

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В.ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи



Фокичев Николай Сергеевич

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

1.5.6. Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Осмоловский А.А.

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	7
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	17
1.1. СИСТЕМА ГЕМОСТАЗА В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ.....	17
1.1.1. Компоненты системы гемостаза и система свертывания крови	17
1.1.2. Противосвертывающая система крови	26
1.1.3. Тромбозы и тромботические осложнения	30
1.1.4. Тромботические осложнения при COVID-19.....	35
1.2. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ТРОМБОТЕРАПИИ.....	40
1.2.1. Антитромботические средства	40
1.2.2. Антикоагулянты и антиагреганты	42
1.2.3. Тромболитические препараты	46
1.2.4. Новые подходы в терапии тромбозов и терапии тромботических осложнений активаторами плазминогена.....	55
1.3. МИКРОМИЦЕТЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ ПРЕПАРАТОВ, ЭФФЕКТИВНЫХ В ОТНОШЕНИИ ТРОМБОТЕРАПИИ И ДИАГНОСТИКИ ПАТОЛОГИЙ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА	57
1.3.1. Фибринолитические ферменты прямого действия, выделенные из разных групп живых организмов	57
1.3.2. Физико-химические особенности ферментов микромицетов, обуславливающие их тромболитическое применение	63
1.3.3. Микромицеты рода <i>Tolyocladium</i> как продуценты перспективных тромболитических препаратов.....	70

1.3.4. Белое море как экологическая ниша для скрининга новых штаммов микромицетов рода <i>Tolyposcladium</i>	72
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	76
2.1. Объект исследования.....	76
2.2. Молекулярно-генетическая идентификация изолятов микромицетов из грунтов Белого моря.....	77
2.3. Выявление протеолитического потенциала штаммов (определение энзиматического индекса штаммов микромицетов).....	80
2.4. Зависимость радиальной скорости роста микромицетов-продуцентов от pH, температуры и солености.....	80
2.5. Получение препарата протеиназ из культуральной жидкости и его разделение методом изоэлектрофокусирования.....	82
2.6. Определение общей протеолитической активности.....	84
2.7. Определение фибринолитической активности.....	84
2.8. Определение протеолитической активности в отношении отдельных белков системы гемостаза.....	86
2.9. Изучение динамики накопления протеиназ, образуемых штаммами микромицетов.....	87
2.10. Определение pH- и температурного оптимума активности, и оптимума стабильности препарата.....	88
2.11. Определение тромболитического эффекта (степень эффективности тромболизиса).....	89
2.12. Препаративный электрофорез белков.....	90
2.13. Определение углеводного компонента в составе препаратов протеиназ.....	90
2.14. Выявление коагулазной активности.....	92

2.15. Обработка результатов.....	92
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	93
3.1. Идентификация изолятов микромицетов из грунтов Белого моря.	93
3.1.1. Молекулярно-генетическая идентификация изолятов микромицетов из грунтов Белого моря	93
3.1.2. Изучение зависимости радиальной скорости роста микромицетов от pH, температуры и солености.....	96
3.1.3. Выявление протеолитического потенциала штаммов (определение энзиматического индекса штаммов микромицетов)	101
3.1.4. Исследование препаратов, полученных из штаммов-изолятов <i>Tolypocladium</i> в экспериментах по тромболизису	103
3.1.5. Изучение динамики накопления протеиназ, образуемых штаммами микромицетов.....	105
3.1.6. Определение температурного и pH-оптимумов, а также оптимумов термо- и pH-стабильности препарата протеиназ штамма <i>Tolypocladium inflatum</i> 62a	111
3.1.7. Фракционирование препарата протеиназ культуральной жидкости штамма <i>Tolypocladium inflatum</i> 62a методом изоэлектрофокусирования	113
3.1.8. Определение углеводного компонента во фракциях препарата протеиназ культуральной жидкости штамма <i>Tolypocladium inflatum</i> 62a	115
3.1.9. Определение наличия коагулазