможным вариантом для устранения этих недостатков является поиск новых ферментов, проявляющих одновременно и антикоагулянтные, и фибринолитические свойства. Источниками таких ферментов могут быть микроорганизмы.

### *1.3. Микро- и макромицеты как перспективные продуценты антикоагулянтных и фибринолитических ферментов*

Для эффективного освоения среды обитания грибы секретируют целый ряд химических веществ, включающих в себя гидролитические ферменты и вторичные метаболиты. Особым разнообразием среди секретируемых гидролаз отличаются протеазы, так как многообразие белков живых организмов, которые потенциально могут быть использованы как питательные субстраты, очень велико. Среди белков, расщепляемых грибными протеазами, могут быть и белки системы гемостаза, в том числе фибриноген и фибрин, а также компоненты каскада коагуляции и противосвёртывающей системы, протеолитическое расщепление которых может приводить как к активации, так и к инактивации.

Бактерии известны своей способностью продуцировать ферменты, обладающие тромболитической активностью, что было показано в разделах 1.2.3.1 и 1.2.3.2 настоящего обзора литературы. Так как грибные продуценты

гидролитических ферментов обладают большим по сравнению с бактериями разнообразием секретируемых протеаз [6, 7], поиск новых кандидатов для разработки фармакологических препаратов целесообразно проводить именно среди секретируемых протеаз микромицетов. Тромболитический потенциал некоторых представителей отделов *Mucoromycota*, *Ascomycota* и *Basidiomycota* уже был исследован (таблица 5), что будет продемонстрировано в последующих разделах обзора литературы.

### 1.3.1. Продуценты антикоагулянтов

*Trichothecium roseum* – аскомицет из семейства *Myrotheciomycetaceae*, секретирует во внешнюю среду пять протеаз, смесь которых (препарат Трихолизин) проявляет антикоагулянтные, активаторные к плазминогену и фибрин(оген)олитические свойства [10]. Антикоагулянтные свойства проявляются в сильном увеличении времени свёртывания [160]. Препарат прошёл доклинические и клинические испытания, оказался нетоксичным и был рекомендован для лечения тромбозов разного генеза [161].

*Pleurotus ferulae* – гриб из семейства *Pleurotaceae* отдела *Basidiomycota*. Продуцируемая им протеаза обладает антикоагулянтными и фибрин(оген)олитическими свойствами. Антикоагулянтные свойства проявлялись в увеличении активированного частичного тромбопластинового времени и протромбинового времени при добавлении в плазму фермента. Также было показано, что протеаза способна расщеплять тромбин. Фибриногенолитическая активность проявлялась в гидролизе А $\alpha$ - и В $\beta$ -цепей фибриногена, а также в гидролизе  $\gamma$ -цепей с меньшей скоростью. Фибринолитическая активность была показана с помощью метода фибриновых пластин. Протеаза *Pleurotus ferulae* имеет молекулярную массу 20 кДа, проявляет максимальную активность при 50°С, рН 4,0, 5,0 и 8,0 [11].

*Boletus pseudocalopus* – гриб из семейства *Boletaceae* отдела *Basidiomycota*. Антикоагулянтные свойства его протеазы заключаются в увеличении активированного частичного тромбопластинового времени и протромбинового времени при добавлении в плазму фермента. Протеаза также способна подавлять

активность тромбина и фактора Ха и расщеплять фибрин. Фермент массой 63,5 кДа, скорее всего, является сериновой протеазой и имеет оптимум активности при 40°C, pH 7,0 [12].

*Agrocybe aegerita* – гриб из семейства *Strophariaceae* отдела *Basidiomycota*. Продуцируемая им протеаза проявляет сразу антикоагулянтные, активаторные к плазминогену и фибрин(оген)олитические свойства. Антикоагулянтные свойства были показаны *in vitro*: плазма крови, содержащая все необходимые элементы для свёртывания, не сворачивалась в присутствии грибной протеазы даже в течение 24 часов, в то время как свёртывание в контрольной пробе произошло за 509 секунд. Помимо этого, была также показана способность упомянутой протеазы расщеплять тромбин. Активаторная к плазминогену и фибринолитическая активности для обсуждаемой протеазы были показаны с помощью метода фибриновых пластин. Также была обнаружена фибриногенолитическая активность, сходная с таковой плазмينا: быстрее всего фермент расщеплял А $\alpha$ -цепи фибриногена, со средней скоростью – В $\beta$ -цепи и с маленькой скоростью –  $\gamma$ -цепи фибриногена. Протеаза *Agrocybe aegerita* является гетеродимерной сериновой протеазой (молекулярные массы цепей 31,4 и 21,2 кДа), проявляющей максимальную активность при 47°C, pH 7,6 в присутствии некоторых ионов [13].

*Neurospora crassa* – представитель семейства *Sordariaceae* отдела *Ascomycota*, микромицет, являющийся модельным объектом в генетических исследованиях. Протеаза *Neurospora crassa* проявляет антикоагулянтные, фибринолитические и фибриногенолитические свойства. Антикоагулянтные свойства были показаны *in vitro*: плазма крови, содержащая все необходимые элементы для свёртывания, не сворачивалась в присутствии грибной протеазы за время, характерное для контрольной пробы, и даже за время сворачивания плазмы в присутствии гепарина. Фибриногенолитическая активность проявлялась в расщеплении А $\alpha$ -, В $\beta$ - и  $\gamma$ -цепей фибриногена. Очищенный фермент *Neurospora crassa* представляет собой сериновую протеазу массой 32 кДа, проявляющую максимальную активность при 40°C, pH 7,4 в присутствии некоторых ионов [14].

### 1.3.2. Продуценты активаторов плазминогена

Все известные продуценты активаторов плазминогена также являются продуцентами фибрин(оген)олитических ферментов, что свидетельствует либо о секреции нескольких дополняющих друг друга ферментов одним продуцентом, либо о наличии различных активностей у выделяемых протеаз [162]. Одним из первых ферментных препаратов, содержащих протеазу-активатор плазминогена, был Лонголитин, полученный из культуральной жидкости *Arthrotrys longa*, аскомицета из семейства *Orbiliaceae*. Этот ферментный препарат представляет собой смесь из шести белков, один из которых оказался фибринолитически активным. Это была сериновая протеаза массой 28,6 кДа, проявляющая максимальную активность при 37°C, pH 6,0-9,0 [163]. Ферментный препарат был протестирован на различных животных моделях тромбозов и рекомендован в качестве перорального тромболитического средства [164].

*Schizophyllum commune* – ксилотрофный гриб из семейства *Schizophyllaceae* отдела *Basidiomycota*, продуцирует металлопротеазу массой 17 кДа. Активаторная к плазминогену и фибринолитическая активности были продемонстрированы методом фибриновых пластин. Оптимум работы фермента составляет 45°C, pH 4,0-6,0 [165].

*Hericium erinaceum* – гриб семейства *Hericiaceae* отдела *Basidiomycota*. Продуцируемый им фермент получил название хериназа. Протеаза проявляет фибрино- и фибриногенолитическую активность, расщепляя А $\alpha$ - и  $\gamma$ -цепи фибриногена. Активация плазминогена хериназой, скорее всего, происходит по tPA-подобному механизму, так как фермент эффективно расщепляет хромогенный пептидный субстрат tPA. Хериназа имеет молекулярную массу 51 кДа, проявляет максимальную активность при 30°C, pH 7,0 в присутствии некоторых ионов [166].

*Rhizopus microsporus var. tuberosus* – представитель семейства *Rhizopodaceae* отдела *Mucoromycota*, микроорганизм используемый для получения некоторых традиционных китайских ликёров и уксусов. Продуцируемая им протеаза проявляет активаторные к плазминогену и фибринолитические свойства, что было показано при помощи метода фибриновых пластин. Фермент имеет массу 24,5 кДа,

проявляет максимальную активность при 37°C, pH 7,0 в присутствии некоторых ионов [167]. Другой микромицет того же рода *Rhizopus chinensis* 12 выделяет фибринолитическую протеазу с активаторными к плазминогену и фибринолитическими свойствами, которые проявляются в расщеплении А $\alpha$ -, В $\beta$ - и  $\gamma$ -цепей фибриногена. Оптимальные условия фибринолитической активности 45°C, pH 6,8-8,8 [168].

*Tolyposcladium inflatum* – представитель семейства *Ophiocordycipitaceae* отдела *Ascomycota*, используемый в биотехнологии как продуцент циклоспоринов. В настоящее время изучены два штамма-продуцента активаторных и фибринолитических протеаз этого вида: *Tolyposcladium inflatum* k1 и *Tolyposcladium inflatum* 62A. *Tolyposcladium inflatum* k1 секретирует по меньшей мере две протеазы, одна из которых обладает только активаторной к плазминогену, а вторая – и активаторной, и фибринолитической активностями. Фермент, проявляющий только активаторную активность, является сериновой тиол-зависимой ЭДТА-чувствительной протеазой [169]. Препарат внеклеточных протеаз *Tolyposcladium inflatum* k1 проявляет максимальную активность при 37°C, pH 8,0 [170]. Препарат внеклеточных протеаз *Tolyposcladium inflatum* 62A проявляет максимальную активность при 37°C, pH 6,0-7,0 и обладает выраженной плазминоподобной активностью, обнаруженной в реакции со специфическим хромогенным пептидным субстратом плазмина [171].

*Neurospora sitophila* – представитель семейства *Sordariaceae* отдела *Ascomycota*, выделяет протеазу с активаторными к плазминогену, фибринолитическими и фибринолитическими свойствами. Активаторный к плазминогену и фибринолитический эффекты были показаны при помощи метода фибриновых пластин. Также отдельно была продемонстрирована способность осуществлять протеолитическую деградацию всех цепей фибриногена: А $\alpha$ -цепей – с наибольшей скоростью, со средней скоростью – В $\beta$ -цепей и с маленькой скоростью –  $\gamma$ -цепей. Фермент является гетеродимерной химотрипсин-подобной сериновой протеазой с массами цепей 30 кДа и 17,5 кДа, проявляет максимальную активность при 50°C, pH 7,4 [172].

*Cordyceps* – род энтомопатогенных грибов семейства *Cordycepitaceae* отдела *Ascomycota*. *Cordyceps militaris* секретирует гликозилированную трипсин-подобную сериновую протеазу массой около 25 кДа с оптимумом активности при 37°C, pH 7,2 [173]. Фермент обладает активаторной к плазминогену, фибрино- и фибринолитической активностями [174]. В то же время сериновая протеаза, продуцируемая другим представителем того же рода, *Cordyceps sinensis*, проявляет только фибрино- и фибринолитическую активности, имеет массу 31 кДа и оптимум активности при 40°C, pH 7,0 [175].

*Sarocladium strictum* – представитель семейства *Sarocladiaceae* отдела *Ascomycota*, выделяет комплекс протеаз с активаторными к плазминогену и фибринолитическими свойствами [176]. В комплексе обнаружены три трипсин-подобные тиол-зависимые сериновые протеазы (I, II, III) с pH-оптимумами 10,0, 5,0-8,0 и 8,0 соответственно. Протеазы I и II наиболее активны при температурах 37-55°C, протеаза III – при 37°C. Все три протеазы проявляют активаторную, фибринолитическую и фибринолитическую активность [177].

### 1.3.3. Продуценты прямых фибринолитиков

*Fusarium* – род семейства *Nectriaceae* отдела *Ascomycota*. Многие представители этого рода имеют хозяйственное значение, так как являются фитопатогенами или симбионтами культурных растений, встречаются также сапротрофные виды. Фибринолитическая активность была обнаружена в культуральных жидкостях многих представителей рода *Fusarium*. *F. semitectum* производит фибринолитическую протеазу, максимально активную при 50-60°C, pH 7,0 [178]. *F. oxysporum* N.R.C.1 секретирует две фибринолитические протеазы, активность одной из которых в 2 раза превышает активность второй. Более активная протеаза, скорее всего, является металлопротеазой с оптимумом активности при 37°C, pH 7,0 [179]. *F. pallidoroseum* выделяет металлопротеазу, максимально активную при 40°C, pH 7,0 [180]. *Fusarium sp.* VLB секретирует щелочную сериновую протеазу массой 27 кДа, максимально активную при 50°C, pH 9,5 [181]. Фибринолитическая активность этой протеазы *in vitro* превышает соответствующую активность наттокиназы [182]. Протеаза Fu-P, секретируемая

*Fusarium sp.* СРСС 480097, является химотрипсин-подобной сериновой металлопротеазой массой 28 кДа с оптимумом активности при 45°C, pH 8,5. Помимо фибринолитической активности, протеаза Fu-P также проявляет фибриногенолитическую активность, расщепляя А $\alpha$ -цепи фибриногена с наибольшей скоростью, В $\beta$ - и  $\gamma$ -цепи – с меньшей скоростью [183]. Данный фермент показал свою эффективность на модели тромбоза крыс [184]. Фибринолитическая активность также была показана для нового почвенного изолята *Fusarium sp.* CSN-6 [185].

*Cochliobolus* – фитопатогенный представитель семейства *Pleosporaceae* отдела *Ascomycota*. В настоящее время показана секреция фибринолитических протеаз двумя представителями данного рода. *Cochliobolus lunatus* продуцирует протеазу с максимальной активностью при 40°C, pH 6,8-7,0 [186]. *Cochliobolus hawaiiensis* продуцирует сериновую протеазу массой 35 кДа, максимальная активность которой наблюдается при 37°C, pH 7,0 [187].

*Scedosporium apiospermum* – патогенный для животных микромицет из семейства *Microascaceae* отдела *Ascomycota*, продуцирует субтилизин-подобную сериновую протеазу с фибрино- и фибриногенолитическими свойствами. Молекулярная масса фермента составляет 33 кДа. Оптимум активности – 37-50°C, pH 9,0 [188].

*Cladosporium spp.* – фитопатогенный представитель семейства *Cladosporiaceae* отдела *Ascomycota*. Продуцируемая им фибринолитическая протеаза имеет массу 35 кДа, проявляет максимальную активность при 50°C, pH 10,0 [189].

*Oidiodendron flavum* – термофильный гриб из семейства *Muxotrichaceae* отдела *Ascomycota*, секретирует фибринолитическую протеазу массой 22 кДа. Фермент проявляет максимальную активность при 45-55°C, pH 8,0 в присутствии некоторых ионов [190].

*Raecilomyces tenuipes* – энтомопатогенный представитель семейства *Thermoascaceae* отдела *Ascomycota*, продуцирует низкомолекулярную (14 кДа) протеазу РТЕFP. Помимо фибринолитической активности, РТЕFP демонстрирует

$\alpha$ -фибриногеназную активность. Фермент является сериновой протеазой с оптимумом активности 35°C, pH 5,0 [191].

*Bionectria ochroleuca* – аскомицет семейства *Nectriaceae*, был изолирован из субтропического леса Аргентины. По данным фибриновой зимограммы выделенный штамм продуцирует несколько фибринолитических ферментов с молекулярными массами 173, 153 и 80 кДа [192].

*Xylaria curta* – представитель семейства *Xylariaceae* отдела *Ascomycota*, относится к грибам, произрастающим на древесине. Выделяемый данным видом фермент (ксиляриназа) обладает фибрино- и фибриногенолитическими активностями. Последняя проявляется в расщеплении А $\alpha$ - и В $\beta$ -цепей фибриногена. Ксиляриназа является металлопротеазой с молекулярной массой 33 кДа и оптимумом активности 35°C, pH 8,0 [193].

*Armillaria mellea* – вид съедобных грибов семейства *Physalacriaceae* отдела *Basidiomycota*, продуцирует цинк-зависимую металлопротеазу массой 18,5 кДа. Фермент, выделенный из плодовых тел, проявляет как фибрино-, так и фибриногенолитические свойства, выражающиеся в одинаково эффективном расщеплении А $\alpha$ - и В $\beta$ -цепей фибриногена. Оптимум активности составляет 55°C, pH 7,0 [194]. Из мицелия данного гриба также была выделена фибринолитическая химотрипсин-подобная сериновая металлопротеаза с  $\alpha$ -фибриногеназной активностью. Масса протеазы составила 21 кДа, оптимум активности 33°C, pH 6,0 [195].

*Fomitella fraxinea* – гриб-трутовик, представитель семейства *Polyporaceae* отдела *Basidiomycota*. Данный макромицет продуцирует два фибринолитических фермента: FFP1 и FFP2, массы которых равны 32 кДа и 42 кДа, соответственно. FFP1 – это сериновая протеаза с оптимумом активности 40°C, pH 10,0, FFP2 – металлопротеаза с оптимумом 40°C, pH 5,0. Обе протеазы проявляют  $\alpha$ - и  $\beta$ -фибриногеназную активности [196].

*Cerrena albocinnamomea* – ещё один представитель семейства *Polyporaceae*, секретирующий фибриногенолитический фермент. Протеаза представляет собой

мономерную металлопротеазу семейства M36 массой 40 кДа. Максимальная активность проявляется при 45°C, pH 7,0 [197].

*Ganoderma lucidum* – гриб-трутовик, представитель семейства *Ganodermataceae* отдела *Basidiomycota*. Выделяемая им протеаза массой 33 кДа проявляет фибринолитические и фибриногенолитические свойства (расщепляет А $\alpha$ - и более медленно В $\beta$ -цепи фибриногена), а также ингибирует индуцируемую АДФ агрегацию тромбоцитов. Фермент показал свою эффективность как пероральный антиагрегант и тромболитик на модели тромбоза мышей [198].

*Lentinus edodes* – съедобный гриб семейства *Marasmiaceae* отдела *Basidiomycota*, более известный под названием шиитаке. Секретируемый им фибринолитический фермент (LEFE) представляет собой металлопротеазу массой 38 кДа с температурным оптимумом активности 30°C и pH-оптимумом 5,0. Помимо тромболитической активности, LEFE предотвращает агрегацию тромбоцитов под действием коллагена и адреналина [199].

Среди микромицетов отдела *Mucoromycota* фибринолитическая активность была описана для представителя семейства *Lichtheimiaceae* *Rhizomucor miehei* (Cooney & Emerson) Schipper и для представителя семейства *Mucoraceae* *Mucor subtilissimus* UCP 1262. Протеаза *Rhizomucor miehei* проявляет максимальную активность при 40°C, pH 8,2 [200], протеаза *Mucor subtilissimus* – при 37°C [201], влияние pH на активность протеазы не исследовалось. Фермент *Mucor subtilissimus* является химотрипсин-подобной протеазой массой 20 кДа [202], эффективно расщепляющей фибрин, однако продемонстрировавшей гепатотоксичность в экспериментах на мышах [203].

Таблица 5. Грибы-продуценты протеаз противотромботического действия

Продуцент	Отдел	Тип препарата	Тип протеазы	Мол. масса, кДа	pH-оптимум	Темп. оптимум, °С	Активность
<i>Agrocybe aegerita</i> [13]	<i>Ascomycota</i>	чистый	сериновая	31,4 и 21,2	7,6	47	Антикоагулянтная, активаторная к плазминогену, фибрин(оген)олитическая, тромбинолитическая
<i>Arthrobotrys longa</i> [163, 164]	<i>Ascomycota</i>	смесь (6)	сериновая	28,6	6,0-9,0	37	Активаторная к плазминогену, фибрин(оген)олитическая
<i>Aspergillus brasiliensis</i> AUMC 9735 [215]	<i>Ascomycota</i>	чистый	н/д	40	8,0	30	Фибринолитическая
<i>Aspergillus brasiliensis</i> BCW2 [216]	<i>Ascomycota</i>	чистый	н/д	68	5,0	40	Фибринолитическая

<i>Aspergillus carbonarius</i> S-CSR-0007 [217]	<i>Asco- mycota</i>	чистый	н/д	н/д	7,0	45	Фибринолитическая
<i>Aspergillus flavus</i> [220]	<i>Asco- mycota</i>	чистый	сериновая	17	н/д	н/д	Фибринолитическая
<i>Aspergillus fumigatus</i> [221]	<i>Asco- mycota</i>	чистый	н/д	33	н/д	н/д	Активаторная к плазминогену, фибрин(оген)олитическая
<i>Aspergillus japonicum</i> KGSS 05 [219]	<i>Asco- mycota</i>	смесь (н/д)	н/д	н/д	н/д	н/д	Фибринолитическая
<i>Aspergillus ochraceus</i> BKM F-4104D [213]	<i>Asco- mycota</i>	чистый	сериновая	33	9,0	37	Антикоагулянтная
<i>Aspergillus oryzae</i> [206, 207]	<i>Asco- mycota</i>	чистый (бриназа)	н/д	н/д	н/д	н/д	Фибринолитическая
<i>Aspergillus oryzae</i> B- 1273 [204]	<i>Asco- mycota</i>	смесь	н/д	н/д	н/д	н/д	Фибринолитическая
<i>Aspergillus oryzae</i> KSK-3 [208]	<i>Asco- mycota</i>	чистый	сериновая	30	6,0	50	Фибринолитическая

<i>Aspergillus tamaris</i> SAS 02 [218]	<i>Asco- mycota</i>	смесь (н/д)	н/д	н/д	н/д	н/д	Фибринолитическая
<i>Aspergillus terricola</i> [209-212]	<i>Asco- mycota</i>	смесь (3)	н/д	22, 26, 46	5,0-8,0	50	Фибринолитическая
<i>Aspergillus terreus</i> 2 [15, 214]	<i>Asco- mycota</i>	чистый	н/д	н/д	н/д	н/д	Антикоагулянтная, фибрин(оген)олитическая
<i>Aspergillus ustus</i> 1 [222]	<i>Asco- mycota</i>	чистый	н/д	33	6	41	Фибринолитическая
<i>Aspergillus versicolor</i> ZLH-1 [16]	<i>Asco- mycota</i>	чистый	металло- протеаза	37	5	40	Антикоагулянтная, активаторная к плазминогену, фибрин(оген)олитическая
<i>Bionectria ochroleuca</i> [192]	<i>Asco- mycota</i>	смесь (3)	н/д	173, 153, 80	н/д	н/д	Фибринолитическая
<i>Cladosporium spp.</i> [189]	<i>Asco- mycota</i>	чистый	н/д	35	10,0	55	Фибринолитическая

<i>Cochliobolus hawaiiensis</i> [187]	<i>Ascomycota</i>	чистый	сериновая	35	7,0	37	Фибринолитическая
<i>Cochliobolus lunatus</i> [186]	<i>Ascomycota</i>	чистый	н/д	н/д	6,8-7,0	40	Фибринолитическая
<i>Cordyceps militaris</i> [173, 174]	<i>Ascomycota</i>	чистый	трипсин-подобная сериновая	25	7,2	37	Активаторная к плазминогену, фибрин(оген)олитическая
<i>Cordyceps sinensis</i> [175]	<i>Ascomycota</i>	чистый	сериновая	31	7,0	40	Фибрин(оген)олитическая
<i>Fusarium oxysporum</i> N.R.C.1 [179]	<i>Ascomycota</i>	смесь (2)	металло-протеаза (I) и н/д (II)	н/д	7 (I)	37 (I)	Фибринолитическая
<i>Fusarium pallidoroseum</i> [180]	<i>Ascomycota</i>	чистый	металло-протеаза	н/д	8,0	40	Фибринолитическая
<i>Fusarium semitectum</i> [178]	<i>Ascomycota</i>	чистый	н/д	н/д	7,0	50-60	Фибринолитическая
<i>Fusarium sp.</i> BLB [181, 182]	<i>Ascomycota</i>	чистый	сериновая	27	9,5	50	Фибринолитическая

<i>Fusarium sp.</i> CPCC 480097 [183, 184]	<i>Ascomycota</i>	чистый	химотрипсин- подобная сериновая металло- протеаза	28	8,5	45	Фибрин(оген)олитическая
<i>Fusarium sp.</i> CSN-6 [185]	<i>Ascomycota</i>	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	Фибринолитическая
<i>Neurospora crassa</i> [14]	<i>Ascomycota</i>	чистый	сериновая	32	7,4	40	Антикоагулянтная, фибрин(оген)олитическая
<i>Neurospora sitophila</i> [172]	<i>Ascomycota</i>	чистый	химотрипсин- подобная сериновая	30 и 17,5	7,4	50	Активаторная к плазминогену, фибрин(оген)олитическая
<i>Oidiodendron flavum</i> [190]	<i>Ascomycota</i>	чистый	н/д	22	8,0	45-55	Фибринолитическая
<i>Raecilomyces tenuipes</i> [191]	<i>Ascomycota</i>	чистый	сериновая	14	5,0	35	Фибрин(оген)олитическая

<i>Sarocladium strictum</i> [176, 177]	<i>Asco- mycota</i>	смесь (3)	трипсин- подобные тиол- зависимые сериновые (I, II, III)	н/д	10,0 (I), 5,0-8,0 (II), 8,0 (III)	37-55 (I- II), 37 (III)	Активаторная к плазминогену, фибрин(оген)олитическая
<i>Scedosporium apiospermum</i> [188]	<i>Asco- mycota</i>	чистый	субтилизин- подобная сериновая	33	9,0	37-50	Фибрин(оген)олитическая
<i>Tolypocladium inflatum</i> 62A [171]	<i>Asco- mycota</i>	смесь (н/д)	н/д	н/д	6,0-7,0	37	Фибринолитическая
<i>Tolypocladium inflatum</i> k1 [169, 170]	<i>Asco- mycota</i>	смесь (2)	сериновая и н/д	н/д	8,0	37	Активаторная к плазминогену, фибринолитическая
<i>Trichothecium roseum</i> [10, 160, 161]	<i>Asco- mycota</i>	смесь (5)	н/д	н/д	н/д	н/д	Антикоагулянтная, активаторная к плазминогену, фибрин(оген)олитическая

<i>Xylaria curta</i> [193]	<i>Asco- mycota</i>	чистый	металло- протеаза	33	8,0	35	Фибрин(оген)олитическая
<i>Armillaria mellea</i> [194]	<i>Basidio mycota</i>	чистый	цинк- зависимая металло- протеаза	18,5	7,0	55	Фибрин(оген)олитическая
<i>Armillaria mellea</i> [195]	<i>Basidio mycota</i>	чистый	химотрипсин- подобная сериновая металло- протеаза	21	6,0	33	Фибриногенолитическая
<i>Boletus pseudocalopus</i> [12]	<i>Basidio mycota</i>	чистый	сериновая	63,5	7,0	40	Антикоагулянтная (ингибитор тромбина и Ха), фибринолитическая
<i>Cerrena albocinnamomea</i> [197]	<i>Basidio mycota</i>	чистый	Металло- протеаза	40	7,0	45	Фибриногенолитическая

<i>Fomitella fraxinea</i> [196]	<i>Basidio mycota</i>	смесь (2)	сериновая протеаза (FFP1) и металло- протеаза (FFP2)	32 (FFP 1) и 42 (FFP 2)	10 (FFP1) и 5 (FFP2)	40 (FFP1) и 40 (FFP2)	Фибрин(оген)олитическая
<i>Ganoderma lucidum</i> [198]	<i>Basidio mycota</i>	чистый	н/д	33	н/д	н/д	Фибрин(оген)олитическая, антиагрегантная
<i>Hericium erinaceum</i> [166]	<i>Basidio mycota</i>	чистый	н/д	51	7,0	30	Активаторная к плазминогену, фибрин(оген)олитическая
<i>Lentinus edodes</i> [199]	<i>Basidio mycota</i>	чистый	металло- протеаза	38	5,0	30	Фибринолитическая, антиагрегантная
<i>Pleurotus ferulae</i> [11]	<i>Basidio mycota</i>	чистый	н/д	20	4,0, 5,0 и 8,0	50	Антикоагулянтная, фибрин(оген)олитическая, тромбинолитическая

<i>Schizophyllum commune</i> [165]	<i>Basidiomycota</i>	чистый	металло-протеаза	17	4,0-6,0	17	Активаторная к плазминогену, фибринолитическая
<i>Mucor subtilissimus</i> UCP 1262 [201-203]	<i>Mucoromycota</i>	чистый	химотрипсин-подобная	20	н/д	37	Фибринолитическая
<i>Rhizomucor miehei</i> [200]	<i>Mucoromycota</i>	чистый	н/д	н/д	8,2	40	Фибринолитическая
<i>Rhizopus chinensis</i> 12 [168]	<i>Mucoromycota</i>	чистый	н/д	н/д	6,8-8,8	45	Активаторная к плазминогену, фибрин(оген)олитическая
<i>Rhizopus microsporus var. tuberosus</i> [167]	<i>Mucoromycota</i>	чистый	н/д	24,5	7,0	37	Активаторная к плазминогену, фибринолитическая

### 1.3.4. Антитромботические ферменты, продуцируемые микромицетами рода *Aspergillus*

Наибольшая доля исследованных на данный момент продуцентов антикоагулянтных и противотромботических протеаз приходится на представителей рода *Aspergillus* семейства *Aspergillaceae* отдела *Ascomycota* [8, 9]. Первый в истории фибринолитический ферментный препарат грибного происхождения (аспергиллин О) был получен ещё в 1959 году именно из культуральной жидкости представителя рода *Aspergillus*: *A. oryzae* В-1273 [204]. Чуть позже на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ был получен аналог препарата – аспергиллин М [205]. Из смеси протеолитических ферментов, секретируемых *A. oryzae*, была очищена так называемая протеаза I, или бриназа, которая использовалась для терапии тромботических состояний в 70-х и 80-х годах XX века [206]. Однако бриназа подвергалась ингибированию под действием  $\alpha$ 1-антитрипсина и  $\alpha$ 2-макроглобулина [207]. В 2011 году из другого штамма *A. oryzae* (KSK-3) была выделена и охарактеризована сериновая фибринолитическая протеаза массой 30 кДа, проявляющая максимальную активность при 50°C, pH 6,0 [208].

Комплекс фибринолитических ферментов, секретируемых *A. terricola*, получил название Террилитин [209-212]. Комплекс состоит из трёх протеаз массами 22 кДа, 26 кДа и 46 кДа. Все протеазы стабильны в диапазоне pH 5,0-8,0 при температуре до 50°C. К сожалению, внутривенное введение показало токсичность препарата.

Очень интересна одна из протеаз, выделяемых *A. ochraceus*. В отличие от большинства протеаз, продуцируемых микроорганизмами, фермент *A. ochraceus* ВКМ F-4104D проявляет не фибринолитические, а антикоагулянтные свойства, так как является протеазой-активатором протеина С. Фермент является сериновой протеазой массой 33 кДа с оптимумом активности при 37°C, pH 9,0 [213]. Ещё одна протеаза-активатор протеина С была выделена из культуральной жидкости *A. terreus* 2 [15], позже электрофоретическими методами было показано, что данный фермент способен также расщеплять фибриноген и фибрин [214].

Фибринолитическая протеаза, секретируемая *A. brasiliensis* AUMC 9735 имеет массу 40 кДа и проявляет максимальную активность при 30°C, pH 8,0 [215], а протеаза *A. brasiliensis* BCW2 имеет массу 68 кДа и проявляет максимальную активность при 40°C, pH 5,0 [216]. Температурный оптимум протеазы *A. carbonarius* S-CSR-0007 составляет 45°C, pH-оптимум – 7,0 [217]. Фибринолитическая активность также была обнаружена в культуральной жидкости *A. tamaris* SAS 02 [218], *A. japonicum* KGSS 05 [219] и у секретируемой сериновой протеазы *A. flavus* массой 17 кДа [220]. Фибрин(оген)олитическая и активаторная к плазминогену активности были показаны для протеазы массой 33 кДа *A. fumigatus* [221]. Фибринолитическая протеаза *A. ustus* 1 также имеет массу 33 кДа и проявляет максимальную активность при 41°C, pH 6,0 [222].

Перспективным недавно выделенным ферментом является версиаза, протеаза морского штамма *A. versicolor* ZLN-1, описанная в 2022 году [16]. Версиаза является антикоагулянтом, активатором плазминогена и прямым фибринолитиком, что было показано при помощи метода фибриновых пластин. Также фермент обладает способностью расщеплять A $\alpha$ -, B $\beta$ - и  $\gamma$ -цепи фибриногена. Версиаза относится к семейству M35 металлопротеаз, имеет массу 37 кДа и оптимум активности при 40°C, pH 5,0. Отсутствие токсичности у препарата протеазы было показано в экспериментах на клеточной культуре HUVEC, а также на мышах.

Несмотря на наличие множества одобренных для использования тромболитических лекарственных препаратов на основе ферментов микромицетов, грибных протеаз с антикоагулянтной активностью (таблица 5) известно крайне мало. Более того, даже для описанных антикоагулянтных ферментов зачастую отсутствуют данные о мишенях каскада коагуляции, на которые действует выделенная протеаза [10-14, 16], что затрудняет переход к разработке лекарственных препаратов, так как неизвестен механизм действия целевого фермента. Только для двух антикоагулянтных протеаз микромицетов описан механизм действия – это регуляция каскада коагуляции за счёт активации эндогенного человеческого протеина C [15]. Однако эти протеазы не обладают

собственным антикоагулянтным эффектом, поэтому будут бесполезны для лечения пациентов, например, с недостаточностью протеина С. В то же время наличие у некоторых описанных грибных протеаз (таблица 5), помимо антикоагулянтной, ещё и тромболитической активности является многообещающим свойством для последующей разработки фармацевтических препаратов. В связи со всем вышеизложенным актуальной научной задачей является поиск продуцентов протеаз, проявляющих одновременно антикоагулянтную протеин С-подобную и тромболитическую активности. В качестве объектов для такого поиска в рамках данной работы были выбраны микромицеты рода *Aspergillus*, так как этот род содержит более 800 видов, приспособленных к жизни в разных экологических нишах и продуцирующих широкий спектр протеаз.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Объект исследования

15 штаммов из разных видов рода *Aspergillus* были получены из коллекции Белградского университета, 5 штаммов – из коллекции лечебного факультета Словацкого медицинского университета г. Братислава, 1 штамм – из коллекции кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ, 1 штамм – выделен из образца почвы, собранной недалеко от монастыря Поблет (Испания). Перечень всех использованных в работе штаммов представлен в таблице 6.

Таблица 6. Штаммы рода *Aspergillus*, использованные в работе

Штамм	Коллекция	Метод идентификации
<i>A. amstelodami</i> W/N	Кафедра микологии и альгологии биологического факультета МГУ	Морфологический
<i>A. thecius</i> W/N	Словацкий медицинский университет	Морфологический
<i>A. aureolatus</i> BEOFB3320m	Белградский университет	Генетический (локусы <i>ITS</i> , <i>BenA</i> )
<i>A. caespitosus</i> K Air-29	Словацкий медицинский университет	Генетический (локус <i>ITS</i> )
<i>A. calidoustus</i> BEOFB3220m	Белградский университет	Генетический (локусы <i>ITS</i> , <i>BenA</i> )
<i>A. creber</i> BEOFB3250m	Белградский университет	Генетический (локусы <i>ITS</i> , <i>BenA</i> )
<i>A. domesticus</i> BEOFB3270m	Белградский университет	Генетический (локусы <i>ITS</i> , <i>BenA</i> )
<i>A. europaeus</i> BEOFB382m	Белградский университет	Генетический (локусы <i>ITS</i> , <i>BenA</i> )

<i>A. glaucus</i> W/N	Словацкий медицинский университет	Морфологический
<i>A. jensenii</i> BEOFB3200m	Белградский университет	Генетический (локусы <i>ITS, BenA</i> )
<i>A. melleus</i> BEOFB3180m	Белградский университет	Генетический (локусы <i>ITS, BenA</i> )
<i>A. penicilloides</i> BEOFB3190m	Белградский университет	Генетический (локусы <i>ITS, BenA</i> )
<i>A. phoenicis</i> W/N	Изолирован из почвы недалеко от монастыря Поблет (Испания)	Морфологический
<i>A. proliferans</i> BEOFB3280m	Белградский университет	Генетический (локусы <i>ITS, BenA</i> )
<i>A. protuberus</i> BEOFB3240m	Белградский университет	Генетический (локусы <i>ITS, BenA</i> )
<i>A. pseudoglaucus</i> BEOFB3170m	Белградский университет	Генетический (локусы <i>ITS, BenA</i> )
<i>A. ruber</i> BEOFB3150m	Белградский университет	Генетический (локусы <i>ITS, BenA</i> )
<i>A. tabacinus</i> BEOFB3260m	Белградский университет	Генетический (локусы <i>ITS, BenA</i> )
<i>A. tamaritii</i> W/N	Словацкий медицинский университет	Морфологический
<i>A. tennesseensis</i> BEOFB3310m	Белградский университет	Генетический (локусы <i>ITS, BenA</i> )
<i>A. tubingensis</i> BEOFB3300m	Белградский университет	Генетический (локусы <i>ITS, BenA</i> )
<i>A. wentii</i> W/N	Словацкий медицинский университет	Морфологический

## *2.2. Поверхностное культивирование микромицетов*

Поверхностное культивирование исследуемых штаммов проводили в чашках Петри на агаризованной среде Чапека. Для поддержания культур пересевы производили раз в 7 дней. Для последующего перевода культур в глубинное культивирование производили пересев на скошенную агаризованную среду Чапека и через 7 дней пересевали в посевную среду.

## *2.3. Глубинное культивирование микромицетов*

Пересев в посевную среду производили путём смыва споровой суспензии со скошенного агара. Культивирование на посевной среде (в %: сусло – 6,7, глюкоза – 1,0, пептон – 0,1; pH 5,5-6,0) производили в течение 48 часов при 28°C и постоянном перемешивании со скоростью 200 оборотов/мин в качалочных колбах объёмом 750 мл. Объём среды в одной колбе составлял 100 мл. Далее для индукции образования протеолитических ферментов 3% объёма посевной среды переносили в соответствующий объём ферментационной среды 1 (в %: глицерин – 7,0, глюкоза – 3,0, гидролизат рыбной муки – 3,0, MgSO<sub>4</sub> – 0,1, KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,1; pH 7,0) или ферментационной среды 2 (в %: глюкоза – 3,5, крахмал – 1,0, гидролизат рыбной муки – 0,5, пептон – 0,5, NaCl – 0,2, KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,05, MgSO<sub>4</sub> – 0,05; pH 7,0) [223]. Культивирование производили в течение 96 часов при 28°C и постоянном перемешивании со скоростью 200 оборотов/мин в качалочных колбах объёмом 750 мл. Объём среды в одной колбе составлял 100 мл.

## *2.4. Определение энзиматических индексов*

Для выявления протеолитической активности микромицетов при поверхностном культивировании производили посев каждого штамма уколом на среду (в %: пептон – 0,5, KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,05, MgSO<sub>4</sub> – 0,025, агар – 1,5) с добавлением одного из шести белков, представленных на рис. 5. После семидневной инкубации в темноте при 28°C с помощью контрастирующих агентов, указанных в таблице 7, выявляли зону гидролиза белка и рассчитывали энзиматический индекс как отношение диаметра зоны гидролиза белка к диаметру колонии.

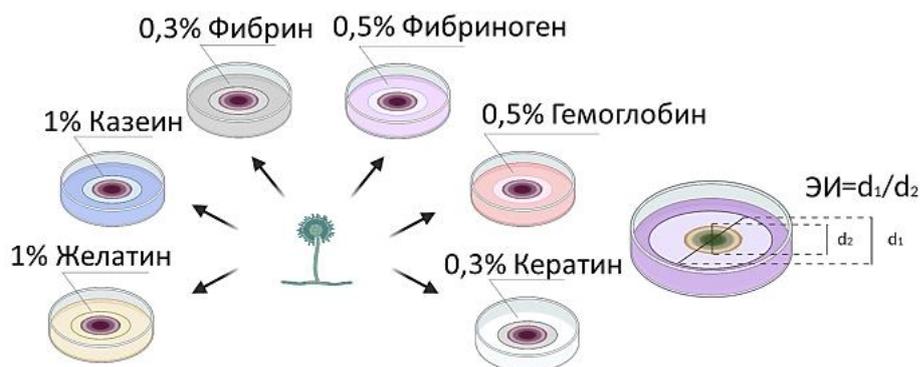


Рис. 5. Схема эксперимента по определению протеолитической активности штаммов при поверхностном культивировании

Таблица 7. Контрастирующие агенты для выявления зон гидролиза белков при поверхностном культивировании

Белок	Контрастирующий агент
Желатин	39,6% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Казеин	10% трихлоруксусная кислота (ТХУ)
Фибрин	Кумасси G250 в хлорной кислоте
Фибриноген	10% ТХУ
Гемоглобин	10% ТХУ
Кератин	Кумасси G250 в хлорной кислоте

### 2.5. 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 [224, 225], измеряя поглощение в растворимой фракции реакционной смеси при 275 нм. Измерения проводили на начальном линейном участке скорости реакции. Реакцию инициировали добавлением 200 мкл 1% раствора соответствующего белка в 0,05 М Трис-НСI буфере, рН 8,2, к 100 мкл пробы фермента. Спустя 10 минут реакцию останавливали добавлением 300 мкл 10% ТХУ. В контрольной пробе реакцию останавливали без 10-минутной инкубации. После 5-минутного центрифугирования проб при 14000 g измеряли оптическую плотность

надосадочной жидкости. За единицу ферментативной активности принимали образование в 1 мл раствора за 1 минуту такого количества неосаждаемых продуктов гидролиза, оптическое поглощение которых при 275 нм эквивалентно поглощению 1 мкг тирозина.

Протеолитическую активность культуральной жидкости по отношению к азоказеину определяли по описанной выше методике спектрофотометрически при 37°C, измеряя поглощение растворимых продуктов реакции при 340 нм. Использовали 0,2% раствор азоказеина в 0,05 М Трис-НСl буфере, рН 8,2, а также в 0,05 М ацетатном буфере, рН 5,5. Инкубацию ферментной пробы с субстратом проводили в течение 30 минут. Фибринолитическую активность определяли аналогично азоказеинолитической, использовали 0,2% раствор голубого фибрина, то есть зафиксированного в структуре частиц полимеризованного фибрина голубого декстрана [226], в 0,05 М ацетатном буфере, рН 5,5. Оптическую плотность высвобождаемого голубого декстрана измеряли при 620 нм. За единицу ферментативной активности принимали то количество фермента, которое вызывало изменение оптической плотности на 0,01 ед.

#### *2.6. Определение амидолитической активности с хромогенными пептидными субстратами*

Специфическую ферментативную активность в культуральной жидкости и фракциях после изоэлектрофокусирования определяли спектрофотометрически при длине волны 405 нм по накоплению пара-нитроанилина после гидролиза различных хромогенных пептидных субстратов при 37°C [227]. Измерения проводили на начальном линейном участке скорости реакции. 100 мкл соответствующего субстрата с концентрацией 0,5 мг/мл, приготовленного с использованием 0,05 М Трис-НСl буфера, рН 8,2, смешивали с 50 мкл такого же буфера. Реакцию инициировали добавлением 200 мкл нужной фракции или культуральной жидкости. Спустя 5 минут реакцию останавливали добавлением 200 мкл 50%-ной уксусной кислоты. В качестве контроля использовали пробу, в которой реакция была остановлена сразу же после добавления к раствору субстрата ферментативной фракции.

Активаторные активности по отношению к белкам плазмы определяли следующим образом: 200 мкл ферментативной пробы смешивали с 50 мкл разведённой в два раза плазмы, инкубировали 5 минут при 37°C, затем инициировали реакцию добавлением 100 мкл соответствующего субстрата с концентрацией 0,5 мг/мл, приготовленного с использованием 0,05 М Трис-НСl буфера, рН 8,2 [228]. Спустя 5 минут реакцию останавливали, как описано выше. За единицу ферментативной активности и при измерении прямых, и при измерении активаторных активностей принимали количество мкмоль пара-нитроанилина, образовавшегося в 1 мл раствора за 1 минуту.

### *2.7. Измерение концентрации белка*

Концентрацию белка в культуральной жидкости и в пробах ферментного препарата проводили по методу Брэдфорд [229]. Оптическую плотность в образцах после добавления Кумасси G250 измеряли при 595 нм.

### *2.8. Метод фибриновых пластин*

Измерение фибринолитической и активаторной к плазминогену активностей культуральной жидкости производили по методу Аструпа – Мюллерца – Лассена [230, 231]. Для приготовления фибриновых пластин смешивали 200 мкл тромбина (2 мг/мл) в физиологическом растворе и 900 мкл 3% бычьего фибриногена (содержит примесь плазминогена) в физиологическом растворе. После аккуратного перемешивания выливали смесь в чашку Петри и ждали 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 мм<sup>2</sup> зоны фибринолизиса. Прямую фибринолитическую активность определяли по прогретым пластинам, активаторную к плазминогену –

как разность площадей зон фибринолизиса между непрогретой и прогретой пластинами (рис. 6).

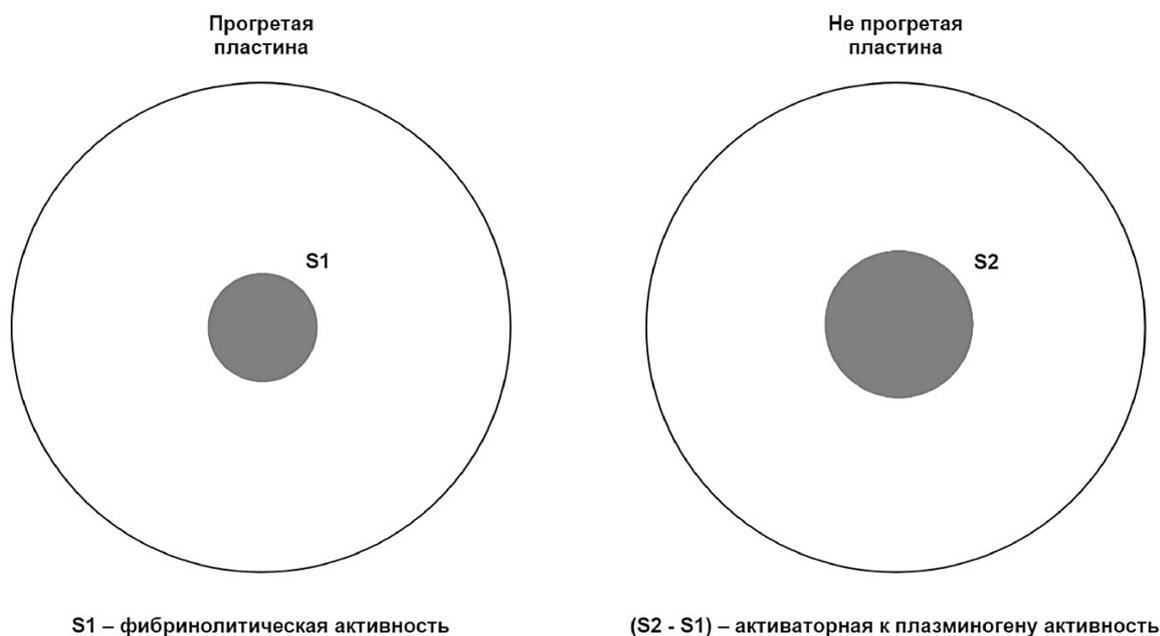


Рис. 6. Схема метода фибриновых пластин

### 2.9. Изучение динамики накопления протеаз в культуральной жидкости

Для выяснения влияния условий культивирования на продукцию протеаз культивировали штамм-продуцент на двух ферментационных средах и измеряли концентрацию белка, азоказеинолитическую и амидолитическую активности аликвот культуральной жидкости, отобранных каждые 24 часа, начиная с конца вторых суток культивирования. Культивирование проводили до заметного снижения протеолитической активности культуральной жидкости. По результатам эксперимента выбирали оптимальную среду и оптимальное время культивирования продуцента.

### 2.10. Влияние pH и температуры на продукцию протеазы

После выбора оптимальной среды и времени культивирования продуцент культивировали в данных условиях, но на средах с разными значениями pH (4,0, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0 и 8,0). Значение pH в средах корректировали при помощи титрования 0,1 N растворами HCl и NaOH. После выбора оптимального pH культивировали микромицет на данной среде при разных температурах (26°C, 28°C, 30°C, 32°C).

### *2.11. Выделение и очистка протеазы*

Для выделения фермента проводили высаливание белков сульфатом аммония (степени насыщения 80%) из 2 л культуральной жидкости. Спустя 48 часов инкубации при 4°C белковый осадок был отделён центрифугированием в течение 40 минут при 15000g. Осадок ресуспендировали в 10 мл 0,005 М Трис-HCl буфера, рН 8,2, и поместили в диализный мешок, после чего провели диализ против того же буфера. После диализа нерастворимые белки были отделены центрифугированием при описанных выше параметрах, а супернатант был лиофильно высушен и далее хранился при -20°C.

Очистка протеазы из полученного лиофильного препарата была проведена с помощью колоночного изоэлектрофокусирования в градиенте амфолинов (рН 2-12) и в градиенте плотности сахарозы (0-40%) при 4°C и напряжении 800 В в течение 36 часов [232, 233]. Для изоэлектрофокусирования использовали колонку объемом 110 мл («LKB», Швеция). Затем в каждой фракции определяли рН, оптическую плотность при длине волны 280 нм, а также специфическую протеолитическую/амидолитическую активность.

### *2.12. Электрофорез в денатурирующих условиях*

Для выяснения белкового состава фракции с наибольшей протеолитической активностью проводили электрофорез в денатурирующих условиях по методу Лэммли [234]. Использовали маркеры молекулярных масс Unstained Protein Molecular Weight Marker («Thermo Fisher Scientific», США), окрашивание геля проводили ацетатно-спиртовым раствором Кумасси R-250, для удаления неспецифически сорбировавшегося красителя использовали 7%-ный раствор уксусной кислоты.

### *2.13. Зимография*

Для определения протеолитически активного компонента во фракции, представлявшей собой белковую смесь, использовали зимографию [235]. Для этого проводили электрофорез в денатурирующих условиях по методу Лэммли со следующими изменениями: в разделяющий гель был добавлен казеин до конечной концентрации 0,2%, в качестве буфера для образцов использовали пятикратный

буфер следующего состава: 0,5 М Трис-НСl, рН 6,8, 10% ДСН, 20% глицерина, 0,5% бромфенолового синего. Перед нанесением проб в гель не производили их нагревание. После проведения электрофореза гель инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре в 50 мМ Трис-НСl буфере, рН 7,0, содержащем 2,5% Тритона-Х100. Далее отмывали гель в течение 30 минут в дистиллированной воде, после чего инкубировали в течение 12 часов при 37°С в 30 мМ Трис-НСl буфере, рН 7,0, содержащем 0,02% азиды натрия. Окрашивание геля производили так же, как и в случае электрофореза по Лэммли.

#### *2.14. Выявление гликозилирования в геле*

Определение углеводного компонента у целевой протеазы проводили в геле после денатурирующего электрофореза [236]. В течение 30 минут гель инкубировали в 50%-ном этаноле, затем в течение 10 минут отмывали дистиллированной водой, после чего помещали гель на 30 минут в раствор, содержащий 1%-ную перйодную и 3%-ную уксусную кислоты. Далее отмывали 30 минут в дистиллированной воде, 20 минут инкубировали в 0,1%-ном растворе метабисульфита натрия в 10 мМ НСl, за чем следовала часовая инкубация в темноте с реактивом Шиффа. После описанных процедур гель повторно помещали в 0,1%-ный раствор метабисульфита натрия в 10 мМ НСl на 1 час, а затем в 0,5%-ный раствор метабисульфита натрия в 10 мМ НСl на 2 часа.

#### *2.15. Анализ субстратной специфичности протеазы*

Для определения субстратной специфичности использовали следующие хромогенные пептидные субстраты [237]: субстрат плазмينا Н-D-Val-Leu-Lys-pNA (S-2251), фактора Ха – Bz-Ile-Glu( $\gamma$ -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 пламиногена – 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.

## *2.16. 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 (CMB, 0,5 мМ и 0,05 мМ), ингибитор металлопротеаз ЭДТА (1 мМ и 0,1 мМ). Фермент инкубировали с раствором ингибитора в течение двух часов при комнатной температуре, далее производили реакцию с субстратом S-2366 по методике, описанной выше. В качестве контроля использовали пробу, в которой фермент инкубировали в течение двух часов с буферным раствором Трис-НСl, рН 8,2, без ингибитора. Ферментативную активность контрольной пробы выражали как 100%, активности в присутствии ингибиторов выражали относительно активности в контрольной пробе.

## *2.17. 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 инкубацию фермента в объеме 200 мкл с 50 мкл 0,1 М универсального буфера (диапазон рН от 2,0 до 13,0) при 25°С, после чего добавляли 100 мкл субстрата в концентрации 0,5 мг/мл, растворенного в 0,5 М Трис-НСl буфере, рН 8,2. Реакцию проводили в течение 5 минут и останавливали добавлением 200 мкл 50%-ной уксусной кислоты. Для выявления температурного оптимума реакцию проводили при 25°С, 30°С, 37°С, 45°С, 55°С, 65°С. Для определения температурной стабильности проводили двухчасовую инкубацию фермента при указанных температурах, затем проводили реакцию при 37°С по стандартной методике, описанной выше.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ<sup>1</sup>

### 3.1. Протеолитическая активность штаммов при поверхностном культивировании

Первичный анализ протеолитической активности 22 исследованных штаммов разных видов рода *Aspergillus* был проведён при поверхностном культивировании микромицетов на средах, содержащих 6 разных белков. Для каждого штамма рассчитывали отношение диаметра зоны гидролиза белка к диаметру колонии. Примеры гидролитической активности штаммов по отношению к некоторым белкам представлены на рис. 8. Значения энзиматических индексов больше 1 свидетельствуют о присутствии протеолитической активности (таблица 8).

---

<sup>1</sup> Основные результаты, изложенные в данной главе, опубликованы в следующих научных статьях автора в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В.Ломоносова:

1. 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/mb1.2309.09006. (**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)

По результатам экспериментов казеинолитическая активность была обнаружена у 20 из 22 исследуемых видов, что вполне очевидно, так как аминокислотный состав казеина позволяет большинству известных протеаз эффективно расщеплять этот белок. Желатин представляет собой смесь пептидных продуктов гидролизованного коллагена и также является субстратом, расщепляемым большинством известных протеаз. Желатинолитическая активность была обнаружена у 18 изучаемых видов.

Основная активность, необходимая для расщепления тромбов, – это фибринолитическая активность, которая была обнаружена у 16 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*. Помимо того, что фибриногенолитическая активность этих штаммов всё же может способствовать тромболизису, многие фибриногеназы также проявляют антиагрегантный эффект, так как расщепляют одну из белковых платформ для агрегации тромбоцитов.

Кератин, так же, как и фибрин, является фибриллярным белком. В работе было обнаружено 6 видов-кератинолитиков, 4 из которых также расщепляли фибрин. Это может свидетельствовать о секреции штаммами не сильно специфичных протеаз, расщепляющих разные фибриллярные белки, что не является плюсом для потенциального терапевтического применения, так как более безопасными являются узкоспецифичные протеазы. Среди штаммов, которые расщепляли фибрин, но не расщепляли кератин, стоит выделить три штамма с наибольшими значениями энзиматических индексов (*A. glaucus*, *A. tamarii*, *A. wentii*). Протеолитическая активность этих штаммов превышает значение

энзиматического индекса по фибрину для известного продуцента фибринолитической протеазы *Tolyposcladium inflatum* k1 [238].

Гемоглинолитическая активность, обнаруженная у 11 видов, является нежелательной для потенциального терапевтического применения фибринолитических протеаз, так как при наличии свободного гемоглобина в плазме крови его расщепление может привести к появлению токсичных продуктов деградации и сильному иммунному ответу.

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.

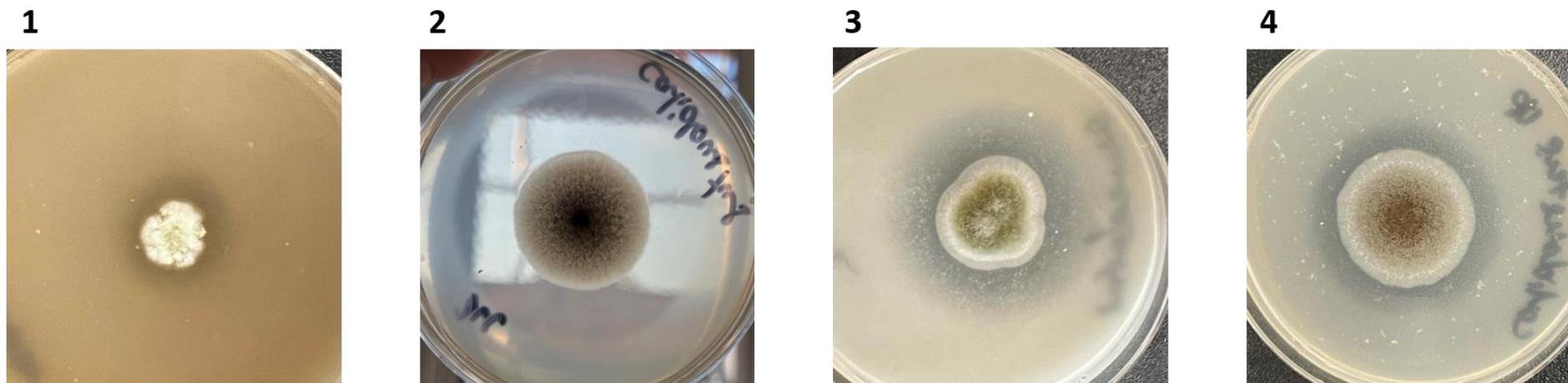


Рис. 8. Зоны гидролиза белковых субстратов для некоторых исследованных штаммов

Таблица 8. Энзиматические индексы штаммов исследуемых видов по отношению к разным белковым субстратам (данные представлены в виде «среднее значение±стандартное отклонение», n=3)

Микромицет	Энзиматический индекс по отношению к конкретному белку					
	Казеин	Желатин	Гемоглобин	Фибрин	Фибриноген	Кератин
<i>A. amstelodami</i> W/N	1,9±0,1	1,7±0,3	1,0±0,0	1,2±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0
<i>A. athecium</i> W/N	1,2±0,0	1,1±0,0	1,0±0,0	1,1±0,0	1,3±0,0	1,0±0,0
<i>A. aureolatus</i> BEOFB3320m	1,5±0,1	1,7±0,0	1,1±0,0	1,1±0,0	1,4±0,1	1,0±0,0
<i>A. caespitosus</i> K Air-29	3,0±0,0	1,2±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,8±0,4	1,2±0,0

<i>A. calidoustus</i> BEOFB3220m	1,5±0,0	1,9±0,1	1,1±0,0	1,1±0,1	1,3±0,0	1,0±0,0
<i>A. creber</i> BEOFB3250m	2,1±0,1	2,7±0,2	1,6±0,1	1,1±0,2	1,6±0,1	1,0±0,0
<i>A. domesticus</i> BEOFB3270m	4,0±0,4	1,0±0,0	2,5±0,5	1,1±0,0	3,0±0,6	1,7±0,1
<i>A. europaeus</i> BEOFB382m	2,7±0,5	2,7±0,8	1,6±0,2	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0
<i>A. glaucus</i> W/N	1,1±0,0	1,2±0,0	1,0±0,0	1,3±0,0	1,8±0,1	1,0±0,0
<i>A. jensenii</i> BEOFB3200m	2,2±0,6	3,4±0,7	1,0±0,0	1,1±0,2	1,3±0,1	1,2±0,0
<i>A. melleus</i> BEOFB3180m	1,8±0,1	1,4±0,2	1,7±0,2	1,2±0,6	1,7±0,4	1,3±0,1
<i>A. penicilloides</i> BEOFB3190m	2,2±0,2	2,1±0,2	1,6±0,3	1,0±0,4	1,7±0,2	1,8±0,4
<i>A. phoenicis</i> W/N	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0
<i>A. proliferans</i> BEOFB3280m	1,0±0,0	1,9±0,3	1,0±0,0	1,1±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0
<i>A. protuberus</i> BEOFB3240m	3,1±0,4	3,7±0,8	2,0±0,3	1,1±0,0	2,6±0,4	1,0±0,0
<i>A. pseudoglaucus</i> BEOFB3170m	2,0±0,1	1,7±0,7	1,0±0,0	1,0±0,0	1,4±0,0	1,0±0,0
<i>A. ruber</i> BEOFB3150m	3,2±0,2	2,3±0,3	1,0±0,0	1,2±0,4	1,0±0,0	1,8±0,3
<i>A. tabacinus</i> BEOFB3260m	2,3±0,1	1,0±0,0	1,7±0,1	1,2±0,1	2,2±0,1	1,0±0,0
<i>A. tamaritii</i> W/N	1,2±0,1	1,3±0,1	1,0±0,0	1,4±0,2	1,6±0,1	1,0±0,0
<i>A. tennesseensis</i> BEOFB3310m	2,4±0,0	1,0±0,0	1,5±0,0	1,1±0,1	2,0±0,4	1,0±0,0
<i>A. turingensis</i> BEOFB3300m	1,1±0,0	1,6±0,4	1,7±0,3	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0
<i>A. wentii</i> W/N	1,2±0,0	1,9±0,0	1,0±0,0	1,4±0,3	1,0±0,0	1,0±0,0

### 3.2. Протеолитическая активность штаммов при глубинном культивировании

Способность микромицетов выделять специфичные по отношению к разным белкам протеазы была также изучена после глубинного культивирования, так как при поверхностном и глубинном культивировании штаммы могут секретировать разные протеазы в разном количестве. Общую протеолитическую активность измеряли по отношению к азоказеину, однако, так как разные штаммы секретируют протеазы с разным рН-оптимумом, для первичного скрининга использовали растворы азоказеина в буферах с различными значениями рН (8,2 и 5,5). Помимо азоказеинолитической активности измеряли целевые активности, необходимые для тромболизиса, – фибринолитическую и фибриногенолитическую, а также гемоглинолитическую активность как фактор риска при последующем терапевтическом применении (таблица 9).

6 изученных штаммов не проявляли или проявляли незначительную протеолитическую активность (<15 Е) в отношении азоказеина. Из них *A. amstelodami* продемонстрировал довольно высокие значения фибриногено- и гемоглинолитических активностей при росте на ферментационной среде 2 (ФС2), и чуть меньшие соответствующие активности при росте на ФС1. Протеазы *A. europaeus* после роста на ФС2 обладали способностью расщеплять гемоглибин. Культуральная жидкость *A. glaucus* после культивирования на ФС1 продемонстрировала специфичность в отношении фибриногена, что является положительным фактором для последующей разработки препарата, кроме того, при поверхностном культивировании данный штамм также показал одно из самых высоких значений фибринолитической активности. Протеазы *A. proliferans*, секретлируемые при росте на ФС1, были высокоактивны в отношении гемоглибина, меньшая гемоглинолитическая активность наблюдалась при культивировании этого вида на ФС2. *A. protuberus* выделял высокоактивные гемоглинолитики при росте на обеих средах и фибриногенолитики при росте на ФС2. *A. ruber* продемонстрировал фибриногенолитическую активность секретлируемых протеаз вне зависимости от среды роста и гемоглинолитическую активность после культивирования на ФС2.

Таблица 9. Протеолитическая активность культуральных жидкостей штаммов исследуемых видов по отношению к разным белкам

(данные представлены в виде «среднее значение±стандартное отклонение», n=3)

Микромицет	Ф С	Протеолитическая активность по отношению к конкретному белку, Е				
		Азоказеин, рН 8,2	Азоказеин, рН 5,5	Голубой фибрин	Фибриноген	Гемоглобин
<i>A. amstelodami</i> W/N	1	0,00	0,00	0,00	47,99±2,38	25,68±1,19
	2	0,00	0,00	7,1±2,12	107,78±38,67	95,35±32,44
<i>A. athecium</i> W/N	1	14,50±2,69	27,60±1,13	0,00	0,00	29,89±12,50
	2	18,95±2,90	72,05±1,34	0,00	105,46±41,38	22,94±4,47
<i>A. aureolatus</i> BEOFB3320m	1	133,00±6,93	84,95±0,50	0,00	86,31±5,36	146,51±42,27
	2	153,75±4,17	108,3±1,41	0,00	250,50±13,10	0,00
<i>A. caespitosus</i> K Air-29	1	28,35±0,35	2,55±0,50	0,00	0,00	29,26±0,30
	2	10,75±0,92	12,15±0,21	0,00	32,63±10,42	84,20±3,57
<i>A. calidoustus</i> BEOFB3220m	1	0,00	6,55±0,50	8,65±1,91	0,00	0,00
	2	31,65±0,49	10,95±1,48	5,20±0,71	0,00	205,87±4,17
<i>A. creber</i> BEOFB3250m	1	1,27±1,20	15,05±2,78	4,10±3,00	4,84±3,27	0,00
	2	72,65±0,35	38,65±3,04	6,15±0,92	59,57±12,80	72,83±22,62

<i>A. domesticus</i> BEOFB3270m	1	43,70±1,70	12,45±0,78	2,33±1,65	34,31±15,77	9,05±3,27
	2	20,35±0,50	2,75±0,07	0,00	42,31±1,49	13,89±1,79
<i>A. europaeus</i> BEOFB382m	1	0,00	11,90±1,41	0,00	0,00	0,00
	2	0,00	1,77±1,25	0,00	0,00	33,89±19,34
<i>A. glaucus</i> W/N	1	0,00	0,00	4,24±3,00	58,52±7,14	0,00
	2	0,00	0,00	1,77±1,25	17,26±4,17	0,00
<i>A. jensenii</i> BEOFB3200m	1	17,00±2,26	3,75±0,50	11,15±5,87	39,15±14,29	26,52±8,93
	2	8,05±1,34	4,05±0,07	11,9±3,82	22,94±1,49	0,00
<i>A. melleus</i> BEOFB3180m	1	37,75±10,39	47,8±3,11	7,40±2,97	0,00	8,21±2,68
	2	25,85±1,63	90,75±4,31	5,25±4,74	134,72±11,90	123,77±5,95
<i>A. penicilloides</i> BEOFB3190m	1	2,55±2,19	18,80±0,42	5,50±2,12	0,00	39,57±20,83
	2	0,00	10,25±0,21	0,00	21,26±12,21	0,00
<i>A. phoenicis</i> W/N	1	5,65±1,48	1,95±1,34	3,35±2,33	59,99±6,85	0,00
	2	27,20±1,27	0,00	11,5±3,15	8,42±1,19	7,79±3,87
<i>A. proliferans</i> BEOFB3280m	1	2,60±0,99	10,85±3,46	0,00	0,00	103,78±32,45
	2	0,00	10,50±1,27	0,00	0,00	23,79±2,08
<i>A. protuberus</i> BEOFB3240m	1	0,00	7,95±0,21	0,00	0,00	105,25±9,53
	2	0,00	12,40±0,42	0,00	113,88±0,89	154,72±5,066

<i>A. pseudoglaucus</i> BEOFB3170m	1	27,05±7,99	0,00	15,15±5,30	21,26±2,08	0,00
	2	2,70±1,40	0,00	11,8±4,95	33,89±13,40	0,00
<i>A. ruber</i> BEOFB3150m	1	0,00	2,76±1,95	2,85±0,07	67,78±7,59	0,00
	2	0,00	3,10±0,42	0,00	48,63±12,80	77,46±9,53
<i>A. tabacinus</i> BEOFB3260m	1	29,95±4,17	34,00±6,79	6,50±3,11	54,31±5,88	72,41±24,41
	2	11,35±0,64	26,60±0,41	5,20±2,55	10,53±4,17	5,47±1,79
<i>A. tamaritii</i> W/N	1	6,30±2,40	6,25±1,63	0,00	0,00	11,79±8,33
	2	27,05±0,64	20,90±0,71	15,10±4,50	4,21±0,60	13,68±3,87
<i>A. tennesseensis</i> BEOFB3310m	1	21,45±1,77	12,40±1,41	10,35±5,02	16,21±4,47	0,00
	2	77,30±2,55	38,15±3,04	0,00	169,13±15,78	167,98±23,20
<i>A. tubingensis</i> BEOFB3300m	1	21,55±0,92	16,10±0,28	5,80±0,42	155,35±11,91	60,62±20,24
	2	32,70±2,97	0,00	2,70±0,99	16,00±4,76	51,15±9,23
<i>A. wentii</i> W/N	1	47,55±2,47	33,40±9,62	8,49±6,00	0,00	127,14±31,55
	2	6,15±0,07	18,95±0,64	0,00	17,89±6,25	26,10±1,19

4 изученных вида демонстрировали лучшую азоказеинолитическую активность в слабокислой среде. Из них *A. athecus* показал очень высокую фибринолитическую активность при росте на ФС2, которая, однако, сопровождалась средне выраженной гемоглинолитической активностью. Отсутствие фибринолизиса, но присутствие гемоглинолизиса в культуральной жидкости после роста на среде 1 может свидетельствовать о том, что данные активности свойственны разным протеазам. Протеазы *A. melleus* были высокоактивны в отношении фибриногена и гемоглинолизиса после культивирования на ФС2, а протеазы *A. tabacinus*, напротив, вызывали фибрино- и гемоглинолизис после роста на среде 1. Культуральная жидкость *A. penicilloides* после роста на ФС1 гидролизовала гемоглинолизис, а после роста на ФС2 – фибриноген.

8 изученных видов демонстрировали наибольшую азоказеинолитическую активность в слабощелочной среде. Из них *A. domesticus*, *A. jensenii*, *A. pseudoglaucus* проявляли средневыраженную фибринолитическую активность на обеих средах, при этом *A. pseudoglaucus* не обладал способностью гемоглинолизиса, *A. domesticus* демонстрировал низкую активность в отношении гемоглинолизиса, а культуральная жидкость *A. jensenii* проявляла такую активность только после среды 1. *A. phoenicis* проявлял фибринолитическую активность без расщепления гемоглинолизиса при культивировании на ФС1. *A. aureolatus*, *A. tennesseensis*, *A. tubingensis* обладали крайне высокими (>150 Е) значениями фибринолитической активности при росте на ФС2 и ФС1, соответственно. Во всех данных случаях также был обнаружен гемоглинолизис. *A. tamaris* продемонстрировал крайне незначительную активность по отношению к фибриногену.

рН-оптимум азоказеинолитической активности *A. caespitosus*, *A. calidoustus*, *A. creber*, *A. wentii* зависел от среды культивирования, что может свидетельствовать о секреции разных протеаз или разных изоформ протеаз на разных средах. *A. caespitosus* и *A. creber* активно расщепляли фибриноген и гемоглинолизис после роста на ФС2. *A. calidoustus* показал очень высокую гемоглинолитическую активность

при культивировании на ФС2, а *A. wentii* показал очень высокую гемоглинолитическую активность при культивировании на ФС1.

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* [239]. Самую высокую фибринолитическую активность показали *A. pseudoglaucus* и *A. tamarii*.

### 3.3. Амидолитическая активность штаммов при глубинном культивировании

Первичный скрининг продуцентов фибрино- и фибриногенолитических протеаз можно производить, оценивая способность секретируемых 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 (субстраты Chromozym TH, S-2238), фактора Ха (S-2765, S-2222), протеина С (S-2366), также использовали субстраты ферментов фибринолиза плазмина (S-2251) и урокиназы (S-2444).

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

Секретируемые протеазы *A. aureolatus* и *A. tenesseensis* более активны после культивирования на ФС2 и способны эффективно расщеплять субстраты Chromozym TH, S-2251, S-2765, S-2444, S-2366, что говорит о низкой субстратной специфичности выделяемых ферментов этих штаммов. Низкая субстратная специфичность протеаз *A. aureolatus* также была показана в эксперименте по измерению энзиматических индексов.

Выделяемые ферменты *A. creber*, *A. jensenii* и *A. melleus* более активны после культивирования на ФС2 и способны эффективно расщеплять Chromozym ТН. Культуральные жидкости *A. creber* и *A. jensenii* также активны по отношению к S-2366 и S-2765, *A. melleus* – к S-2251. Секретируемые протеазы *A. tabacinus* более активны после роста штамма на ФС1 и способны расщеплять Chromozym ТН, S-2765, S-2366 и чуть хуже S-2238, S-2444. *A. protuberus* после культивирования на ФС1 выделял протеазы, активные по отношению к S-2238, S-2765 и в большей степени к 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 (таблица 11), 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 [233].

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 ФС2, его активность по отношению к S-2366 составила более  $40 \text{ E} \times 10^{-3}$ .

Таблица 10. Прямые активности культуральных жидкостей штаммов исследуемых видов по отношению к хромогенным пептидным субстратам

(данные представлены в виде «среднее значение±стандартное отклонение», n=3)

Микромицет	ФС	Амидолитическая активность по отношению к конкретному субстрату, Е×10 <sup>-3</sup>						
		Chromozym TH	S-2238	S-2251	S-2765	S-2222	S-2444	S-2366
<i>A. amstelodami</i> W/N	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>A. athecium</i> W/N	1	0,00	0,00	0,00	0,00	5,77±2,70	0,00	0,00
	2	2,58±0,32	0,00	2,93±0,03	1,07±0,44	0,00	0,00	2,78±0,32
<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. caespitosus</i> K Air-29	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>A. calidoustus</i> BEOFB3220m	1	2,55±0,17	0,00	2,64±0,73	3,51±0,38	7,69±0,20	0,00	7,66±0,64
	2	6,84±1,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	9,74±0,99
<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. domesticus</i> BEOFB3270m	1	0,00	0,00	0,00	2,49±0,45	2,64±1,02	0,00	0,00
	2	0,00	8,00±1,62	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>A. europaeus</i> BEOFB382m	1	0,00	3,02±0,22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	0,00	2,52±0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>A. glaucus</i> W/N	1	0,00	0,00	9,89±1,54	0,00	0,00	5,89±0,03	7,92±0,84
	2	7,19±1,86	6,50±1,39	15,60±1,33	7,48±0,10	0,00	8,50±0,55	8,70±0,15
<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. penicilloides</i> BEOFB3190m	1	2,49±0,52	0,00	0,00	3,34±0,03	2,84±0,17	0,00	0,00
	2	0,00	0,00	0,00	2,58±0,03	2,49±0,17	0,00	0,00
<i>A. phoenicis</i> W/N	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>A. proliferans</i> BEOFB3280m	1	0,00	0,00	0,00	4,15±0,90	0,00	0,00	4,29±0,06
	2	3,68±0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	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. pseudoglaucus</i> BEOFB3170m	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,51±0,06	0,00
	2	0,00	3,16±0,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<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. tamaritii</i> W/N	1	0,00	0,00	0,00	0,00	3,68±0,20	0,00	0,00
	2	5,42±0,20	3,54±0,46	10,41±3,86	0,00	0,00	0,00	0,00
<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
<i>A. tubingensis</i> BEOFB3300m	1	0,00	0,00	0,00	0,00	4,12±0,46	0,00	0,00
	2	4,47±0,46	12,59±10,61	3,02±0,87	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>A. wentii</i> W/N	1	6,06±0,61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Таблица 11. Активаторные активности культуральных жидкостей штаммов исследуемых видов по отношению к хромогенным пептидным субстратам

(данные представлены в виде «среднее значение±стандартное отклонение», n=3)

Микромицет	ФС	Амидолитическая активность по отношению к конкретному субстрату, E×10 <sup>-3</sup>						
		Chromozym ТН	S-2238	S-2251	S-2765	S-2222	S-2444	S-2366
<i>A. amstelodami</i> W/N	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>A. thecius</i> W/N	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,78±0,18	0,00
	2	14,97±0,99	4,35±1,48	0,00	3,07±0,32	0,00	0,00	0,00
<i>A. aureolatus</i> BEOFB3320m	1	–	0,00	–	–	0,00	–	–
	2	–	0,00	–	–	0,00	–	–
<i>A. caespitosus</i> K Air-29	1	6,56±0,97	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,28±0,41
	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>A. calidoustus</i> BEOFB3220m	1	0,00	0,00	3,97±0,29	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>A. creber</i> BEOFB3250m	1	0,00	5,39±0,26	0,00	0,00	0,00	4,76±0,14	0,00
	2	–	0,00	0,00	–	0,00	0,00	–

<i>A. domesticus</i> BEOFB3270m	1	3,02±0,12	2,76±0,21	2,81±0,32	5,10±0,96	13,28±0,51	0,00	0,00
	2	0,00	0,00	11,02±0,06	0,00	9,28±0,97	0,00	0,00
<i>A. europaeus</i> BEOFB382m	1	2,76±0,26	0,00	0,00	11,51±0,12	0,00	6,79±0,96	5,51±0,12
	2	3,98±1,50	0,00	0,00	10,03±0,87	0,00	0,00	7,40±0,12
<i>A. glaucus</i> W/N	1	2,64±0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	0,00	0,00	–	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>A. jensenii</i> BEOFB3200m	1	–	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	–
	2	–	0,00	0,00	–	0,00	0,00	–
<i>A. melleus</i> BEOFB3180m	1	–	2,73±0,27	–	0,00	5,34±0,52	0,00	0,00
	2	–	0,00	–	0,00	–	0,00	41,59±0,52
<i>A. penicilloides</i> BEOFB3190m	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>A. phoenicis</i> W/N	1	0,00	0,00	0,00	6,67±1,01	0,00	3,68±1,12	2,81±0,79
	2	0,00	7,16±1,02	0,00	3,07±0,15	0,00	0,00	5,28±0,13
<i>A. proliferans</i> BEOFB3280m	1	0,00	0,00	0,00	2,73±0,11	2,67±0,96	0,00	0,00
	2	5,57±0,58	4,12±0,11	0,00	2,70±0,38	4,52±0,25	3,97±0,84	0,00
<i>A. protuberus</i> BEOFB3240m	1	0,00	–	0,00	–	0,00	6,73±0,45	–
	2	0,00	0,00	0,00	3,83±0,26	0,00	3,92±0,23	–

<i>A. pseudoglaucus</i> BEOFB3170m	1	4,35±0,29	5,25±0,25	2,87±2,15	10,99±0,98	0,00	0,00	0,00
	2	2,84±0,06	2,81±0,30	0,00	3,10±0,36	0,00	0,00	3,68±0,73
<i>A. ruber</i> BEOFB3150m	1	0,00	0,00	0,00	5,02±0,95	0,00	3,02±0,06	–
	2	6,70±0,08	0,00	0,00	11,57±0,21	0,00	4,18±0,72	–
<i>A. tabacinus</i> BEOFB3260m	1	–	–	0,00	–	0,00	–	–
	2	0,00	0,00	0,00	0,00	4,00±0,14	0,00	0,00
<i>A. tamaritii</i> W/N	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,29±1,00	2,78±2,78
	2	0,00	0,00	0,00	4,06±1,08	0,00	0,00	0,00
<i>A. tennesseensis</i> BEOFB3310m	1	–	0,00	–	–	0,00	0,00	–
	2	–	0,00	–	–	0,00	–	–
<i>A. tubingensis</i> BEOFB3300m	1	0,00	2,84±0,14	0,00	3,92±0,48	9,19±0,47	4,32±0,36	0,00
	2	2,49±0,19	0,00	0,00	3,13±0,12	4,29±0,16	2,93±0,24	2,64±0,12
<i>A. wentii</i> W/N	1	0,00	0,00	0,00	0,00	3,25±0,23	0,00	0,00
	2	10,20±0,43	0,00	0,00	0,00	0,00	3,60±0,02	0,00

### 3.4. Фибринолитическая и активаторная к плазминогену активности штаммов

Измерение фибринолитической и активаторной к плазминогену активностей по методу фибриновых пластин Аструпа – Мюллерца – Лассена (таблица 12) позволяет исследовать эти ферментативные активности в системе, имитирующей настоящий фибриновый сгусток, в то время как измерение активности по отношению к голубому фибрину или субстратам плазмина (S-2251) и урокиназы (S-2444) позволяет изучить ферментативные активности только в растворе или в коллоидном растворе в случае голубого фибрина.

Таблица 12. Фибринолитические и активаторные к плазминогену активности штаммов исследуемых видов, измеренные методом фибриновых пластин (данные представлены в виде «среднее значение±стандартное отклонение», n=3)

Микромицет	ФС	Фибринолитическая активность, Е	Активаторная к плазминогену активность, Е
<i>A. amstelodami</i> W/N	1	0,00	0,00
	2	0,00	0,00
<i>A. athecicus</i> W/N	1	174,82±16,48	36,4±2,35
	2	174,83±16,48	304,69±0,00
<i>A. aureolatus</i> BEOFB3320m	1	519,48±30,61	0,00
	2	385,03±25,31	162,01±2,42
<i>A. caespitosus</i> K Air-29	1	241,43±40,03	59,94±24,74
	2	141,53±30,61	99,89±40,04
<i>A. calidoustus</i> BEOFB3220m	1	0,00	0,00
	2	0,00	68,27±21,19
<i>A. creber</i> BEOFB3250m	1	0,00	0,00
	2	198,14±16,48	163,17±32,96
<i>A. domesticus</i> BEOFB3270m	1	0,00	0,00
	2	0,00	0,00
<i>A. europaeus</i> BEOFB382m	1	0,00	48,29±2,35
	2	91,58±11,77	164,83±49,45

<i>A. glaucus</i> W/N	1	0,00	0,00
	2	0,00	0,00
<i>A. jensenii</i> BEOFB3200m	1	0,00	0,00
	2	0,00	0,00
<i>A. melleus</i> BEOFB3180m	1	273,06±84,77	0,00
	2	510,32±43,56	176,49±42,38
<i>A. penicilloides</i> BEOFB3190m	1	0,00	83,25±11,77
	2	0,00	86,58±47,09
<i>A. phoenicis</i> W/N	1	102,40±38,85	44,95±5,33
	2	0,00	0,00
<i>A. proliferans</i> BEOFB3280m	1	0,00	0,00
	2	0,00	0,00
<i>A. protuberus</i> BEOFB3240m	1	0,00	29,97±7,06
	2	188,15±35,32	241,43±40,03
<i>A. pseudoglaucus</i> BEOFB3170m	1	0,00	0,00
	2	0,00	0,00
<i>A. ruber</i> BEOFB3150m	1	0,00	53,28±0,00
	2	0,00	87,41±9,42
<i>A. tabacinus</i> BEOFB3260m	1	168,17±7,06	49,95±0,00
	2	0,00	0,00
<i>A. tamaritii</i> W/N	1	0,00	109,89±14,13
	2	83,25±0,00	129,87±0,00
<i>A. tennesseensis</i> BEOFB3310m	1	135,70±22,37	0,00
	2	316,77±22,96	151,52±2,35
<i>A. tubingensis</i> BEOFB3300m	1	477,52±2,83	245,59±34,14
	2	241,43±40,03	0,00
<i>A. wentii</i> W/N	1	0,00	53,28±0,00
	2	83,25±0,00	11,67±8,33

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 представляют практического интереса, так как не проявляют способности к лизису в условиях реального фибринового сгустка.

### 3.5. 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 ( $>15$  Е) фибрино- и/или фибриногенолитическую активности;
- 3) по данным исследования амидолитической активности культуральных жидкостей перспективными продуцентами считались штаммы со значимой прямой или активаторной активностью в отношении субстрата протеина С ( $>15 \text{ Е} \times 10^{-3}$ );
- 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.

Результаты суммированы в таблице 13. Следует отметить, что отсутствие гемоглинолитической активности не было выбрано как критерий

перспективности штамма, так как такая активность может оказаться вредной *in vivo* только для пациентов с печёночными или другими заболеваниями, в ходе течения которых возможно появление свободного гемоглобина в крови.

Таблица 13. Выбор перспективного продуцента противотромботических протеаз. Красным выделены неперспективные продуценты, зелёным – перспективные

Критерий 1	Критерий 2	Критерий 3	Критерий 4
<i>A. amstelodami</i>	<i>A. amstelodami</i>	<i>A. amstelodami</i>	<i>A. amstelodami</i>
<i>A. athecium</i>	<i>A. athecium</i>	<i>A. athecium</i>	<i>A. athecium</i>
<i>A. aureolatus</i>	<i>A. aureolatus</i>	<i>A. aureolatus</i>	<i>A. aureolatus</i>
<i>A. caespitosus</i>	<i>A. caespitosus</i>	<i>A. caespitosus</i>	<i>A. caespitosus</i>
<i>A. calidoustus</i>	<i>A. calidoustus</i>	<i>A. calidoustus</i>	<i>A. calidoustus</i>
<i>A. creber</i>	<i>A. creber</i>	<i>A. creber</i>	<i>A. creber</i>
<i>A. domesticus</i>	<i>A. domesticus</i>	<i>A. domesticus</i>	<i>A. domesticus</i>
<i>A. europaeus</i>	<i>A. europaeus</i>	<i>A. europaeus</i>	<i>A. europaeus</i>
<i>A. glaucus</i>	<i>A. glaucus</i>	<i>A. glaucus</i>	<i>A. glaucus</i>
<i>A. jensenii</i>	<i>A. jensenii</i>	<i>A. jensenii</i>	<i>A. jensenii</i>
<i>A. melleus</i>	<i>A. melleus</i>	<i>A. melleus</i>	<i>A. melleus</i>
<i>A. penicilloides</i>	<i>A. penicilloides</i>	<i>A. penicilloides</i>	<i>A. penicilloides</i>
<i>A. phoenicis</i>	<i>A. phoenicis</i>	<i>A. phoenicis</i>	<i>A. phoenicis</i>
<i>A. proliferans</i>	<i>A. proliferans</i>	<i>A. proliferans</i>	<i>A. proliferans</i>
<i>A. protuberus</i>	<i>A. protuberus</i>	<i>A. protuberus</i>	<i>A. protuberus</i>
<i>A. pseudoglaucus</i>	<i>A. pseudoglaucus</i>	<i>A. pseudoglaucus</i>	<i>A. pseudoglaucus</i>
<i>A. ruber</i>	<i>A. ruber</i>	<i>A. ruber</i>	<i>A. ruber</i>
<i>A. tabacinus</i>	<i>A. tabacinus</i>	<i>A. tabacinus</i>	<i>A. tabacinus</i>
<i>A. tamaritii</i>	<i>A. tamaritii</i>	<i>A. tamaritii</i>	<i>A. tamaritii</i>
<i>A. tennesseensis</i>	<i>A. tennesseensis</i>	<i>A. tennesseensis</i>	<i>A. tennesseensis</i>
<i>A. tubingensis</i>	<i>A. tubingensis</i>	<i>A. tubingensis</i>	<i>A. tubingensis</i>
<i>A. wentii</i>	<i>A. wentii</i>	<i>A. wentii</i>	<i>A. wentii</i>

По таблице 13 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.

### 3.6. Динамика накопления протеаз *A. tabacinus* в культуральной жидкости

Для получения максимального выхода препарата протеолитических ферментов изучали динамику накопления протеаз в культуральной жидкости при росте *A. tabacinus* на разных ферментационных средах. Начиная со вторых суток культивирования на двух средах с начальным рН 7,0 при 28°C каждые 24 часа отбирали аликвоты культуральной жидкости и измеряли в них концентрацию белка как показатель роста культуры, азоказеинолитическую активность в качестве показателя общей активности протеаз и специфические активности по хромогенным пептидным субстратам, по отношению к которым культуральная жидкость была наиболее активна в экспериментах по скринингу (Chromozym ТН, S-2366).

При росте на ФС1 (рис. 9) максимальная активность по S-2366 была на пятые сутки культивирования ( $39 \text{ E} \times 10^{-3}$ ), по Chromozym ТН – на четвёртые сутки ( $22 \text{ E} \times 10^{-3}$ ), а азоказеинолитическая активность постепенно снижалась, начиная со вторых суток. При росте на ФС2 (рис. 10) 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), по азоказеинолитической активности было два локальных максимума – на шестые и десятые сутки. 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* [232]. Оптимальным для выделения препарата специфических протеаз *A. tabacinus* является культивирование на ФС2 в течение семи суток.

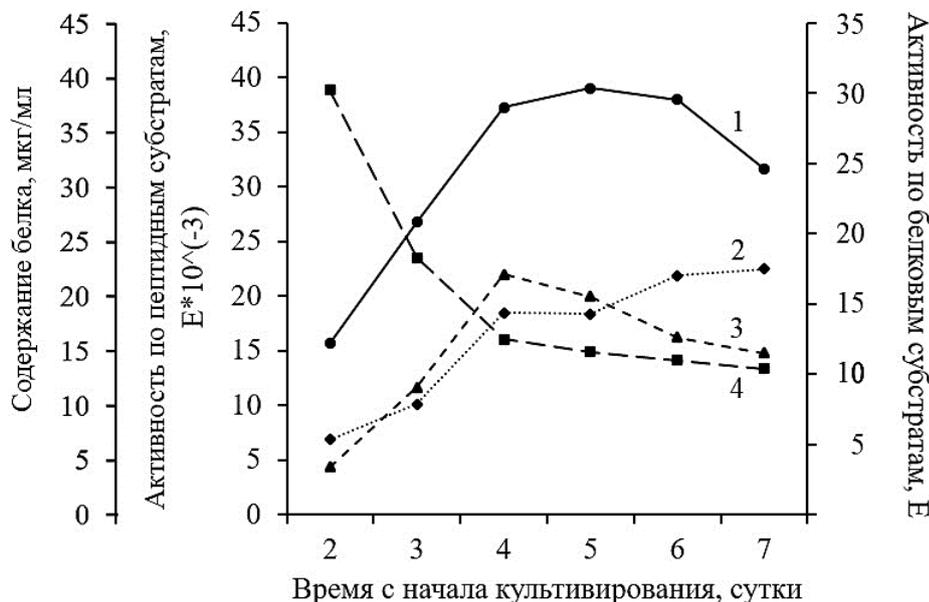


Рис. 9. Динамика накопления протеаз в культуральной жидкости при росте *A. tabacinus* на ФС1. 1 – активность по субстрату S-2366. 2 – концентрация белка. 3 – активность по субстрату Chromozym ТН. 4 – азоказеинолитическая активность

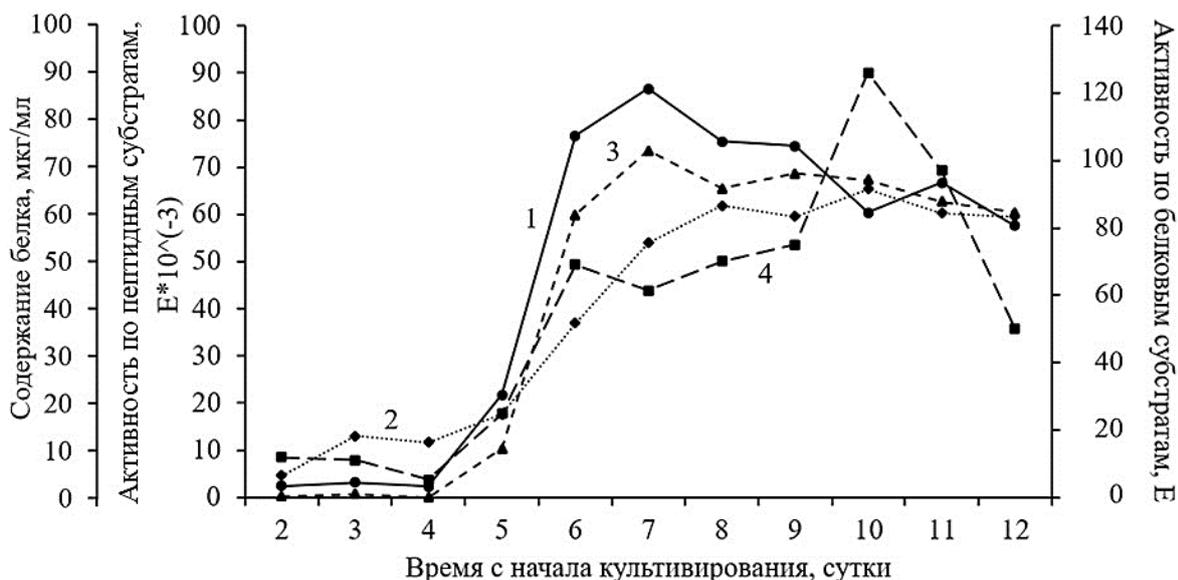


Рис. 10. Динамика накопления протеаз в культуральной жидкости при росте *A. tabacinus* на ФС2. 1 – активность по субстрату S-2366. 2 – концентрация белка. 3 – активность по субстрату Chromozym ТН. 4 – азоказеинолитическая активность

### 3.7. Влияние pH и температуры на продукцию протеаз

Исследование влияния pH и температуры на продукцию протеаз *A. tabacinus* проводили при культивировании на ФС2 в течение семи суток. Было обнаружено, что оптимальным начальным значением pH среды культивирования является 7-8 (рис. 11). При увеличении начального pH среды от 4 до 8 наблюдалось возрастание всех измеренных показателей: концентрации белка в семидневной культуральной жидкости, азоказеинолитической активности и активностей по отношению к Chromozym TH и S-2236. Однако между показателями для pH 7 и для pH 8 не было достоверной разницы.

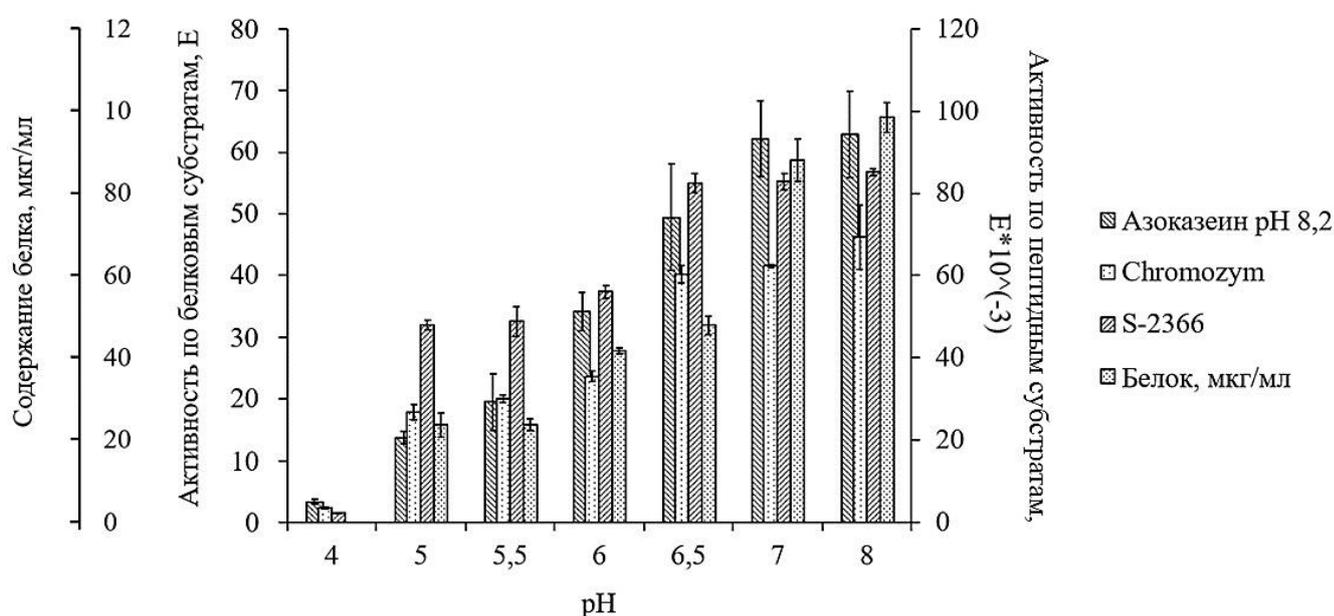


Рис. 11. Влияние pH ФС2 на продукцию протеаз *A. tabacinus*

Влияние температуры на продукцию протеаз *A. tabacinus* исследовали с использованием ФС2, начальное значение pH которой составляло 7. Спустя семь суток культивирования измеряли концентрацию белка в среде и активность по S-2366, далее рассчитывали удельную активность протеаз культуральной жидкости по данному субстрату. Было обнаружено, что оптимальной температурой для продукции протеаз является 28°C (рис. 12).

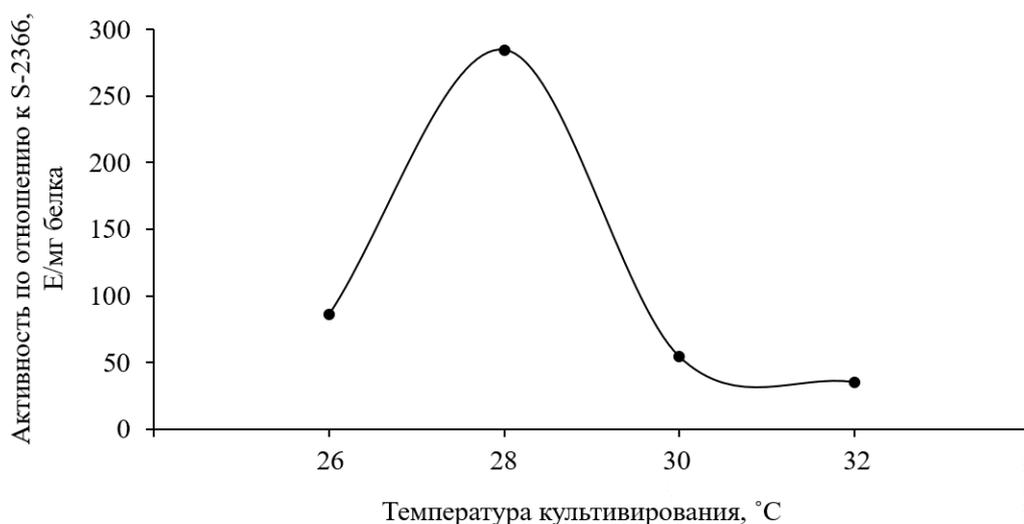


Рис. 12. Влияние температуры культивирования на ФС2 на продукцию протеаз *A. tabacinus*

### 3.8. Выделение и очистка протеазы

Секретируемая протеаза *A. tabacinus* была выделена из 2 л культуральной жидкости, полученных после семидневного культивирования штамма при подобранных выше условиях, и частично очищена с помощью последовательных процедур высаливания, диализа осажденных белков, лиофильной сушки препарата. Фибринолитическая активность полученного лиофильного препарата составила 779 Е/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 TH. Она соответствовала рН 2,9 и области наибольшей оптической плотности при 280 нм (рис. 13, 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 [240]. Вероятнее всего, исследуемая протеаза *A. tabacinus* является пигмент-ассоциированным белком. Активность фракции 3 по субстрату S-2366 составила  $81 \text{ Е} \times 10^{-3}$ , по субстрату Chromozym TH –  $69 \text{ Е} \times 10^{-3}$ .

По результатам изоэлектрофокусирования также был выявлен второй секретируемый протеолитический фермент, неактивный в отношении субстрата Chromozym TH, но активный в отношении S-2366 (рис. 13, 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.

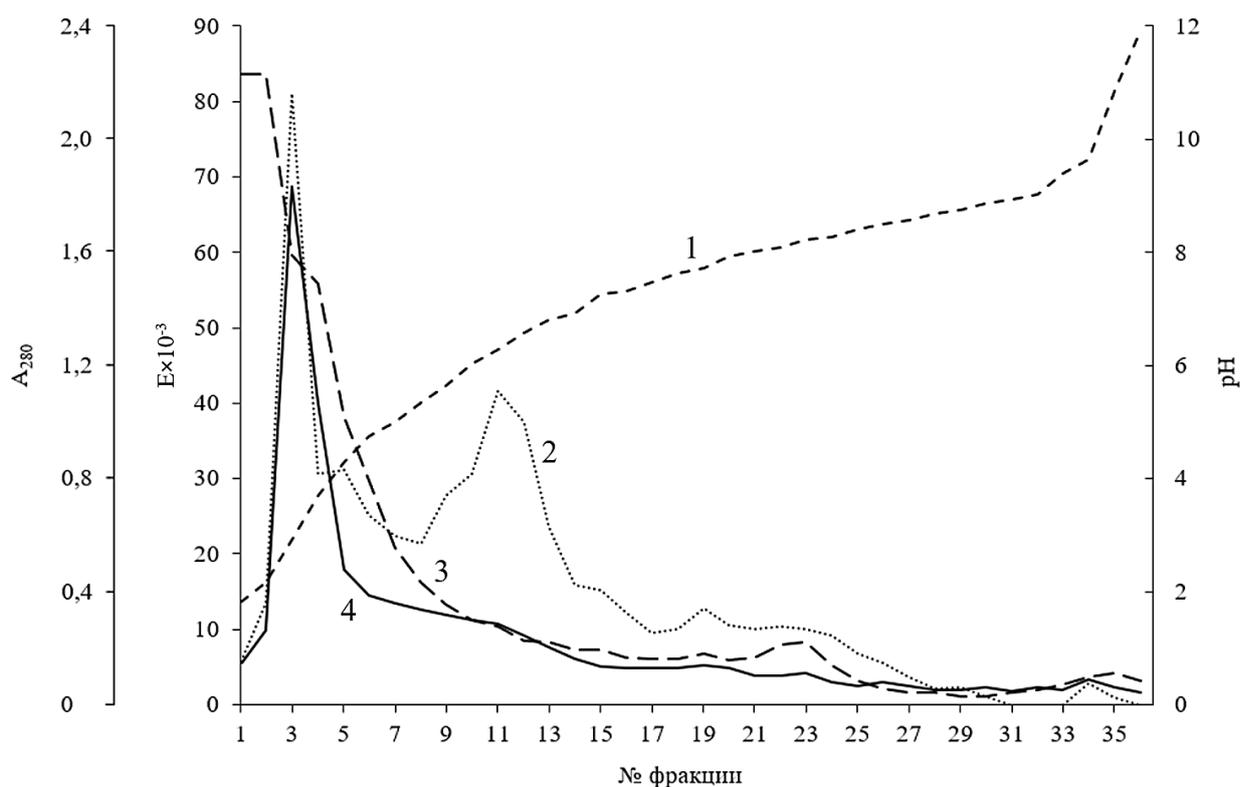


Рис. 13. Изоэлектрофокусирование внеклеточных белков культуральной жидкости *A. tabacinus*. 1 – pH. 2 – активность по отношению к субстрату S-2366 ( $\text{E} \times 10^{-3}$ ). 3 –  $A_{280}$ . 4 – активность по отношению к субстрату Chromozym TH ( $\text{E} \times 10^{-3}$ )

### 3.9. Электрофоретические исследования протеазы *A. tabacinus*

Электрофорез по Лэммли фракции 3 (после изоэлектрофокусирования) выявил наличие в ней нескольких белков (рис. 14, дорожка 1). Для идентификации протеолитически активного компонента была проведена казеиновая зимография (рис. 14, дорожка 3), по результатам которой во фракции была выявлена единственная протеаза молекулярной массой около 30 кДа. Выявление

гликозилированных белков проводили после денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (рис. 14, 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* [213], а также делает ее перспективным кандидатом для разработки препаратов протеолитических ферментов, так как гетерологичная экспрессия негликозилированных белков является более экономически выгодной.

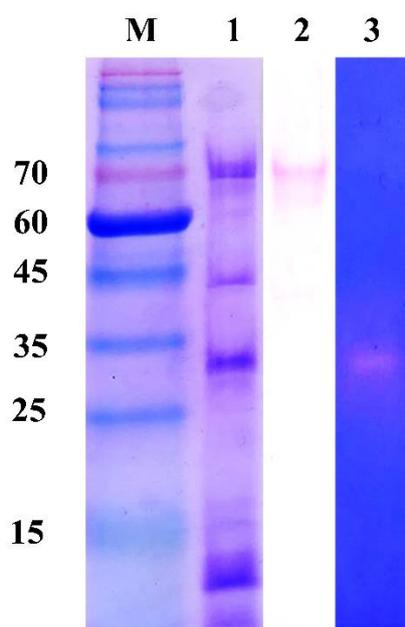


Рис. 14. Электрофоретический анализ внеклеточной протеазы *A. tabacinus* в ПААГ с ДСН-Na. М – маркеры, массы указаны в кДа. 1 – электрофореграмма по Лэммли. 2 – окраска на наличие углеводного компонента. 3 – казеиновая зимограмма

### 3.10. 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 (таблица 14), 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 плазминогена (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA). Изучаемый

фермент активно расщепляет субстраты, содержащие остаток аргинина в положении P1 и остаток пролина в положении P2. При этом замена аминокислотного остатка в положении P3 может изменять уровень амидолитической активности более, чем в два раза. Другой группой предпочтительных для фермента субстратов являются субстраты, содержащие остаток аргинина в положении P1 и остаток глицина в положении P2. В данном случае изменение аминокислотного остатка в положении P3 также сильно сказывается на активности. Единственным активно расщепляемым субстратом, содержащим остаток лизина в P1, является H-D-Val-Leu-Lys-pNA. Субстраты, не содержащие в положении P1 остатков аргинина или лизина, протеазой *A. tabacinus* не гидролизуются.

Таблица 14. Субстратная специфичность внеклеточной протеазы *A. tabacinus*

Субстрат	Амидолитическая активность, Е×10 <sup>-3</sup>
Tos-Gly-Pro-Arg-pNA	69,0
pGlu-Pro-Arg-pNA	81,7
H-D-Ile-Pro-Arg-pNA	24,0
pGlu-Gly-Arg-pNA	33,8
Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA	61,6
Ac-Leu-Gly-Arg-pNA	84,1
Bz-Ile-Glu(γ-OR)-Gly-Arg-pNA	9,0
H-D-Phe-Pip-Arg-pNA	11,1
Bz-Arg-pNA	1,5
H-D-Val-Leu-Lys-pNA	75,4
Z-Ala-Ala-Met-Lys-pNA	2,1
Z-Ala-Ala-Phe-Lys-pNA	5,1
For-Ala-Phe-Lys-pNA	5,0
Z-Gly-Gly-Leu-pNA	2,2
Ac-Phe-pNA	1,5

### 3.11. Ингибиторный анализ

Результаты ингибиторного анализа протеазы *A. tabacinus* представлены в таблице 15. Фермент устойчив к классическим ингибиторам цистеиновых (СМВ) и металлопротеаз (ЭДТА). Универсальный ингибитор сериновых протеаз PMSF и ингибиторы трипсин-подобных (ТЛСК) и химотрипсин-подобных протеаз (ТРСК) также не влияли на функционирование протеазы *A. tabacinus*, в то время как соевый ингибитор трипсина подавлял активность фермента в дозозависимой манере.

### 3.12. 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 10 (рис. 15). Интересно, что при значениях pH 8, 9 и 11 ферментативная активность снижается не более, чем на 5% от максимума, а при pH 7 и 12 не более, чем на 15% от максимума. Полученные результаты позволяют предположить, что исследуемый фермент является щелочной протеазой, что характерно для других протеаз, секретируемых микромицетами рода *Aspergillus* [241].

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. 16). 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 *Aspergillus* [242]. Следует отметить, что активность при других исследованных температурах (30°C, 37°C, 45°C) ниже, чем активность при 55°C не более, чем на 20%. Сохранение высокой ферментативной активности при температуре тела человека делает протеазу *A. tabacinus* перспективным кандидатом для разработки терапевтических препаратов.

Таблица 15. Ингибиторный анализ протеазы *A. tabacinus*

Ингибитор	Концентрация ингибитора	Относительная активность протеазы, %
PMSF	0,05 мМ	100
	0,5 мМ	
Соевый ингибитор трипсина	2,5 мкМ	34
	25 мкМ	10
TLCK	0,05 мМ	100
	0,5 мМ	
TPCK	0,05 мМ	100
	0,5 мМ	
СМВ	0,05 мМ	100
	0,5 мМ	
ЭДТА	0,1 мМ	100
	1 мМ	

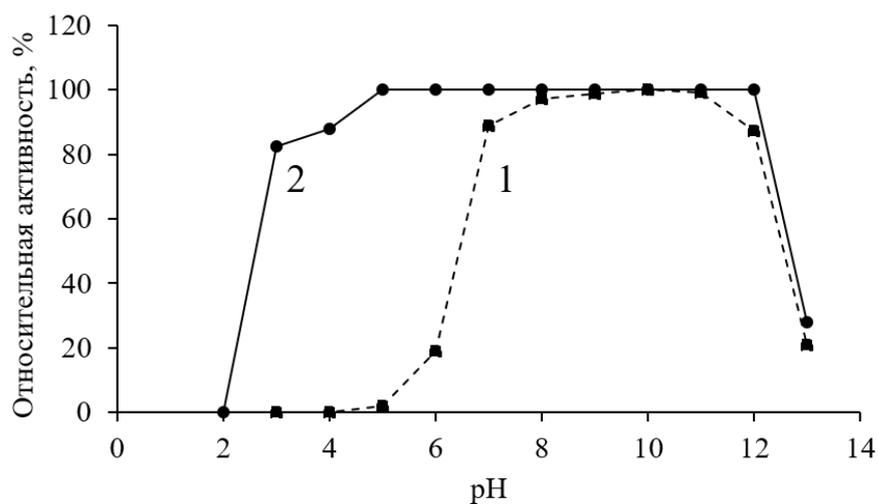


Рис. 15. Влияние pH на активность (1) и стабильность (2) протеазы *A. tabacinus*

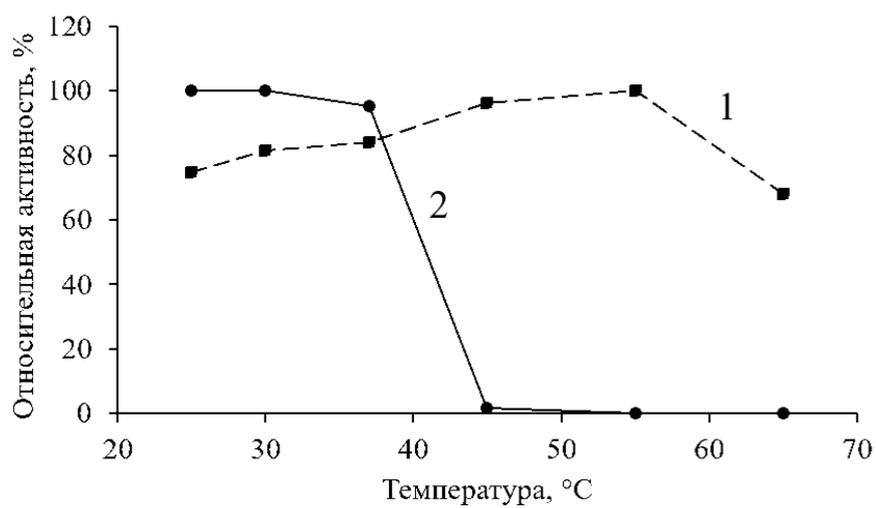


Рис. 16. Влияние температуры на активность (1) и стабильность (2) протеазы *A. tabacinus*

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Протеолитические ферменты играют очень важную роль в физиологии и биохимии живых организмов, в том числе и грибов. Функции внеклеточных протеаз крайне разнообразны: от деградации пептидных и белковых субстратов, необходимых для дальнейшего участия в обмене углерод-, азот- и серосодержащих соединений, до регуляции таких процессов жизненного цикла как образование спор [243] и конидий [244]. Помимо указанных функций, секретлируемые протеазы важны для установления и регулирования межвидовых отношений, например, межвидовой конкуренции и взаимоотношений в системе паразит-хозяин для патогенных видов [245].

Геномный анализ 7 ранее исследованных видов рода *Aspergillus* (*A. fisherianus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. terreus*) показал, что предполагаемое число генов в геноме одного вида составляет 10-12 тысяч, из которых чуть более 300 кодируют протеазы, причём, в зависимости от вида, примерно 40-60 генов соответствуют внеклеточным протеазам. Протеомным анализом удалось идентифицировать экспрессию около 20 внеклеточных протеаз для каждого вида при росте на определённой среде [246]. Такое обилие одновременно секретлируемых в культуральную жидкость протеолитических ферментов делает микровицеты рода *Aspergillus*, перспективным объектом для поиска протеаз с целевыми свойствами для медицины и биотехнологии.

Обилие экологических ниш, занимаемых микровицетами, и многообразие пептидных и белковых субстратов в окружающей среде создало условия для сильной диверсификации внеклеточных протеаз по субстратной специфичности. Так, показано, что даже для протеаз разных видов внутри рода *Aspergillus* строго консервативными являются только остатки каталитической триады или диады активного центра, в то время как остатки субстрат-связывающего кармана могут отличаться [247], что свидетельствует о специализации протеаз разных видов к различным белковым субстратам.

В настоящее время описано около 800 видов микровицетов рода *Aspergillus* из них полногеномные данные получены для 270 видов [248], однако

подтверждённые аминокислотные последовательности по данным базы SwissProt исследованы только для отдельных протеаз 13 видов рода *Aspergillus* (*A. awamori*, *A. clavatus*, *A. fischerianus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. phoenicis*, *A. pseudoglaucus*, *A. sojae*, *A. terreus*, *A. tubingensis*) [249]. Из этих видов только для четырёх (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. oryzae*, *A. terreus*) описана секреция протеаз с тромболитическими и антикоагулянтными свойствами [15, 204, 206-208, 214, 220, 221]. Для ещё восьми видов (*A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. japonicum*, *A. ochraceus*, *A. tamaritii*, *A. terricola*, *A. ustus*, *A. versicolor*) показана секреция белков с тромболитическими или антикоагулянтными свойствами, однако не для всех из них получены подтверждённые последовательности протеаз, структура и подробная биохимическая характеристика ферментов [209-231, 215-219].

Наличие различной субстратной специфичности у протеаз разных видов рода *Aspergillus*, обилие и повсеместное распространение представителей этого рода наряду с малой, в сравнении с количеством видов, изученностью свойств секретируемых протеаз делает исследование протеолитического потенциала новых видов *Aspergillus* актуальной научной задачей. Накопление большого количества данных о внеклеточных протеазах, включая их аминокислотные последовательности, поможет в дальнейшем сделать выводы об эволюции протеаз и их связи с филогенией рода *Aspergillus*. Помимо этого, представители данного рода являются классическими объектами биотехнологии, которые уже около столетия используются для продукции белков и вторичных метаболитов, что подразумевает налаженные схемы производства и отсутствие потенциальных затрат на разработку технологии получения целевого вещества из неизученного организма. Дополнительными плюсами выбора представителей рода *Aspergillus* в качестве продуцентов веществ для биотехнологии и медицины является наличие у некоторых видов, например *A. niger*, статуса безопасного для человека микроорганизма (GRAS) и возможность использования в качестве системы для гетерологичной экспрессии [250]. Таким образом, даже если вид-продуцент целевой протеазы не является безопасным для человека, то можно наладить экспрессию фермента в клетках *A. niger*, что будет сильно менее время- и

трудозатратно, чем налаживать продукцию белка в неродственной системе экспрессии.

Данная работа посвящена изучению протеолитического потенциала ранее не изученных штаммов 22 видов рода *Aspergillus*. Штаммы, использованные в работе, являются ксерофильными непатогенными микромицетами, большинство из которых были выделены из материалов древних склепов и гробниц [251, 252]. Выбор непатогенных штаммов объясняется тем, что направленная эволюция протеаз патогенов идёт по пути увеличения эффективности инфекции, соответственно, мутации, приводящие к изменению субстратной специфичности протеазы и возможности освоить новый питательный субстрат, но никак не влияющие на эффективность инфекции, скорее всего, не будут поддержаны отбором. В то время как в непатогенных видах мутации, позволяющие освоить новый питательный субстрат и повышающие приспособленность к среде, будут поддерживаться отбором. Таким образом, для поиска протеаз с ранее неизвестной субстратной специфичностью было решено использовать непатогенные штаммы. Более того, существование исследуемых ксерофильных штаммов на протяжении столетий в экстремальных условиях гробниц может свидетельствовать о широкой субстратной специфичности спектра секретлируемых ими ферментов, гидролизующих разные субстраты, включая человеческие останки и остатки одежды.

В рамках данной работы было исследовано по одному штамму для каждого представителя рода *Aspergillus*. Ранее на некоторых внеклеточных ферментах микромицетов, гидролизующих углеводы, было показано, что способность разлагать определённый субстрат является видовым, а не штаммовым свойством [253]. В то же время, согласно другим исследованиям [245], гены протеаз являются более консервативными, чем гены гидролаз углеводов, в связи с чем можно сделать вывод, что способность гидролизовать определённые белки, скорее всего, не может быть свойством отдельного штамма, а является свойством вида или хотя бы большого числа штаммов внутри вида, поэтому первичный скрининг

протеолитической активности неизученных видов рода *Aspergillus* был выполнен на одном штамме для каждого вида микромицета.

Несмотря на большое количество литературных сообщений о нахождении тромболитической активности у грибных протеаз (таблица 5), антикоагулянтных ферментов грибного происхождения описано очень мало: по таблице 5 можно увидеть всего 8 грибных протеаз с антикоагулянтной активностью, из которых только три секретируют представители рода *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. terreus*, *A. versicolor*). Поиск новых антикоагулянтных протеаз всё ещё является актуальной задачей, так как многие ферменты, проявляющую высокую активность *in vitro*, могут не пройти дальнейшие доклинические и клинические испытания по причине иммуногенности и/или токсичности, которые, нельзя предсказать до проведения соответствующих испытаний. По статистике только 12% разрабатываемых препаратов успешно проходит доклинические испытания, а из них только 60% успешно проходит первую фазу клинических [254], что приводит к необходимости изучения довольно большого числа ферментов из разных продуцентов до этапа перехода к доклиническим исследованиям.

Основной целью данной диссертационной работы был направленный поиск антикоагулянтных протеаз с протеин С-подобной активностью, но секреция микромицетом ферментов, проявляющих одновременно и антикоагулянтную, и тромболитическую активность, считалась ещё более ценным свойством. Единовременная секреция продуцентом протеазы или комплекса протеаз с этими активностями делает его перспективным для получения фармакологических препаратов, так как производство лекарства с двойным эффектом (разрушение тромбов и предотвращение образования новых) потребует меньше затрат, чем производство отдельно двух лекарств. В то же время в современной терапии пациентов с тромбозами приходится использовать как минимум два отдельных препарата: антикоагулянт и тромболитик.

Для скрининга протеолитической активности изучаемых микромицетов использовали различные белковые субстраты: казеин, азоказеин, желатин, кератин, гемоглобин, фибрин, фибриноген. Фибрино- и фибринолитическая активности

являлись целевыми свойствами, на поиск которых был направлен эксперимент, остальные субстраты использовались для анализа субстратной специфичности секретлируемого комплекса протеаз, так как широкая субстратная специфичность является нежелательным признаком при последующей разработке лекарственного препарата. Во избежание ложноотрицательных результатов по выявлению соответствующих активностей применялись разные методы исследования протеолитического потенциала: фибринолитическая активность была измерена по степени расщепления фибриногена на твёрдой среде при поверхностном культивировании, а также по расщеплению фибриногена в растворе культуральной жидкостью после глубинного культивирования микромицета. Для оценки прямой фибринолитической активности использовалось ещё большее количество методов: измерение по расщеплению фибрина на твёрдой среде при поверхностном культивировании, по расщеплению голубого фибрина в растворе культуральной жидкостью после глубинного культивирования микромицета, по расщеплению фибринового геля культуральной жидкостью после глубинного культивирования (метод фибриновых пластин), по расщеплению культуральной жидкостью пептидного субстрата плазмина – человеческой протеазы, осуществляющей фибринолиз. Непрямая фибринолитическая активность, то есть активаторная к плазминогену, оценивалась методом фибриновых пластин, а также по расщеплению культуральной жидкостью пептидного субстрата урокиназы – человеческого активатора плазминогена. Исследование протеолитического потенциала как при поверхностном, так и при глубинном культивировании необходимо, потому что спектр секретлируемых протеаз может меняться в зависимости от среды роста и от способа культивирования, что было показано для других представителей рода *Aspergillus* [246].

Результаты выявления фибрин(оген)олитической активности разными методами суммированы в таблице 16. Положительной активностью при поверхностном культивировании считалось значение энзиматического индекса (таблица 8) больше 1. Положительной активностью культуральной жидкости по отношению к белкам в растворе и пептидным субстратам считалось значение

активности хотя бы для одной ферментационной среды больше 15 Е (таблица 9) и больше  $15 \text{ Е} \times 10^{-3}$  (таблица 10) соответственно. Положительной активностью по методу фибриновых пластин считалась ненулевая активность (таблица 12) хотя бы на одной ферментационной среде. Принимая во внимание результаты по разным методам, суммированные в таблице 16, можно сказать, что из исследованных микромицетов фибриногенолитическая активность не обнаружилась только у *A. europaeus* и *A. proliferans*, прямая фибринолитическая – только у *A. penicilloides*, активаторная к плазминогену – у *A. amstelodami*, *A. domesticus*, *A. glaucus*, *A. jensenii*, *A. proliferans*, *A. pseudoglaucus*.

Для скрининга антикоагулянтной активности был использован пептидный субстрат активированного протеина С, так как этот белок является одним из ключевых компонентов противосвёртывающей системы человека. Помимо этого, были измерены активности культуральной жидкости микромицетов по отношению к двум пептидным субстратам фактора Ха и двум пептидным субстратам тромбина. Несмотря на то, что фактор Ха и тромбин являются основными коагулянтными протеазами плазмы крови человека, они образуют вместе с протеином С каскад последовательно активирующих друг друга за счёт ограниченного протеолиза ферментов. Таким образом, культуральная жидкость микромицета, обладающая, помимо протеин С-подобной активности, ещё и тромбин- и фактор Ха-подобной активностями, является потенциально более мощным противосвёртывающим средством.

Результаты исследования антикоагулянтной активности микромицетов суммированы в таблице 17. Положительным считалось значение активности хотя бы для одной ферментационной среды и для одного из двух пептидных субстратов в случае тромбиноподобной и фактор Ха-подобной активностей больше  $15 \text{ Е} \times 10^{-3}$  (таблица 10). Из таблицы 17 можно сделать вывод, что фактор Ха-, тромбиноподобная и протеин С-подобная активности обычно сопутствуют друг другу. Исключениями являются лишь вид *A. melleus*, который обладает только фактор Ха- и тромбиноподобной активностями, и вид *A. ruber*, проявляющий только протеин С-подобную активность.

Таблица 16. Фибриногено- и фибринолитическая активности исследованных микромицетов, измеренные разными методами

Микромицет	Расщепление фибриногена		Расщепление фибрина				Активация плазминогена	
	Поверхностное культивирование	Глубинное культивирование	Поверхностное	Глубинное культивирование	Метод фибриновых пластин	Плазмино-подобная активность	Метод фибриновых пластин	Урокиназа-подобная активность
<i>A. amstelodami</i> W/N	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>A. athecus</i> W/N	+	+	+	-	+	-	+	-
<i>A. aureolatus</i> BEOFB3320m	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>A. caespitosus</i> K Air-29	+	+	-	-	+	-	+	-
<i>A. calidoustus</i> BEOFB3220m	+	-	+	-	-	-	+	-
<i>A. creber</i> BEOFB3250m	+	+	+	-	+	-	+	-
<i>A. domesticus</i> BEOFB3270m	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>A. europaeus</i> BEOFB382m	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>A. glaucus</i> W/N	+	+	+	-	-	+	-	-

<i>A. jensenii</i> BEOFB3200m	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>A. melleus</i> BEOFB3180m	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>A. penicilloides</i> BEOFB3190m	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>A. phoenicis</i> W/N	-	+	-	-	+	-	+	-
<i>A. proliferans</i> BEOFB3280m	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>A. protuberus</i> BEOFB3240m	+	+	+	-	+	-	+	-
<i>A. pseudoglaucus</i> BEOFB3170m	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>A. ruber</i> BEOFB3150m	-	+	+	-	-	-	+	-
<i>A. tabacinus</i> BEOFB3260m	+	+	+	-	+	-	+	+
<i>A. tamarii</i> W/N	+	-	+	+	+	-	+	-
<i>A. tennesseensis</i> BEOFB3310m	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>A. tubingensis</i> BEOFB3300m	-	+	-	-	+	-	+	-
<i>A. wentii</i> W/N	-	+	+	-	+	-	+	-

Таблица 17. Антикоагулянтная активность исследованных микромицетов

<b>Микромицет</b>	<b>Фактор Ха- подобная активность</b>	<b>Тромбино- подобная активность</b>	<b>Протеин С- подобная активность</b>
<i>A. amstelodami</i> W/N	-	-	-
<i>A. athecium</i> W/N	-	-	-
<i>A. aureolatus</i> BEOFB3320m	+	+	+
<i>A. caespitosus</i> K Air-29	-	-	-
<i>A. calidoustus</i> BEOFB3220m	-	-	-
<i>A. creber</i> BEOFB3250m	+	+	+
<i>A. domesticus</i> BEOFB3270m	-	-	-
<i>A. europaeus</i> BEOFB382m	-	-	-
<i>A. glaucus</i> W/N	-	-	-
<i>A. jensenii</i> BEOFB3200m	+	+	+
<i>A. melleus</i> BEOFB3180m	+	+	-
<i>A. penicilloides</i> BEOFB3190m	-	-	-
<i>A. phoenicis</i> W/N	-	-	-
<i>A. proliferans</i> BEOFB3280m	-	-	-
<i>A. protuberus</i> BEOFB3240m	+	+	+
<i>A. pseudoglaucus</i> BEOFB3170m	-	-	-
<i>A. ruber</i> BEOFB3150m	-	-	+
<i>A. tabacinus</i> BEOFB3260m	+	+	+
<i>A. tamaritii</i> W/N	-	-	-
<i>A. tennesseensis</i> BEOFB3310m	+	+	+
<i>A. turingensis</i> BEOFB3300m	-	-	-
<i>A. wentii</i> W/N	-	-	-

Исследованные виды рода *Aspergillus* являются представителями 4 подродов, 8 секций и 13 серий (рис. 17), в то время как всего в роде насчитывается 6 подродов, 27 секций и 86 серий [255]. Положение на филогенетическом дереве изученных видов таких признаков, как фактор Ха-, тромбиноподобная и протеин С-подобная активности (рис. 18А, 18Б) показывает, что эти признаки есть у представителей серий *Versicolores* и *Speluncae* секции *Nidulantes*, которые составляют одну филогенетическую ветвь на изображённом дереве. Полученные результаты свидетельствуют о появлении подобной субстратной специфичности спектра секретируемых протеаз у общего предка исследованных видов секции *Nidulantes* и сохранении этой субстратной специфичности при дальнейшей диверсификации видов. Появление фактор Ха- и тромбиноподобной активности у *A. melleus* и протеин С-подобной активности у *A. ruber* являются независимыми эволюционными событиями, которые, например, могли быть следствием отдельных мутаций именно у перечисленных видов.

Среди ранее описанных видов рода *Aspergillus* – продуцентов антикоагулянтных протеаз (таблица 5) также был один представитель серии *Versicolores* секции *Nidulantes*, это *A. versicolor* [16], что подтверждает предположение о появлении антикоагулянтной активности у предка представителей данной серии. Другие ранее описанные продуценты *A. ochraceus* и *A. terreus* относятся, соответственно, к секциям *Circumdati* и *Terrei* подрода *Circumdati*. Однако секретируемые протеазы данных видов не проявляют самостоятельной антикоагулянтной активности, а являются лишь активаторами эндогенного протеина С человека [15], что подразумевает другую субстратную специфичность, которая может быть свойственна как раз представителям подрода *Circumdati*. Из исследованных в данной работе видов к секции *Circumdati* подрода *Circumdati* относится *A. melleus*, у которого также была обнаружена активаторная к человеческому протеину С активность (таблица 11).

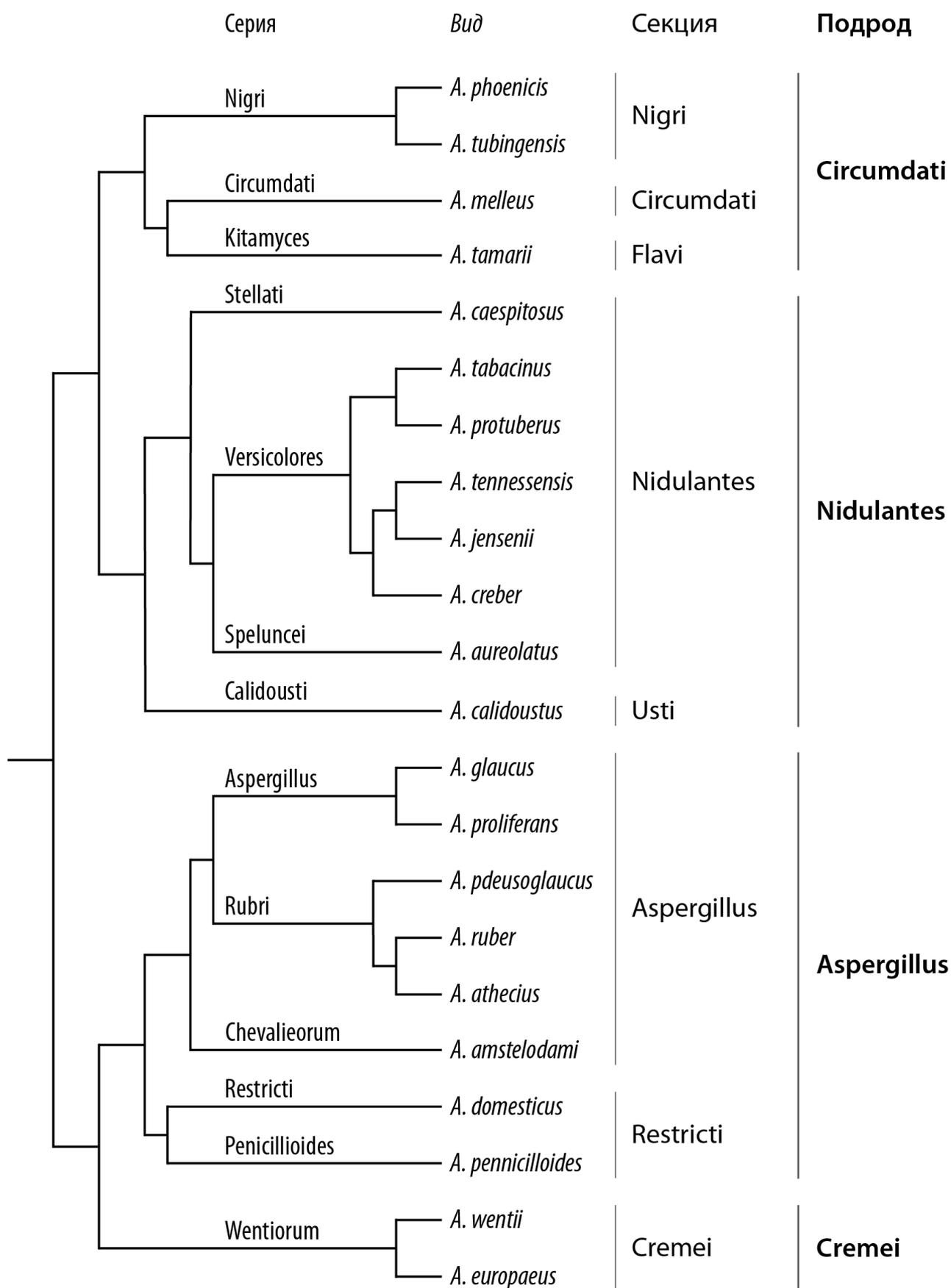
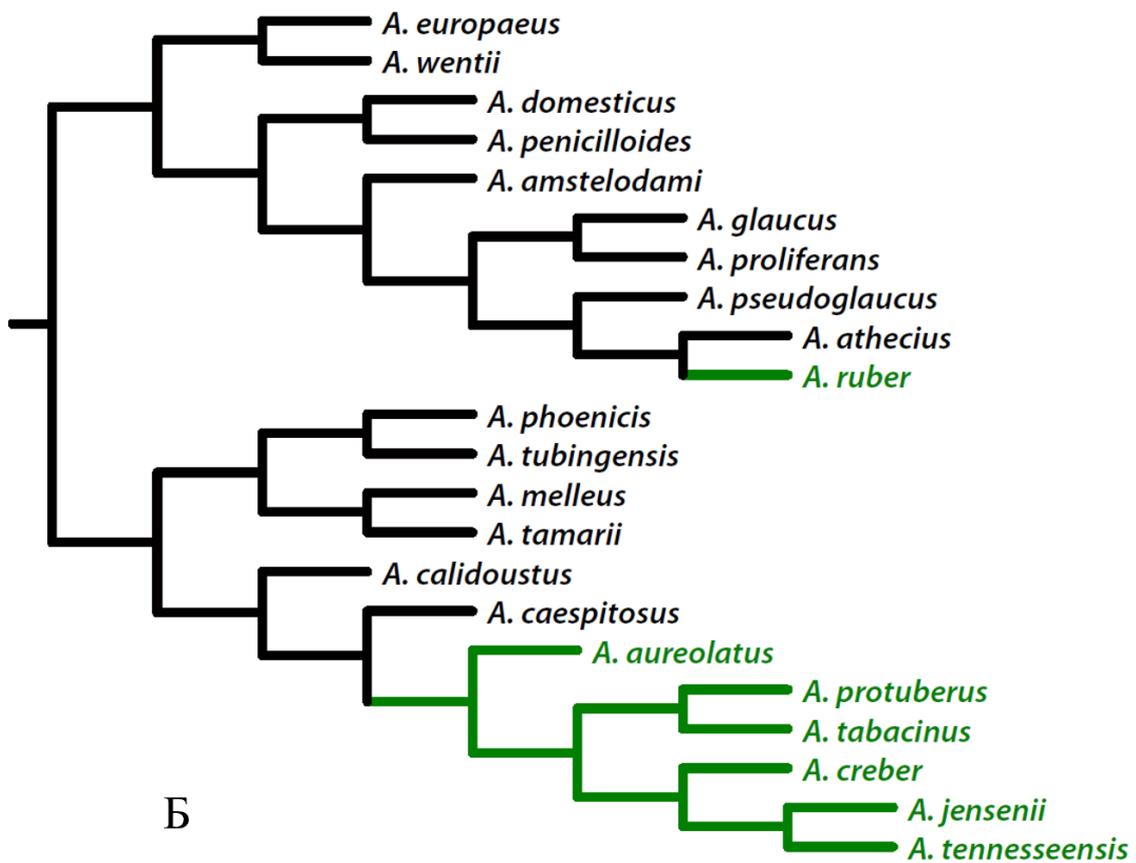
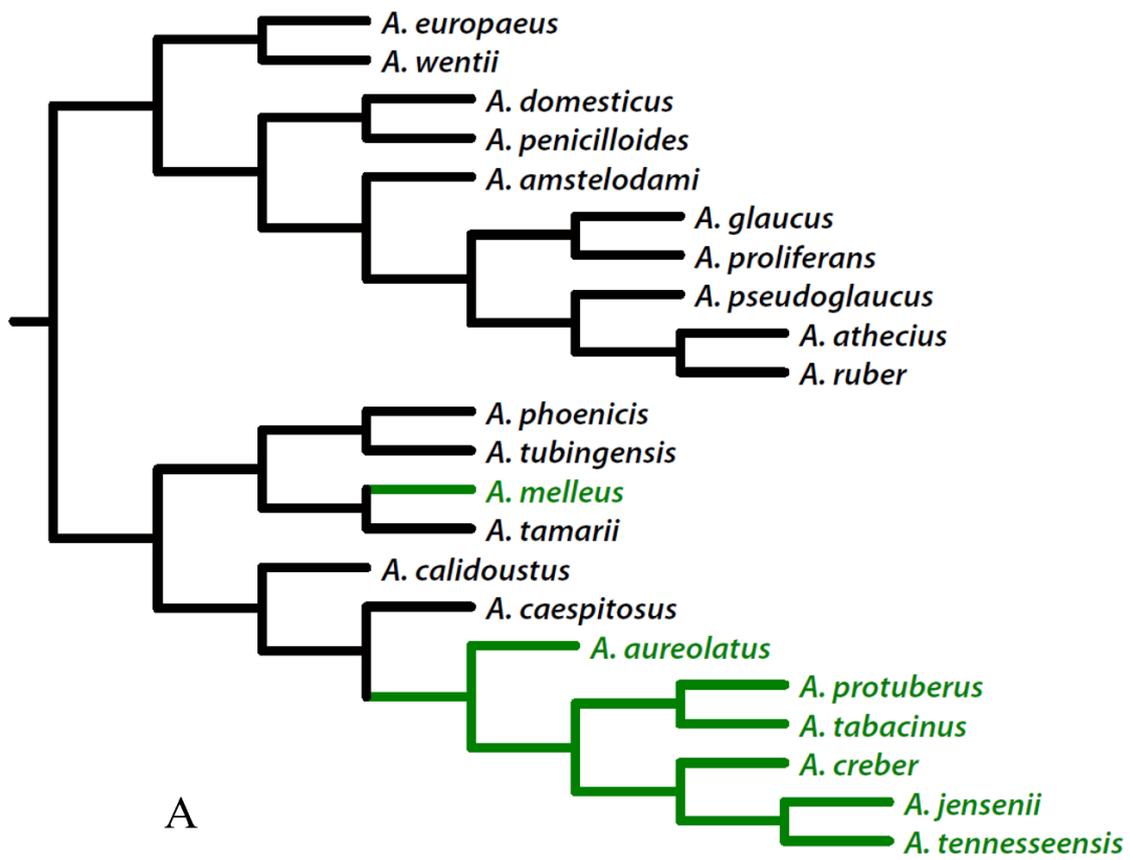
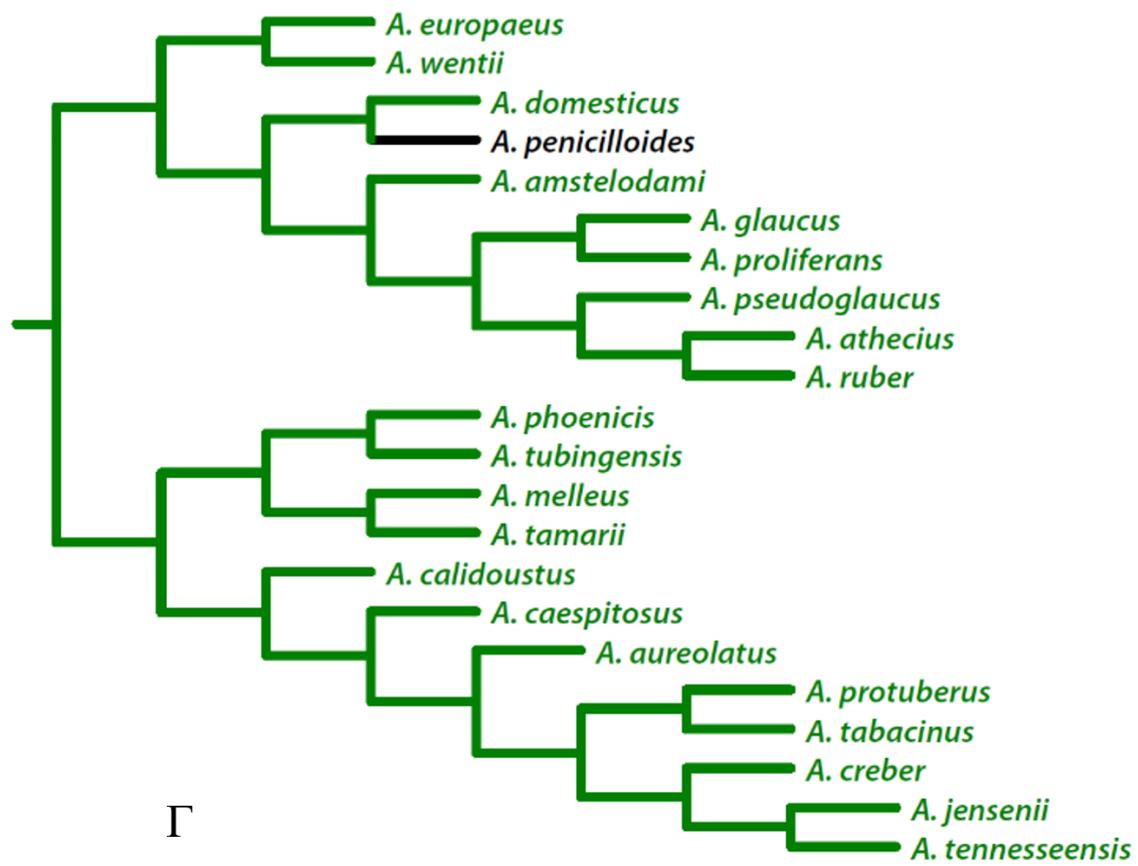
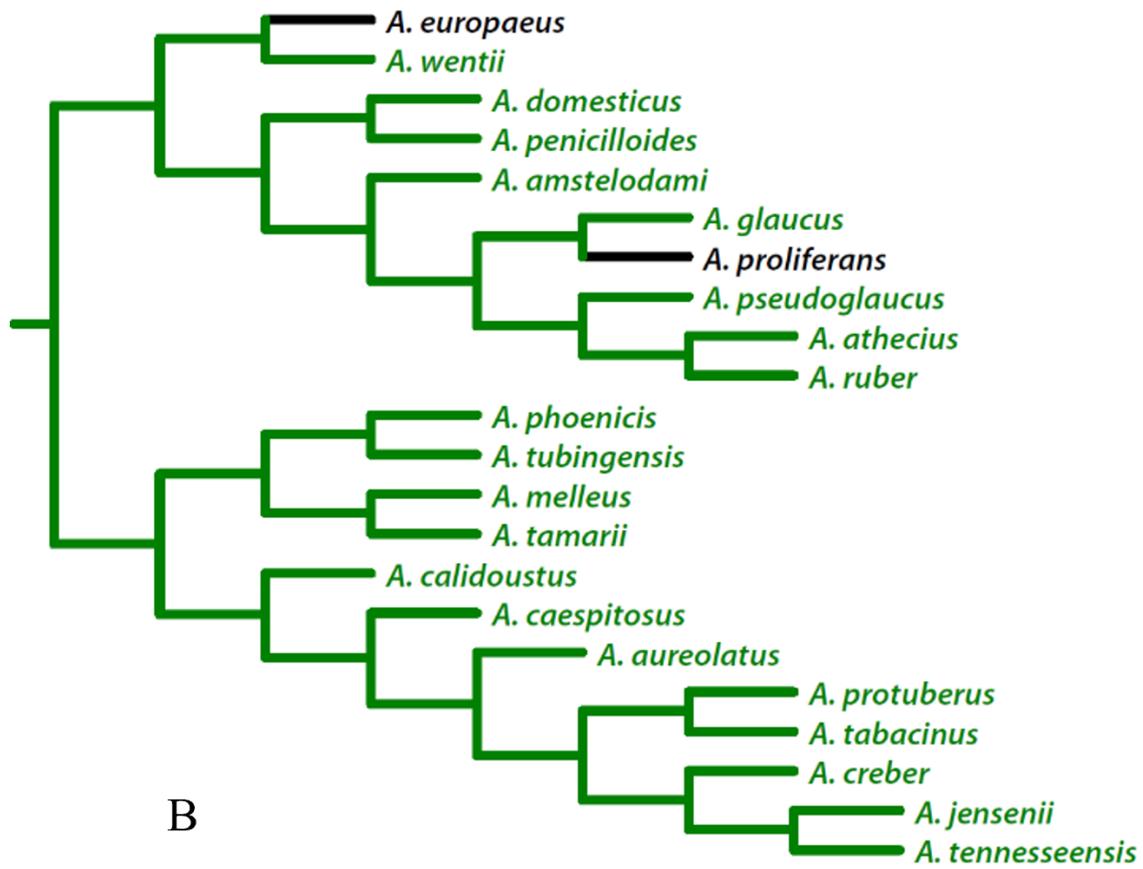


Рис. 17. Невзвешенное филогенетическое дерево исследованных видов рода *Aspergillus* [255, с изменениями]





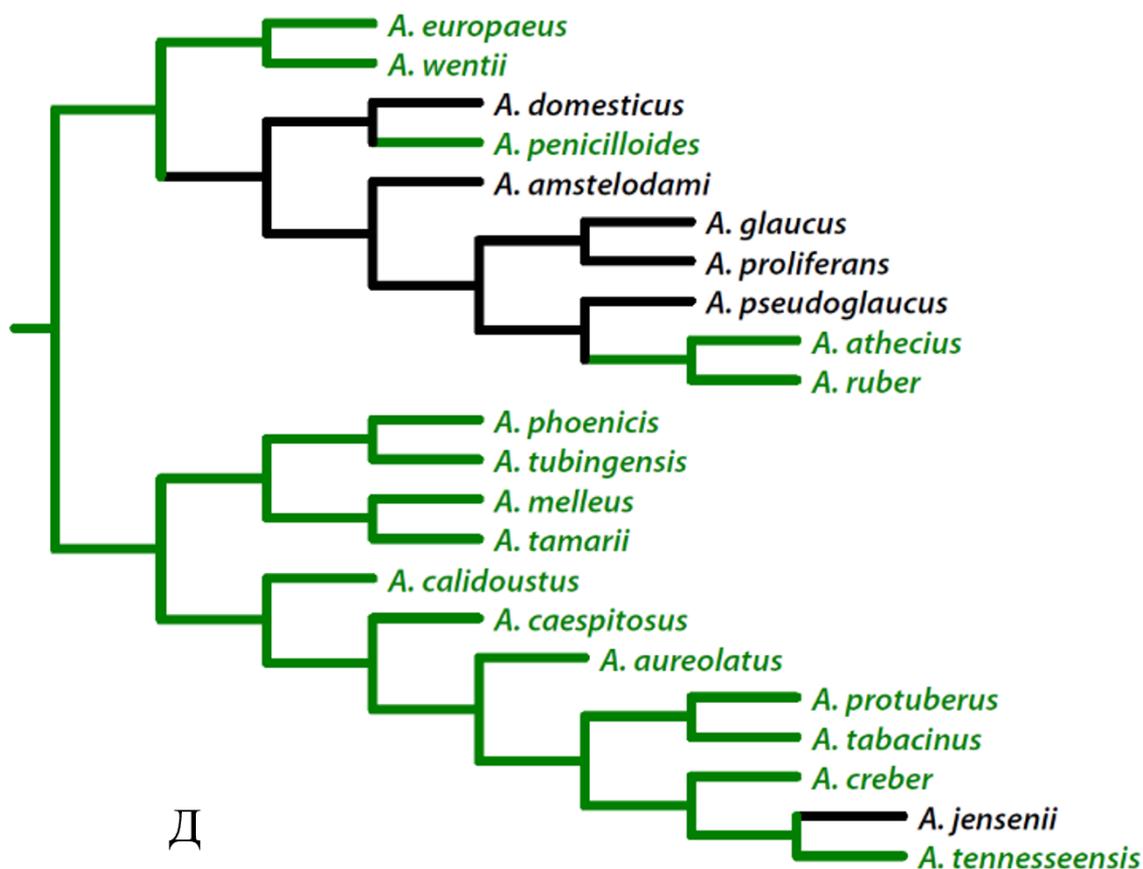


Рис. 18. Положение протеолитических активностей на филогенетическом древе исследованных представителей рода *Aspergillus*. Зелёный цвет означает наличие активности, чёрный – отсутствие. Активности: А – фактор Ха- и тромбиноподобная, Б – протеин С-подобная, В – фибринолитическая, Г – прямая фибринолитическая, Д – активаторная к плазминогену

В отличие от протеолитических активностей, связанных с потенциальной антикоагулянтной функцией ферментов, фибриногено- и фибринолитическая активности, судя по всему, свойственны большинству представителей рода *Aspergillus* (рис. 18В, 18Г). Только отдельные виды, видимо, вторично утратили в ходе эволюции способность гидролизовать фибриноген или фибрин. То же самое можно сказать об активаторной к плазминогену активности (рис. 18Д), которая отсутствует только у некоторых изученных представителей секций *Aspergillus* и *Restricti* подрода *Aspergillus*. Все три упомянутые активности позволяют протеазам осуществлять тромболитический процесс и, как видно по таблице 5, в целом являются очень распространёнными среди внеклеточных протеаз грибов.

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, фибринолитическую, 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 ферментативный препарат на предмет сохранения тромболитической активности на примере фибринолитической активности. Выявленная удельная фибринолитическая активность была значимо больше, чем у ранее изученных продуцентов фибринолитических и фибринолитических протеаз (таблица 18).

Таблица 18. Сравнение фибринолитической активности лиофильно высушенного препарата протеаз *A. tabacinus* с другими продуцентами

<b>Продуцент</b>	<b>Фибринолитическая активность, Е/мг белка</b>
<i>A. tabacinus</i> ВЕОФВ3260m	779
<i>A. terreus</i> 2 [15]	348
<i>A. fumigatus</i> D-1 [221]	103
<i>Sarocladium strictum</i> 203 (протеиназа III) [177]	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, плазмينا и с меньшей активностью субстраты урокиназы и тканевого активатора плазминогена (таблица 14). 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 [16].

Выявление антикоагулянтной протеин С-подобной активности у протеазы продуцента *A. tabacinus* имеет большую научную и практическую значимость, так как по сведениям из литературы, на данный момент не описано ни одной протеазы с протеин С-подобной активностью, продуцируемой микроорганизмами. Известны лишь две протеазы, продуцируемые *A. ochraceus* и *A. terreus*, проявляющие активаторную к человеческому протеину С активность [15], но не протеин С-подобную. В связи с малым количеством данных об антикоагулянтных протеазах, секретируемых представителями рода *Aspergillus*, свойства новой протеазы *A. tabacinus* сравнили со свойствами активаторных к протеину С протеаз *A. ochraceus* и *A. terreus* и со свойствами протеазы *A. versicolor* с неописанным механизмом действия на компоненты гемостаза человека (таблица 19).

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

<b>Продуцент</b> <b>Свойство</b>	<i>A. tabacinus</i> ВЕОFB3260m	<i>A. terreus</i> 2 [15]	<i>A. ochraceus</i> ВКМ F4104-D [221]	<i>A. versicolor</i> ZLN-1 [16]
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 [256]. 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 [257].

В рамках данной работы было показано, что антикоагулянтная протеин С-подобная активность наряду с тромболитической активностью встречается у внеклеточных протеаз микромицетов серий *Versicolores* и *Speluncaei* 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 плазминогена. Протеаза *A. tabacinus* показала свою способность работать как антикоагулянт (расщепляет субстрат активированного протеина С), прямой фибринолитик и активатор плазминогена. 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 ферментативного 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, однако 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 *Speluncei* 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 pH.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- СМВ – пара-хлормеркурибензоат
- ЕРСR – эндотелиальный рецептор протеина С
- GPI-якорь – гликозилфосфатидилинозитольный якорь
- PAF – фактор активации тромбоцитов
- PAI-1 – эндотелиальный ингибитор активатора плазминогена
- PAI-2 – внутриклеточный ингибитор активатора плазминогена
- PCI – ингибитор протеина С
- Plg-RKT – мембранный рецептор плазминогена
- PMSF – фенилметилсульфонилфторид
- PZPI – протеин Z-зависимый ингибитор протеаз
- TAFI – активируемый тромбином ингибитор фибринолиза
- TF – тканевый фактор
- TFPI – ингибитор пути тканевого фактора
- TLCK – тозиллизилхлорметилкетон
- tPA – тканевой активатор плазминогена
- TPCK – тозилфенилаланилхлорметилкетон
- uPAR – мембранный рецептор урокиназы
- vWF – фактора фон Виллебранда
- АДФ – аденозиндифосфорная кислота
- АТФ – аденозинтрифосфорная кислота
- ДВС-синдром – синдром диссеминированного внутрисосудистого свёртывания
- ДСН – додецилсульфат натрия
- Е – единица активности
- НОАК – новые оральные антикоагулянты
- ПААГ – полиакриламидный гель
- ТХУ – Трихлоруксусная кислота
- ФС1 – ферментационная среда 1
- ФС2 – ферментационная среда 2
- ЭДТА – Этилендиаминтетрауксусная кислота

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бокарев И.Н., Попова Л.В. Современные проблемы тромбозов артерий и вен // *Практ мед.* 2014. 6, 82, 13-17.
2. Максименко А. В. Кардиологические биофармацевтики в концепции направленного транспорта лекарств: практические результаты и исследовательские перспективы // *ACTA NATURAE.* 2012. 4, 3, 76-86.
3. Vanderschueren S., Dens J., Kerdsinchai P., Desmet W., Vrolix M., De Man F., Van den Heuvel P., Hermans L., Collen D., Van de Werf F. Randomized coronary patency trial of double-bolus recombinant staphylokinase versus front-loaded alteplase in acute myocardial infarction // *Am Heart J.* 1997. 134, 2 Pt 1, 213-219.
4. Nair S.R., C S.D. Serratiopeptidase: An integrated View of Multifaceted Therapeutic Enzyme // *Biomolecules.* 2022. 12, 10, 1468-1479.
5. Kurosawa Y., Nirengi S., Homma T., Esaki K., Ohta M., Clark J.F., Hamaoka T. A single-dose of oral nattokinase potentiates thrombolysis and anti-coagulation profile // *Sci Rep.* 2015. 5, 11601-11607.
6. Wandersman C. Secretion, processing and activation of bacterial extracellular proteases // *Mol Microbiol.* 1989. 3, 12, 1825-1831.
7. Павлюкова Е.Б., Белозерский М.А., Дунаевский Я.Е. Внеклеточные протеолитические ферменты мицелиальных грибов // *Биохимия.* 1998. 63, 8, 1059-1089.
8. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Протеолитические ферменты мицелиальных грибов с плазминоподобной и активаторной к плазминогену активностью // *Усп Современ Биол.* 2021. 141, 5, 467-482.
9. Sharma C., Osmolovskiy A., Singh R. Microbial Fibrinolytic Enzymes as Anti-Thrombotics: Production, Characterisation and Prodigious Biopharmaceutical Applications // *Pharmaceutics.* 2021. 13, 11, 1880-1911.
10. Серебрякова Т.Н., Андреев Г.В., Максимова Р.А., Степанова Ц.Н. Активаторные свойства протеиназы, образуемой культурой сапрофитного гриба *Trichothecium roseum* Lk. ex Fr. // *Прикл. биохим. микробиол.* 1977. 12, 3, 398-404.

11. Choi J.H., Kim D.-W., Kim S., Kim S.-J. Purification and partial characterization of a fibrinolytic enzyme from the fruiting body of the medicinal and edible mushroom *Pleurotus ferulae* // *Prep Biochem Biotechnol.* 2017. 47, 6, 539-546.
12. Choi J.-H., Kim S. Fibrinolytic and Thrombolytic Effects of an Enzyme Purified from the Fruiting Bodies of *Boletus pseudocalopus* (Agaricomycetes) from Korea // *Int J Med Mushrooms.* 2021. 23, 4, 47-57.
13. Li G., Liu X., Cong S., Deng Y., Zheng X. A novel serine protease with anticoagulant and fibrinolytic activities from the fruiting bodies of mushroom *Agrocybe aegerita* // *Int J Biol Macromol.* 2021. 168, 631-639.
14. Duan Y., Katrolia P., Zhong A., Kopparapu N.K. Production, purification and characterization of a novel antithrombotic and anticoagulant serine protease from food grade microorganism *Neurospora crassa* // *Prep Biochem Biotechnol.* 2022. 52, 9, 1008-1018.
15. Osmolovskiy A., Zvonareva E., Kreyer V., Baranova N., Egorov N. The effects of micromycete extracellular proteases of the *Aspergillus* genus on the proteins of the haemostatic system // *Russ J Bioorg Chem.* 2014. 40, 6, 634–639.
16. Zhao L., Lin X., Fu J., Zhang J., Tang W., He Z. A Novel Bi-Functional Fibrinolytic Enzyme with Anticoagulant and Thrombolytic Activities from a Marine-Derived Fungus *Aspergillus versicolor* ZLH-1. // *Mar Drugs.* 2022. 20, 6, 356-370.
17. Lasne D., Jude B., Susen S. From normal to pathological hemostasis // *Can J Anesth.* 2006. 53, 6, S2-S11.
18. Palta S., Saroa R., Palta A. Overview of the coagulation system // *Indian J Anaesth.* 2014. 58, 5, 515-523.
19. Stassen J.M., Arnout J., Deckmyn H. The Hemostatic System // *Curr Med Chem.* 2004. 11, 17, 2245-2260.
20. Sagripanti A., Carpi A. Antithrombotic and prothrombotic activities of the vascular endothelium // *Biomed & Pharmacother.* 2000. 54, 107-111.
21. Herr A.B., Farndale R.W. Structural insights into the interactions between platelet receptors and fibrillar collagen // *J Biol Chem.* 2009. 284, 30, 19781-19875.
22. Kauskot A., Hoylaerts M.F. Platelet receptors // *Handb Exp Pharmacol.* 210, 23-57.

23. Lisman T., Weeterings C., de Groot P.G. Platelet aggregation: involvement of thrombin and fibrin(ogen) // *Front Biosci.* 2005. 10, 2504-2517.
24. Gardiner E.E., Arthur J.F., Shen Y., Karunakaran D., Moor L.A., Am Esch II J. S., Andrews R.K., Berndt M.C. GPIb-selective activation of platelets induces platelet signaling events comparable to GPVI activation events // *Platelets.* 2010. 21, 4, 244 - 252.
25. Rubensteun D.A., Yin W. Platelet activation mechanisms and vascular remodeling // *Compr Physiol.* 2018. 8, 1117-1156.
26. Makhoul S., Trabold K., Gambaryan S., Tenzer S., Pillitteri D., Walter U., Jurk K. cAMP- and cGMP-elevating agents inhibit GPIb $\alpha$ -mediated aggregation but not GPIb $\alpha$ -stimulated Syk activation in human platelets // *Cell Commun Signal.* 2019. 17, 1, 122-141.
27. Goggs R., Williams C.M., Mellor H., Poole A.W. Platelet Rho GTPases – a focus on novel players, roles and relationships // *Biochem J.* 2015. 466, 431-442.
28. Akbar H., Kim J., Funk K., Cancelas J.A., Shang X., Chen L., Johnson J.F., Williams D.A., Zheng Y. Genetic and pharmacological evidence that Rac1 GTPase is involved in regulation of platelet secretion and aggregation // *J Thromb Haemost.* 2007. 5, 1747-1755.
29. Pleines I., Hagedorn I., Gupta S., May F., Chakarova L., van Hengel J., Offermanns S., Krohne G., Kleinschnitz C., Brakebusch C., Nieswandt B. Megakaryocyte-specific RhoA deficiency causes macrothrombocytopenia and defective platelet activation in hemostasis and thrombosis // *Blood.* 2012. 119, 4, 1054-1063.
30. Rivera J., Losano M.L., Navarro-Nunez L., Vicente V. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation // *Haematol.* 2009. 94, 5, 700-711.
31. Suzuki J., Umeda M., Sims P.J., Nagata S. Calcium-dependent phospholipid scrambling // *Nature.* 2010. 468, 834-838.
32. Triplett D.A. Coagulation and bleeding disorders: review and update // *Clin Chem.* 2000. 46, 8(B), 1260-1269.
33. D'Alessandro E., Posma J.J.N., Spronk H.M.H., ten Cate H. Tissue factor (:Factor VIIa) in the heart and vasculature: More than an envelope // *Thromb Res.* 2018. 168, 130-137.

34. Petrovan R.W., Ruf W. Residue Met<sup>156</sup> contributes to the labile enzyme conformation of coagulation factor VIIa // *J Biol Chem*. 2000. 276, 9, 6616-6620.
35. Mackman N., Tilley R.E., Key N.S. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007. 27, 1687-1693.
36. Owens III A.P., Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis // *Circ Res*. 2011. 108, 1284-1297.
37. Bogdanov V.Y., Versteeg H.H. "Soluble tissue factor" in 21st century: definition, biochemistry and pathophysiological role in thrombus formation // *Semin Thromb Hemost*. 2015. 41, 7, 700-707.
38. Smith S.A., Travers R.J., Morrissey J.H. How it all starts: initiation of the clotting cascade // *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2015. 50, 4, 326-336.
39. Rao L.V.M., Kothari H., Pendurthi U.R. Tissue factor: mechanisms of decription // *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012. 4, 4, 1513-1527.
40. Shreuder M., Reitsma P., Bos M.H.A. Blood coagulation factor Va's key interactive residues and regions for prothrombinase assembly and prothrombin binding // *J Thromb Haemost*. 2019. 17, 1229-1239.
41. Camire R.M., Bos M.H.A. The molecular basis of factor V and VIII procofactor activation // *J Thromb Haemost*. 2009. 7, 12, 1951-1961.
42. Vermeer C., De Boer-Van den Berg M.A. Vitamin K-dependent carboxylase // *Haematologia (Budap)*. 1985. 18, 2, 71-97.
43. Raghunathan V., Zilberman-Rudenko J., Olson S.R., Lupu F., McCarty O.J.T., Shatzel J.J. The contact pathway and sepsis // *Res Pract Thromb Haemost*. 2019. 3, 331-339.
44. Björkqvist J., Lecher B., Maas C., Renne T. Zinc-dependent contact system activation induces vascular leakage and hypotension in rodents // *Biol Chem*. 2013. 394, 9, 1195-1204.
45. Redman C.M., Xia H. Fibrinogen biosynthesis. Assembly, intracellular degradation, and association with lipid synthesis and secretion // *An N Y Acad Sci*. 2001. 936, 480-495.

46. Litvinov R.I., Gorkun O.V., Owen S.F., Shuman H., Weisel J.W. Polymerization of fibrin: specificity, strength, and stability of knob-hole interactions studied at the single-molecule level // *Blood*. 2005. 106, 9, 2944-2951.
47. Chernysh I.N., Weisel J.W. Dynamic imaging of fibrin network formation correlated with other measures of polymerization // *Blood*. 2008. 111, 10, 4854-4861.
48. Rosenfeld M.A., Leonova V.B., Shchegolikhin A.N., Bychkova A.V., Kostanova E.A., Biryukova M.I. Covalent structure of single-stranded fibrin oligomers cross-linked by FXIIIa // *Biochem Biophys Res Commun*. 2015. 461, 2, 408-412.
49. Ezihe-Ejiofor J.A., Hutchinson N. Anticlotting mechanisms I: physiology and pathology // *Contin Education Anaest, Crit Care & Pain*. 2013. 13, 3, 87-92.
50. Rezaie A.R., Giri H. Anticoagulant and signaling functions of antithrombin // *J Thromb Haemost*. 2020. 18, 12, 3142-3153.
51. Olson S.T., Richard B., Izaguirre G., Schedin-Weiss S., Gettins P.G.W. Molecular mechanisms of antithrombin-heparin regulation of blood clotting proteinases. A paradigm for understanding proteinase regulation by serpin family protein proteinase inhibitors // *Biochimie*. 2010. 92, 11, 1587-1596.
52. Grover S.P., Mackman N. Anticoagulant SERPINs: Endogenous Regulators of Hemostasis and Thrombosis // *Front Cardiovasc Med*. 2022. 9, 878199.
53. Boulaftali Y., Adam F., Venisse L., Ollivier V., Richard B., Taieb S., Monard D., Favier R., Alessi M.-C., Bryckaert M., Arocas V., Jandrot-Perrus M., Bouton M.-C. Anticoagulant and antithrombotic properties of platelet protease nexin-1 // *Blood*. 2010. 115, 97–106.
54. Wuillemin W.A., Eldering E., Citarella F., de Ruig C.P., ten Cate H., Hack C.E. Modulation of contact system proteases by glycosaminoglycans. Selective enhancement of the inhibition of factor Xia // *J Biol Chem*. 1996. 271, 12913–12918.
55. Tollefsen D.M., Majerus D.W., Blank M.K. Heparin cofactor II. Purification and properties of a heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma // *J Biol Chem*. 1982. 257, 2162–2169.
56. Wuillemin W.A., Minnema M., Meijers J.C., Roem D., Eerenberg A.J., Nuijens J.H., ten Cate H., Hack C.E. Inactivation of factor XIa in human plasma assessed by measuring

- factor XIa-protease inhibitor complexes: major role for C1-inhibitor // *Blood*. 1995. 85, 1517–1526.
57. Pixley R.A., Schapira M., Colman R.W. The Regulation of Human Factor XIIa by plasma proteinase inhibitors // *J Biol Chem*. 1985. 260, 1723–1729.
58. van der Graaf F., Koedam J.A., Bouma B.N. Inactivation of kallikrein in human plasma // *J Clin Invest*. 1983. 71, 149–158.
59. Harpel P.C., Cooper N.R. Studies on human plasma C1 inactivator-enzyme interactions. I. Mechanisms of interaction with C1s, plasmin, and trypsin // *J Clin Invest*. 1975. 55, 593–604.
60. Huisman L.G., van Griensven J.M., Kluft C. On the role of C1-inhibitor as inhibitor of tissue-type plasminogen activator in human plasma // *Thromb Haemost*. 1995. 73, 466–471.
61. Evans D.L., McGrogan M., Scott R.W., Carrell R.W. Protease specificity and heparin binding and activation of recombinant protease nexin I // *J Biol Chem*. 1991. 266, 22307–22312.
62. Knauer D.J., Majumdar D., Fong P.C., Knauer M.F. Serpin regulation of factor XII. The novel observation that protease nexin 1 in the presence of heparin is a more potent inhibitor of factor XIa than C1 inhibitor // *J Biol Chem*. 2000. 275, 37340–37346.
63. Wuillemin W.A., Eldering E., Citarella F., de Ruig C.P., ten Cate H., Hack C.E. Modulation of contact system proteases by glycosaminoglycans. Selective enhancement of the inhibition of factor XIa // *J Biol Chem*. 1996. 271, 12913–12918.
64. Ellis V., Scully M., MacGregor I., Kakkar V. Inhibition of human factor Xa by various plasma protease inhibitors // *Biochim Biophys Acta*. 1982. 701, 24–31.
65. Corral J., González-Conejero R., Hernández-Espinosa D., Vicente V. Protein Z/Z-dependent protease inhibitor (PZ/ZPI) anticoagulant system and thrombosis // *Br J Haematol*. 2007. 137, 2, 99-108.
66. Heeb M.J., Cabral K.M., Ruan L. Down-regulation of factor IXa in the factor Xase complex by protein Z-dependent protease inhibitor // *J Biol Chem*. 2005. 280, 33819–33825.

67. Tabatabai A., Fiehler R., Broze Jr. G.J. Protein Z circulates in plasma in a complex with protein Z-dependent protease inhibitor // *Thromb Haemost.* 2001. 85, 655–660.
68. Mast A.E., Ruf W. Regulation of coagulation by tissue factor pathway inhibitor: Implications for hemophilia therapy // *J Thromb Haemost.* 2022. 20, 6, 1290-1300.
69. Ellery P.E.R., Hilden I., Sejling K., Loftager M., Martinez N.D., Maroney S.A., Mast A.E. Correlates of plasma and platelet tissue factor pathway inhibitor, factor V and protein S // *Res Pract Thromb Haemost.* 2018. 2, 93-104.
70. Maroney S.A., Haberichter S.L., Friese P., Collins M.L., Ferrel J.P., Dale G.L., Mast A.E. Active tissue factor pathway inhibitor is expressed on the surface of coated platelets // *Blood.* 2007. 109, 1931-1937.
71. Maroney S.A., Ferrel J.P., Pan S., White T.A., Simari R.D., Mcvey J.H., Mast A.E. Temporal expression of alternatively spliced forms of tissue factor pathway inhibitor in mice // *J Thromb Haemost.* 2009. 7, 1106-1113.
72. Muller-Calleja N., Hollerbach A., Ritter S., Pedrosa D.G., Strand D., Graf C., Reinhardt C., Strand S., Poncelet P., Griffin J.H., Lackner K.J., Ruf W. Tissue factor pathway inhibitor primes monocytes for antiphospholipid antibody-induced thrombosis // *Blood.* 2019. 134, 1119-1131.
73. Ahnstrom J., Andersson H.M., Hockey V., Meng Y., McKinnon T.A.J., Hamuro T., Crawley J.T.B., Lnae D.A. Identification of functionally important residues in TFPI Kunitz domain 3 required for the enhancement of its activity by protein S // *Blood.* 2012. 120, 5059-5062.
74. Wesselschmidt R., Likert K., Huang Z., MacPhail L., Broze Jr. G.J. Structural requirements for tissue factor pathway inhibitor interactions with factor Xa and heparin // *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1993. 4, 661-669.
75. Piro O., Broze Jr. G.J. Comparison of cell-surface TFPIalpha and beta // *J Thromb Haemost.* 2005. 3, 2677-2683.
76. Rao L.V., Rapaport S.I. Studies of a mechanism inhibiting the initiation of the extrinsic pathway of coagulation // *Blood.* 1987. 69, 645-651.
77. Dahlbäck B., Tran S. The preAR2 region (1458–1492) in factor V-Short is crucial for the synergistic TFPI $\alpha$ -cofactor activity with protein S and the assembly of a trimolecular

- factor Xa-inhibitory complex comprising FV-Short, protein S, and TFPI $\alpha$  // *J Thromb Haemost.* 2022. 20, 58-68.
78. Wood J.P., Petersen H.H., Yu B., Wu X., Hilden I., Mast A.E. TFPI $\alpha$  interacts with FVa and FXa to inhibit prothrombinase during the initiation of coagulation // *Blood Adv.* 2017. 1, 2692-2702.
79. Adams T.E., Huntington J.A. Thrombin-cofactor interactions: structural insights into regulatory mechanisms // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006. 26, 1738–1745.
80. Esmon C.T, Owen W.G. The discovery of thrombomodulin // *J Thromb Haemost.* 2004. 2, 209–13.
81. Bouwens E.A.M., Stavenuiter F., Mosnier L.O. Mechanisms of anticoagulant and cytoprotective actions of the protein C pathway // *J Thromb Haemost.* 2013. 11, 1, 242-253.
82. Dahlback B., Villoutreix B.O. The anticoagulant protein C pathway // *FEBS Lett.* 2005. 579, 15, 3310–3316.
83. Chattopadhyay R., Sengupta T., Majumder R. Inhibition of intrinsic Xase by protein S: a novel regulatory role of protein S independent of activated protein C // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012. 32, 10, 2387–2393.
84. Espana F., Berrettini M., Griffin J.H. Purification and characterization of plasma protein C inhibitor // *Thromb Res.* 1989. 55, 369–384.
85. Rezaie A.R., Cooper S.T., Church F.C., Esmon C.T. Protein C inhibitor is a potent inhibitor of the thrombin-thrombomodulin complex // *J Biol Chem.* 1995. 270, 25336–25339.
86. Ranby M., Bergsdorf N., Nilsson T. Enzymatic properties of the one- and two-chain form of tissue plasminogen activator // *Thromb Res.* 1982. 27, 175–183.
87. Tkachuk V.A., Plekhanova O.S., Parfyonova Y.V. Regulation of arterial remodeling and angiogenesis by urokinase-type plasminogen activator // *Can J Physiol Pharmacol.* 2009. 87, 4, 231-251.
88. Miles L.A., Vago J.P., Sousa L.P., Parmer R.J. Functions of the Plasminogen Receptor, Plg-R<sub>KT</sub> // *J Thromb Haemost.* 2020. 18, 10, 2468-2481.

89. Humphreys S.J., Whyte C.S., Mutch N.J. “Super” SERPINs—A stabilizing force against fibrinolysis in thromboinflammatory conditions // *Front Cardiovasc Med.* 2023. 10: 1146833.
90. Al-Amer O.M. The role of thrombin in haemostasis // *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2022. 33, 3, 145-148.
91. Handt S., Jerome W., Tietze L., Hantgan R. Plasminogen activator inhibitor-1 secretion of endothelial cells increases fibrinolytic resistance of an in vitro fibrin clot: evidence for a key role of endothelial cells in thrombolytic resistance // *Blood.* 1996. 87, 10, 4204–4213.
92. Garg N., Goyal N., Strawn T.L., Wu J., Mann K.M., Lawrence D.A., Fay W.P. Plasminogen activator inhibitor-1 and vitronectin expression level and stoichiometry regulate vascular smooth muscle cell migration through physiological collagen matrices // *J Thromb Haemost.* 2010. 8, 8, 1847–1854.
93. Galgoczi E., Jeney F., Gazdag A., Erdei A., Katko M., Nagy D.M., Ujhelyi B., Steiber Z., Gyory F., Berta E., Nagy E.V. Cell density-dependent stimulation of PAI-1 and hyaluronan synthesis by TGF- $\beta$  in orbital fibroblasts // *J Endocrinol.* 2016. 229, 2, 187–196.
94. Booth N.A., Simpson A.J., Croll A., Bennett B., MacGregor I.R. Plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in plasma and platelets // *Br J Haematol.* 1988. 70, 3, 327–333.
95. Ritchie H., Robbie L.A., Kinghorn S., Exley R., Booth N.A. Monocyte plasminogen activator inhibitor 2 (PAI-2) inhibits u-PA-mediated fibrin clot lysis and is cross-linked to fibrin // *Thromb Haemost.* 1999. 81, 1, 96–103.
96. Cater J.H., Mañucat-Tan N.B., Georgiou D.K., Zhao G., Buhimschi I.A., Wyatt A.R., Ranson M. A novel role for plasminogen activator inhibitor type-2 as a hypochlorite-resistant serine protease inhibitor and holdase chaperone // *Cells.* 2022. 11, 7, 1152-1166.
97. Boncela J., Przygodzka P., Papiewska-Pajak I., Wyroba E., Cierniewski C.S. Association of plasminogen activator inhibitor type 2 (PAI-2) with proteasome within endothelial cells activated with inflammatory stimuli // *J Biol Chem.* 2011. 286, 50, 43164–43171.

98. Bachmann F. The enigma PAI-2. Gene expression, evolutionary and functional aspects // *Thromb Haemost.* 1995. 74, 1, 172–179.
99. Siefert S.A., Chabasse C., Mukhopadhyay S., Hoofnagle M.H., Strickland D.K., Sarkar R., Antalis T.M. Enhanced venous thrombus resolution in plasminogen activator inhibitor type-2 deficient mice // *J Thromb Haemost.* 2014. 12, 10, 1706–1716.
100. Fair D.S., Plow E.F. Synthesis and secretion of the fibrinolytic components, including alpha 2-antiplasmin, by a human hepatoma cell line // *J Lab Clin Med.* 1983. 101, 3, 372–384.
101. Sakata Y., Aoki N. Cross-linking of alpha 2-plasmin inhibitor to fibrin by fibrin-stabilizing factor // *J Clin Invest.* 1980. 65, 2, 290–297.
102. Sakata Y., Aoki N. Significance of cross-linking of alpha 2-plasmin inhibitor to fibrin in inhibition of fibrinolysis and in hemostasis // *J Clin Invest.* 1982. 69, 3, 536–542.
103. Chapin J.C., Hajjar K.A. Fibrinolysis and the control of blood coagulation // *Blood Rev.* 2015. 29, 1, 17-24.
104. Broze G.J., Higuchi D.A. Coagulation-dependent inhibition of fibrinolysis: role of carboxypeptidase-U and the premature lysis of clots from hemophilic plasma // *Blood.* 1996. 88, 10, 3815–3823.
105. Bowman L., Mafham M., Stevens W., Haynes R., Aung T., Chen F., Buck G., Collins R., Armitage J.; ASCEND Study Collaborative Group. ASCEND: A Study of Cardiovascular Events in Diabetes: Characteristics of a randomized trial of aspirin and of omega-3 fatty acid supplementation in 15,480 people with diabetes// *Am Heart J.* 2018. 198, 135-144.
106. Gaziano J.M., Brotons C., Coppolecchia R., Cricelli C., Darius H., Gorelick P.B., Howard G., Pearson T.A., Rothwell P.M., Ruilope L.M., Tendera M., Tognoni G.; ARRIVE Executive Committee. Use of aspirin to reduce risk of initial vascular events in patients at moderate risk of cardiovascular disease (ARRIVE): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial // *Lancet.* 2018. 392, 10152, 1036-1046.
107. Alexopoulos D. P2Y<sub>12</sub> inhibitors in acute coronary syndromes: from the research laboratory to the clinic and vice versa // *Cardiology.* 2014. 127, 211-219.

108. Li T, Yuan D., Yuan J. Antithrombotic drugs – pharmacology and perspectives // *Adv Exp Med Biol*. 2020. 1177, 101-131.
109. Kereiakes D.J., Runyon J.P., Broderick T.M., Shimshak T.M. Iib's are not Iib's // *Am J Cardiology*. 2000. 85, 8A, 23-31.
110. Knowles R.B., Warner T.D. Anti-platelet drugs and their necessary interaction with endothelial mediators and platelet cyclic nucleotides for therapeutic efficacy // *Pharmacol & Ther*. 2019. 193, 83-90.
111. Lima A.M., Cavaco A.C.M., Fraga-Silva R.A., Eble J.A., Stergiopoulos N. From patients to platelets and back again: pharmacological approaches to glycoprotein VI, a thrilling antithrombotic target with minor bleeding risks // *Thromb Haemost*. 2019. 119, 11, 1720-1739.
112. Muzard J., Bouabdelli M., Zahid M., Ollivier V., Lacapère J.J., Jandrot-Perrus M., Billiald P. Design and humanization of a murine scFv that blocks human platelet glycoprotein VI in vitro // *FEBS J*. 2009. 276, 15, 4207-4222.
113. Lebozec K., Jandrot-Perrus M., Avenard G., Favre-Bulle O., Billiald P. Design, development and characterization of ACT017, a humanized Fab that blocks platelet's glycoprotein VI function without causing bleeding risks // *MABs*. 2017. 9, 6, 945-958.
114. Lim G.B. Milestone 4: Low-dose heparin for VTE - prevention is better than cure // *Nat Rev Cardiol*. 2017. doi: 10.1038/nrcardio.2017.174.
115. Phillips KW, Ansell J. Outpatient management of oral vitamin K antagonist therapy: defining and measuring high-quality management // *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2008. 6, 1, 57-70.
116. Büller H.R., Davidson B.L., Decousus H., Gallus A., Gent M., Piovella F., Prins M.H., Raskob G., Segers A.E.M., Cariou R., Leeuwenkamp O., Lensing A.W.A.; Matisse Investigators. Fondaparinux or enoxaparin for the initial treatment of symptomatic deep venous thrombosis: a randomized trial // *Ann Intern Med*. 2004. 140, 11, 867-873.
117. Rojas-Hernandez C.M., Garcia D.A. The novel oral anticoagulants // *Semin Thromb Hemost*. 2013. 39, 2, 117-126.
118. Gmyr V., Bonner C., Moerman E., Tournoy A., Delalleau N., Quenon A., Thevenet J., Chetboun M., Kerr-Conte J., Pattou F., Hubert T., Jourdain M. Human Recombinant

Antithrombin (ATryn®) Administration Improves Survival and Prevents Intravascular Coagulation after Intraportal Islet Transplantation in a Piglet Model // *Cell Transplant*. 2017. 26, 2, 309-317.

119. de Maat S., Sanrattana W., Mailer R.K., Parr N.M.J., Hessing M., Koetsier R.M., Meijers J.C.M., Pasterkamp G., Renne T., Maas C. Design and characterization of alpha1-antitrypsin variants for treatment of contact system-driven thromboinflammation // *Blood*. 2019. 134, 1658–1669.

120. Griffin J.H., Zlokovic B.V., Mosnier L.O. Activated protein C: biased for translation // *Blood*. 2015. 125, 19, 2898-2907.

121. Verbout N.G., Lorentz C.U., Markway B.D., Shatzel J.J., Tucker E.I., Gruber A. Safety and Antithrombotic Efficacy of the Recombinant Protein C Activator AB002 (E-WE Thrombin) in End Stage Renal Disease Patients on Chronic Hemodialysis // *Blood*. 2019. 134, Supplement\_1, 2433-2433.

122. Tillett W.S., Garner R.L. The fibrinolytic activity of hemolytic streptococci // *J Exp Med*. 1933. 58, 485–502.

123. Risman R.A., Kirby N.C., Bannish B.E., Hudson N.E., Tutwiler V. Fibrinolysis: an illustrated review // *Res Pract Thromb Haemost*. 2023. 7, 2, 100081.

124. Young K.-C., Shi G.-Y., Wu D.-H., Chang L.-C., Chang B.-I., Ou C.-P. Plasminogen activation by streptokinase via a unique mechanism // *J Biol Chem*. 1998. 273, 3110–3116.

125. Baruah D.B., Dash R.N., Chaudhari M.R., Kadam S.S. Plasminogen activators: a comparison // *Vascul Pharmacol*. 2006.44, 1–9.

126. Mican J., Toul M., Bednar D., Damborsky J. Structural biology and protein engineering of thrombolytics // *Comput Struct Biotechnol J*. 2019. 17, 917-938.

127. Pannell R., Gurewich V. Pro-urokinase: a study of its stability in plasma and of a mechanism for its selective fibrinolytic effect // *Blood*. 1986. 67, 1215–1223.

128. Khasa Y.P. The evolution of recombinant thrombolytics: current status and future directions // *Bioengineered*. 2017. 8, 4, 331-358.

129. Niego B., Horvath A., Coughlin P.B., Pugsley M.K., Medcalf R.L. Desmoteplase-mediated plasminogen activation and clot lysis are inhibited by the lysine analogue tranexamic acid // *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2008. 19, 4, 322-324.
130. Elokda H., Abou-Gharbia M., Hennan J.K., McFarlane G., Mugford C.P., Krishnamurthy G., Crandall D.L. Tiplaxtinin, a novel, orally efficacious inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1: design, synthesis, and preclinical characterization // *J Med Chem*. 2004. 47, 3491–3494.
131. Izuhara Y., Yamaoka N., Kodama H., Dan T., Takizawa S., Hirayama N., Meguro K., van Ypersele de Strihou C., Miyata T. A novel inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1 provides antithrombotic benefits devoid of bleeding effect in nonhuman primates // *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010. 30, 904–912.
132. Van De Craen B., Declerck P.J., Gils A. The biochemistry, physiology and pathological roles of PAI-1 and the requirements for PAI-1 inhibition in vivo // *Thromb Res*. 2012. 130, 576–575.
133. Marder V.J., Novokhatny V. Direct fibrinolytic agents: biochemical attributes, preclinical foundation and clinical potential // *J Thromb Haemost*. 2010. 8, 3, 433-444.
134. Marder V.J. Historical perspective and future direction of thrombolysis research: the re-discovery of plasmin // *J Thromb Haemost*. 2011. 9, (Suppl 1), 364-373.
135. Wiman B., Boman L., Collen D. On the kinetics of the reaction between human antiplasmin and a low-molecular-weight form of plasmin // *Eur J Biochem*. 1978. 87, 143–146.
136. Gonias S.L., Figler N.L. Alpha 2-macroglobulin is the primary inhibitor of miniplasmin in vitro and in vivo in the mouse. Comparison with alpha 2-antiplasmin in simultaneous reaction experiments // *Biochem J*. 1988. 255, 725–730.
137. Nagai N., Demarsin E., van Hoef B., Wouters S., Cingolani D., Laroche Y., Collen D. Recombinant human microplasmin: production and potential therapeutic properties // *J Thromb Haemost*. 2003. 1, 307–313.
138. Hunt J.A., Petteway Jr.S.R., Scuderi P., Novokhatny V. Simplified recombinant plasmin: production and functional comparison of a novel thrombolytic molecule with plasma-derived plasmin // *Thromb Haemost*. 2008. 100, 413–419.

139. Randolph A., Chamberlain S.H., Chu H.L., Retzios A.D., Markland Jr.F.S., Masiarz F.R. Amino acid sequence of fibrolase, a direct-acting fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom // *Protein Sci* 1992. 1, 590–600.
140. Deitcher S.R., Toombs C.F. Non-clinical and clinical characterization of a novel acting thrombolytic: alfimeprase // *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2005. 34, 215–220.
141. Shah A.R., Scher L. Drug evaluation: alfimeprase, a plasminogen-independent thrombolytic // *IDrugs*. 2007. 10, 329–335.
142. Hong T.T., Huang J., Lucchesi B.R. Effect of thrombolysis on myocardial injury: recombinant tissue plasminogen activator vs. alfimeprase // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006. 290, H959–H967.
143. Toombs C.F. Alfimeprase: pharmacology of a novel fibrinolytic metalloproteinase for thrombolysis // *Haemost*. 2001. 31, 141–147.
144. Siigur E., Siigur J. Purification and characterization of lebetase, a fibrinolytic enzyme from *Vipera lebetina* (snake) venom // *Biochim Biophys Acta*. 1991. 1074, 2, 223-229.
145. Siigur E., Aaspõllu A., Tu A.T., Siigur J. cDNA cloning and deduced amino acid sequence of fibrinolytic enzyme (lebetase) from *Vipera lebetina* snake venom // *Biochem Biophys Res Commun*. 1996. 224, 1, 229-236.
146. Siigur J., Samel M., Tõnismägi K., Subbi J., Siigur E., Tu A.T. Biochemical characterization of lebetase, a direct-acting fibrinolytic enzyme from *Vipera lebetina* snake venom // *Thromb Res*. 1998. 90, 1, 39-49.
147. Saidi N., Samel M., Siigur J., Jensen P.E. Lebetase, an alpha(beta)-fibrin(ogen)olytic metalloproteinase of *Vipera lebetina* snake venom, is inhibited by human alpha-macroglobulins // *Biochim Biophys Acta*. 1999. 1434, 1, 94-102.
148. Mihara H., Sumi H., Yoneta T., Mizumoto H., Ikeda R., Seiki M., Maruyama M. A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus* // *Jpn J Physiol*. 1991. 41, 3, 461-472.
149. Cho I.H., Choi E.S., Lim H.G., Lee H.H. Purification and characterization of six fibrinolytic serine-proteases from earthworm *Lumbricus rubellus* // *J Biochem Mol Biol*. 2004. 37, 2, 199-205.

150. Wang Y.H., Chen K.M., Chiu P.S., Lai S.C., Su H.H., Jan M.S., Lin C.W., Lu D.Y., Fu Y.T., Liao J.M., Chang J.T., Huang S.S. Lumbrokinase attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting TLR4 signaling // *J Mol Cell Cardiol.* 2016. 99, 113-122.
151. Wu C., Li L., Zhao J., Fan Q., Tian W.X., He R.Q. Effect of alpha2M on earthworm fibrinolytic enzyme III-1 from *Lumbricus rubellus* // *Int J Biol Macromol.* 2002. 31, 1-3, 71-77.
152. Kotb E. The biotechnological potential of fibrinolytic enzymes in the dissolution of endogenous blood thrombi // *Biotechnol Prog.* 2014. 30, 3, 656-72.
153. Krishnamurthy A., Belur P.D. A novel fibrinolytic serine metalloprotease from the marine *Serratia marcescens subsp. sakuensis*: Purification and characterization // *Int J Biol Macromol.* 2018. 112, 110–118.
154. Sumi H., Hamada H., Tsushima H., Mihara H., Muraki H. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet // *Experientia.* 1987. 43, 1110–1111.
155. Fujita M., Hong K., Ito Y., Misawa S., Takeuchi N., Kariya K., Nishimuro S. Transport of nattokinase across the rat intestinal tract // *Biol Pharm Bull.* 1995. 18, 1194–1196.
156. Fujita M., Ohnishi K., Takaoka S., Ogasawara K., Fukuyama R., Nakamuta H. Antihypertensive effects of continuous oral administration of nattokinase and its fragments in spontaneously hypertensive rats // *Biol Pharm Bull.* 2011. 34, 1696–1701.
157. Jensen G.S., Lenninger M., Ero M.P., Benson K.F. Consumption of nattokinase is associated with reduced blood pressure and von Willebrand factor, a cardiovascular risk marker: Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter North American clinical trial // *Integr Blood Press Control.* 2016. 9, 95–104.
158. Fujita M., Hong K., Ito Y., Fujii R., Kariya K., Nishimuro S. Thrombolytic effect of nattokinase on a chemically induced thrombosis model in rat // *Biol Pharm Bull.* 1995. 18, 10, 1387-1391.
159. Kotb E. Activity assessment of microbial fibrinolytic enzymes // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013. 97, 15, 6647-6665.

160. Серебрякова Т.Н., Андреев Г.В., Максимова Р.А., Циманович С.Т., Мурашова Н.Л. Антикоагулянтные свойства грибных протеиназ трихолизина (триаза) и лонголитина // *Вопр Мед Хим.* 1984. 30, 5, 37-40.
161. Пленина Л.В., Гаврилов О.К., Кручинский Н.Г. Клинические испытания тромболитического препарата грибного происхождения – триаза // *Усп. мед. микол.* 2006. 7, 20–21.
162. Ландау Н.С., Кураков А.В., Гуликова О.М. и др. Экстрацеллюлярные протеиназы микромицетов с фибринолитическими и антикоагулянтными свойствами // *Микробиология.* 1998. 67, 2, 215–220.
163. Цыманович С.А., Никандров В.Н., Максимова Р.А., Шаркова Т.С., Андреев Г.В., Серебрякова Т.Н. Физико-химические свойства тромболитического препарата лонголитина // *Вопр Мед Хим.* 1992. 38, 44–45.
164. Подорольская Л.В., Серебрякова Т.Н., Шаркова Т.С. Действие лонголитина – тромболитического препарата из низшего сапротрофного гриба *Arthrobotris longa* на фибринолиз и гемостаз у крыс при пероральном применении // *Тромбоз, гемостаз и реология.* 2014. 4, 60, 67–73.
165. Park I.S., Park J.U., Seo M.J., Kim M.J., Lee H.H., Kim S.R., Kang B.W., Choi Y.H., Joo W.H., Jeong Y.K. Purification and biochemical characterization of a 17 kDa fibrinolytic enzyme from *Schizophyllum commune* // *J Microbiol.* 2010. 48, 836–841.
166. Choi B.S., Sapkota K., Choi J.H., Shin C.H., Kim S., Kim S.J. Herinase: A novel bifunctional fibrinolytic protease from the monkey head mushroom *Hericiium erinaceum* // *Appl Biochem Biotechnol.* 2013. 170, 609–622.
167. Zhang S., Wang Y., Zhang N., Sun Z., Shi Y., Cao X., Wang H. Purification and characterisation of a fibrinolytic enzyme from *Rhizopus microsporus var. tuberosus* // *Food Technol Biotechnol.* 2015. 53, 243–248.
168. Xiao-Lan L., Lian-Xiang D., Fu-Ping L., Xi-Qun Z., Jing X. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Rhizopus chinensis* 12 // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005. 67, 209–214.
169. Шаркова Т.С., Матвеева Э.О., Крейер В.Г., Осмоловский А.А., Кураков А.В., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Образование протеиназ – активаторов плазминогена

микроскопическим грибом *Tolyposcladium inflatum* // Прикл биохим микробиол. 2016. 52, 1, 38–43.

170. Фокичев Н.С., Корниенко Е.И., Крейер В.Г., Шаркова Т.С., Осмоловский А.А. Тромболитическая активность и свойства препарата протеиназ, образуемых микромицетом *Tolyposcladium inflatum* k1 // Микол фитопатол. 2021. 55, 6, 449–456.

171. Фокичев Н.С., Корниенко Е.И., Крейер В.Г., Осмоловский А.А. Исследование тромболитического потенциала экзопротеиназ, образуемых микромицетом *Tolyposcladium inflatum* 62а, выделенным из грунтов Белого моря // Микол фитопатол. 2023. 57, 2, 95–103.

172. Deng Y., Liu X., Katrolia P., Kopparapu N.K. et al. A dual function chymotrypsin-like serine protease with plasminogen activation and fibrinolytic activities from the GRAS fungus, *Neurospora sitophila* // Int J Biol Macromol. 2018. 109, 1338–1343.

173. Liu X., Kopparapu N.-K., Li Y., Deng Y., Zheng X. Biochemical characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Cordyceps militaris* // Int J Biol Macromol. 2017. 94, Pt B, 793-801.

174. Katrolia P., Liu X., Zhao Y., Kopparapu N.K., Zheng X. Gene cloning, expression and homology modeling of first fibrinolytic enzyme from mushroom (*Cordyceps militaris*) // Int J Biol Macromol. 2020, 146, 897–906.

175. Li H.P., Hu Z., Yuan J.L., Fan H.D., Chen W., Wang S.J., Zheng S.S., Zheng Z.L., Zou G.L. A novel extracellular protease with fibrinolytic activity from the culture supernatant of *Cordyceps sinensis*: Purification and characterization // Phytother Res. 2007. 21, 1234–1241.

176. Корниенко Е.И., Кокаева Л.Ю., Биланенко Е.Н., Мокеева В.Л., Шаркова Т.С., Осмоловский А.А. *Sarocladium strictum* – перспективный продуцент протеолитических ферментов с выраженной фибринолитической активностью // Микол фитопатол. 2020. 54, 3, 206–213.

177. Корниенко Е.И., Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Котова И.Б., Егоров Н.С. Характеристика и свойства комплекса протеолитических ферментов тромболитического действия микромицета *Sarocladium strictum* // Прикл биохим микробиол. 2021. 57, 1, 46–53.

178. Fayek K.I., Foda M.S., Naggar M.R. Production physiology and properties of a novel fungal fibrinolytic enzyme // *Z Allg Mikrobiol.* 1976. 16, 6, 417-423.
179. Abdel-Fattah A.F., Ismail A.S., Saleh S.A. Purification and properties of two fibrinolytic enzymes from *Fusarium oxysporum* N.R.C.1 // *Zentralbl Mikrobiol.* 1993.148, 2, 123-128.
180. El-Aassar S.A. Production and properties of fibrinolytic enzyme in solid state cultures of *Fusarium pallidoroseum* // *Biotechnol Lett.* 1995. 17, 943–948.
181. Ueda M., Kubo T., Miyatake K., Nakamura T. Purification and characterization of fibrinolytic alkaline protease from *Fusarium sp.* BLB // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007. 74, 331–338.
182. Sugimoto S., Fujii T., Morimiya T., Johdo O., Nakamura T. The fibrinolytic activity of a novel protease derived from a tempeh producing fungus, *Fusarium sp.* BLB // *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007. 71, 2184–2189.
183. Wu B., Wu L., Chen D., Yang Z., Luo M. Purification and characterization of a novel fibrinolytic protease from *Fusarium sp.* CPCC 480097 // *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2009. 36, 451–459.
184. Wu B., Xu J. Antithrombotic effect of a novel protein from *Fusarium sp.* CPCC 480097 in a rat model of artery-vein bypass thrombosis // *Pharm Biol.* 2012. 50, 7, 866–870.
185. Chandrashekhar N., Hariharan P. Production, purification and characterization of fibrinolytic protease from *Fusarium spp.* CSN-6 through solid-state fermentation // *Int. J Eng Res Technol.* 2019. 8, 192–198.
186. Abdel-Fattah A.F., Ismail A.M. Preparation and properties of fibrinolytic enzymes produced by *Cochliobolus lunatus* // *Biotechnol Bioeng.* 1984. 26, 1, 37-40.
187. Abu-Tahon M.A., Abdel-Majeed A.M., Ghareib M., Housseiny M.M., Abdallah W.E. Thrombolytic and anticoagulant efficiencies of purified fibrinolytic enzyme produced from *Cochliobolus hawaiiensis* under solid-state fermentation // *Biotechnol Appl Biochem.* 2023. doi: 10.1002/bab.2502.

188. Larcher G., Cimon B., Symoens F., Tronchin G., Chabasse D., Bouchara J.P. A 33 kDa serine proteinase from *Scedosporium apiospermum* // *Biochem J.* 1996. 315, 119–126.
189. Hariharan P., Naik C., Sharma A.V., Singh P., Kumar P.S. Isolation, production and purification of new thrombolytic enzyme from *Cladosporium spp.* // *Eur J Biotechnol Biosci.* 2018, 6, 1–4.
190. Tharwat N.A. Purification and biochemical characterization of fibrinolytic enzyme produced by thermophilic fungus *Oidiodendron flavum* // *Biotechnol.* 2006, 5, 160–165.
191. Kim H.C., Choi B.-S., Sapkota K. et al. Purification and characterization of a novel, highly potent fibrinolytic enzyme from *Paecilomyces tenuipes* // *Proc. Biochem.* 2011. 46, 8, 1545–1553.
192. Rovati J.I., Delgado O.D., Figueroa L.I., Fariña J.I. A novel source of fibrinolytic activity: *Bionectria sp.*, an unconventional enzyme-producing fungus isolated from Las Yungas rainforest (Tucumán, Argentina) // *World J Microbiol Biotechnol.* 2010, 26, 55–62.
193. Meshram V., Saxena S., Paul K., Gupta M., Kapoor N. Production, purification and characterisation of a potential fibrinolytic protease from Endophytic *Xylaria curta* by solid substrate fermentation // *Appl Biochem Biotechnol.* 2017. 181, 1496–1512.
194. Kim J.H., Kim Y.S. A fibrinolytic metalloprotease from the fruiting bodies of an edible mushroom, *Armillariella mellea* // *Biosci Biotechnol Biochem.* 1999. 63, 12, 2130–2136.
195. Lee S.Y., Kim J.S., Kim J.E., Sapkota K., Shen M.H., Kim S., Chun H.S., Yoo J.C., Choi H.S., Kim M.K., et al. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from cultured mycelia of *Armillaria mellea* // *Protein Expr Purif.* 2005. 43, 10–17.
196. Lee J.S., Baik H.S., Park S.S. Purification and characterization of two novel fibrinolytic proteases from mushroom, *Fomitella fraxinea* // *J Microbiol Biotechnol.* 2006. 16, 264–271.
197. Hamada S., Kubota K., Sagisaka M. Purification and characterization of a novel extracellular neutral metalloprotease from *Cerrena albocinnamomea* // *J Gen Appl Microbiol.* 2017. 63, 1, 51-57.

198. Kumaran S., Palani P., Nishanthi R., Kaviyarasan V. Studies on Screening, Isolation and Purification of a Fibrinolytic Protease from an Isolate (VK12) of *Ganoderma Lucidum* and Evaluation of its Antithrombotic Activity // *Med Mycol J.* 2011. 52, 2, 153-162.
199. Choi J.-H., Kim K.-J., Kim S. Purification and Antithrombotic Potential of a Fibrinolytic Enzyme from Shiitake Culinary- Medicinal Mushroom, *Lentinus edodes* GNA01 (Agaricomycetes) // *Int J Med Mushrooms.* 2018. 20, 1, 47-59.
200. Ali U., Ibrahim Z. Production and some properties of fibrinolytic enzyme from *Rhizomucor miehei* (Cooney & Emerson) Schipper // *J Appl Sci Res.* 2008. 4, 892–899.
201. Nascimento T.P., Sales A.E., Porto C.S., Brandão R.M., de Campos-Takaki G.M., Teixeira J.A., Porto T.S., Porto A.L., Converti A. Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 by aqueous two-phase systems (PEG/sulfate) // *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2016. 1025, 16-24.
202. Nascimento T.P., Sales A.E., Porto T.S., Costa R.M.P.B., Breydo L., Uversky V.N., Porto A.L.F., Converti A. Purification, biochemical, and structural characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 // *Bioprocess Biosyst Eng.* 2017.40, 8, 1209-1219.
203. Da Silva M.M., Rocha T.A., de Moura D.F., Chagas C.A., de Aguiar Júnior F.C.A., da Silva Santos N.P., Da Silva Sobral R.V., do Nascimento J.M., Lima Leite A.C., Pastrana L., et al. Effect of acute exposure in swiss mice (*Mus musculus*) to a fibrinolytic protease produced by *Mucor subtilissimus* UCP 1262: An histomorphometric, genotoxic and cytological approach // *Regul Toxicol Pharmacol.* 2019. 103, 282–291.
204. Stefanini M., Adamis D.M., Soardi F., Horace J.F., Marin H.M., Mele R. Purification of Aspergillin O // *Lancet.* 1959. 274, 7100, 443–444.
205. Ландау Н.С., Егоров Н.С. Образование фибринолитического агента *Aspergillus oryzae* штамм МГУ при развитии в глубинных условиях на синтетической среде // *Науч. докл. высш. школы.* 1965. 3, 168–172.
206. Frisch E.P. Clinical pharmacology of the thrombolytic enzyme preparation brinase // *Semin Thromb Hemost.* 1989. 15, 3, 341–346.

207. Larsson L.J., Frisch E.P., Törneke K., Lindblom T., Björk I. Properties of the complex between alpha 2-macroglobulin and brinase, a proteinase from *Aspergillus oryzae* with thrombolytic effect // *Thromb Res.* 1988. 49, 1, 55-68.
208. Shirasaka N., Naitou M., Okamura K., Fukuta Y., Terashita T., Kusuda M. Purification and characterization of a fibrinolytic protease from *Aspergillus oryzae* KSK-3 // *Mycoscience.* 2012. 53, 354–364.
209. Имшенецкий А.А., Броцкая С.З. Селекция микроорга низмов, обладающих тромболитической активностью // *Микробиология.* 1969. 38, 6, 1043–1049.
210. Касаткина И.Д., Имшенецкий А.А., Броцкая С.З., Желтова Е.Д. Мутанты *Aspergillus terricola*, образующие протеазы с фибринолитическим действием // *Микробиология.* 1969. 38, 5, 766–774.
211. Селезнева А.А., Большакова М.Д. Протеолитический комплекс *Aspergillus terricola* // *Прикл биохим микробиол.* 1986. 22, 1, 3–11.
212. Zaikina N.A., Shataeva L.K., Elinov N.P., Samsonov G.V. Some properties of the protease from *Aspergillus terricola* // *Mycopathol.* 1975. 56, 3, 153–157.
213. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Кураков А.В., Егоров Н.С. Свойства внеклеточной протеиназы – активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *Aspergillus ochraceus* // *Прикл биохим микробиол.* 2015. 51, 1, 86-92.
214. Осмоловский А.А., Клягин С.Д., Вашкевич Т.В., Кураков А.В., Крейер В.Г. Фибрино- и фибриногенолитическое действие внеклеточных протеиназ микромицетов *Aspergillus alliaceus* 7dN1 и *A. terreus* 2 // *Микол фитопатол.* 2023. 57, 4, 298-300.
215. Kotb E., Helal G.E.D.A., Edries F.M. Screening for fibrinolytic filamentous fungi and enzymatic properties of the most potent producer, *Aspergillus brasiliensis* AUMC 9735 // *Biologia.* 2015. 70, 1565–1574.
216. Chimbekujwo K.I., Ja’afaru M.I., Adeyemo O.M. Purification, characterization and optimization conditions of protease produced by *Aspergillus brasiliensis* strain BCW2 // *Sci Afr.* 2020. 8:e00398.

217. Afini A.V.M., Sooraj S.N., Smitha K.V., Kunhi A.A.M. Production and partial characterization of fibrinolytic enzyme from a soil isolate *Aspergillus carbonarius* S-CSR-0007 // Int J Pharm Pharm Sci. 2016. 8, 142–148.
218. Shilpa H.K., Ambekar J.G., Dongre N.N., Siddalingeshwara K.G. Application of fibrinolytic enzyme from *Aspergillus tamarii* —In vitro studies // Eur J Pharm Med Res. 2019. 6, 560–562.
219. Yadav S., Siddalingeshwara K.G. Biosynthesis of clot busting fibrinolytic enzyme from *Aspergillus japonicum* by supplementing carbon sources // Int J Curr Microbiol. App Sci. 2016. 5, 3, 860–864.
220. Галиакберова А.А., Бедненко Д.М., Крейер В.Г., Осмоловский А.А., Егоров Н.С. Образование и свойства внеклеточной протеиназы микромицета *Aspergillus flavus* О-1, активной по отношению к фибриллярным белкам // Прикл биохим микробиол. 2021. 57, 5, 458-466.
221. Osmolovskiy A.A., Schmidt L., Orekhova A.V., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Effect of proteinase from *Aspergillus fumigatus* on blood plasma proteins // Moscow Univ Biol Sci Bull. 2021. 76, 71–76.
222. Попова Е.А., Крейер В.Г., Комаревцев С.К., Шабунин С.В., Осмоловский А.А. Свойства высокоактивной в отношении фибриллярных белков внеклеточной протеиназы, образуемой микромицетом *Aspergillus ustus* 1 // Прикл биохим микробиол. 2021. 57, 2, 138–144.
223. Osmolovskiy A.A., Lukianova A.A., Zvonareva E.S., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Combined microbiological approach to screening of producers of proteases with hemostasis system proteins activity among micromycetes // Biotech Rep (Amst). 2018. 19: e00265.
224. Anson M. Crystalline carboxypolypeptidase // Science. 1935. 81, 2106, 467-468.
225. Hagihara B., Matsubara H., Nakai M., Okunuki K. Crystalline bacterial proteinase // J Biochem. 1958. 45, 3, 185-194.
226. Tamura Y., Otsuka A., Sone K., Sakurai E., Mori H., Sumi H., Kosugi T., Fujii S. A method using fibrin-fixed blue dextran for determining the plasmin and plasmin inhibitor activities in human plasma // Biochim Biophys Acta. 1978. 525, 1, 194-199.

227. Звонарева Е.С., Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Котова И.Б., Егоров Н.С. Продукция протеиназ с плазминоподобной и активирующей прекалликреин активностью микромицетом *Aspergillus terreus* // Прикл биохим микробиол. 2018. 54, 2, 195–200.
228. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Кураков А.В., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Микромицеты *Aspergillus ochraceus* – продуценты внеклеточных протеиназ – активаторов протеина С плазмы крови // Прикл биохим микробиол. 2012. 48, 5, 537-542.
229. Bradford M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding // Anal Biochem. 1976. 72, 248-254.
230. Astrup T., Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity // Arch Biochem Biophys. 1952. 40, 2, 346-51.
231. Lassen M. Heat denaturation of plasminogen in the fibrin plate method // Acta Physiol Scand. 1953. 27, 4, 371-376.
232. Осмоловский А.А., Звонарева Е.С., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Воздействие внеклеточных протеаз микромицетов рода *Aspergillus* на белки системы гемостаза // Биоорг хим. 2014. 40, 6, 688–694.
233. Звонарева Е.С., Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Котова И.Б., Егоров Н.С. Выявление мишеней действия внеклеточных протеаз - активаторов белков системы гемостаза, образуемых микромицетами *Aspergillus ochraceus* и *Aspergillus terreus* // Биоорг хим. 2015. 41, 5, 559–564.
234. Laemmly U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. 227, 5259, 680-685.
235. Hu Y., Yu D., Wang Z., Hou J., Tyagi R., Liang Y., Hu Y. Purification and characterization of a novel, highly potent fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* DC27 screened from Douchi, a traditional Chinese fermented soybean food // Sci Rep. 2019. 9. 9235. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45686-y>
236. Thornton D.J., Carlstedt I., Sheehan J.K. Identification of glycoproteins on nitrocellulose membranes and gels // Methods Mol Biol. 1994. 32, 119-128.

237. Beynon R., Bond J.S. Proteolytic Enzymes. A practical approach. // Ed. Oxford: Oxford Univ. Press, 2001. 340 p.
238. Попова Е.А., Бедненко А.М., Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Котова И.Б., Егоров Н.С. Секреция микромицетами внеклеточных протеиназ, активных по отношению к фибриллярным белкам // Вестн Моск Ун-та. 2017. 72, 4 241–245.
239. Лукьянова А.А., Корниенко Е.И., Виган П.А., Крейер В.Г., Кураков А.В., Осмоловский А.А. Секреция микромицетами протеиназ с активностью, подобной активности белков системы гемостаза // Вестн Моск Ун-та. 2020. 75, 1 37–42.
240. Gonçalves R. C. R., Lisboa H. C. F., Pombeiro-Sponchiado S. R. Characterization of melanin pigment produced by *Aspergillus nidulans* // World J Microbiol Biotechnol. 2012, 28, 4, 1467–1474.
241. Chakrabarti S.K., Matsumura N., Ranu R.S. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease from *Aspergillus terreus* (IJIRA 6.2) // Curr Microbiol. 2000. 40, 4, 239–244.
242. Звонарева Е.С., Осмоловский А.А., Баранова Н.А., Котова И.Б., Крейер В.Г. Свойства внеклеточной протеиназы - активатора прекалликреина, образуемой микромицетом *Aspergillus terreus* 2 // Прикл биохим микробиол. 2023. 59, 4, 369–375.
243. Reichard U., Cole G.T., Hill T.W., Ruchel R., Monod M. Molecular characterization and influence on fungal development of ALP2, a novel serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* // Int J Med Microbiol. 2000. 290, 6, 549–558.
244. Phadatare S.U., Srinivasan M.C., Deshpande V.V. Evidence for controlled autoproteolysis of alkaline protease. A mechanism for physiological regulation of conidial discharge in *Conidiobolus coronatus* // Eur J Biochem. 1992. 205, 2, 679–686.
245. Podder S., Saha D., Ghosh T.C. Deciphering the intrinsic properties of fungal proteases in optimizing phytopathogenic interaction // Gene. 2019. 711: 143934.
246. Budak S.O., Zhou M., Brouwer C., Wiebenga A., Benoit I., Di Falco M., Tsang, A., de Vries R.P. A genomic survey of proteases in *Aspergilli* // BMC Genomics. 2014. 15, 1, 523-537.

247. Morya V. K., Yadav V. K., Yadav S., Yadav D. Active Site Characterization of Proteases Sequences from Different Species of *Aspergillus* // Cell Biochem Biophys. 2016. 74, 3, 327–335.
248. MycoCosm. The Fungal Genomics Resource // Joint Genome Institute [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://mycocosm.jgi.doe.gov/mycocosm/home/releases?flt=aspergillus> (дата обращения 01.04.2024).
249. SwissProt // SIB Swiss Institute of Bioinformatics [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.uniprot.org/uniprotkb?query=aspergillus+secreted+protease&facets=reviewed%3Atrue> (дата доступа 01.04.2024).
250. Ntana F., Mortensen U.H., Sarazin C., Figge R. *Aspergillus*: A Powerful Protein Production Platform // Catalysts. 2020. 10, 9, 1064-1092.
251. Savković Ž., Stupar M., Unković N., Ivanović Ž., Blagojević J., Vukojević J Ljaljević Grbić M. In vitro biodegradation potential of airborne *Aspergilli* and *Penicillia* // Sci Nat. 2019. 106: 8.
252. Šimonovičová A., Kraková L., Pangallo D., Majorošová M., Piecková E., Bodoriková S., Dörnhöferová M. Fungi on mummified human remains and in the indoor air in the Kuffner family crypt in Sládkovičovo (Slovakia) // Int Biodeter Biodegradat. 2015. 99, 157–164.
253. Wu H.-Y., Mortensen U.H., Chang F.-R., Tsai H.Y. Whole genome sequence characterization of *Aspergillus terreus* ATCC 20541 and genome comparison of the fungi *A. terreus* // Sci Rep. 2023. 13, 194.
254. Van Norman G.A. Limitations of Animal Studies for Predicting Toxicity in Clinical Trials // JACC Basic Transl Sci. 2019. 4, 7, 845-854.
255. Houbraken J., Kocsube S., Visagie C.M., Yilmaz N., Wang X.-C., Meijer M., Kraak B., Hubka V., Bensch K., Samson R.A., Frisvad J.C. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (*Eurotiales*): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species // Stud Mycol. 2020. 95, 1, 5-169.

256. Barranco-Medina S., Murphy M., Pelc L., Chen Z., Di Cera E., Pozzi N. Rational Design of Protein C Activators // *Sci Rep.* 2017. 7: 44596.
257. Rosén S.B., Sturk A. Activated protein C resistance – a major risk factor for thrombosis // *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1997. 35, 7, 501-516.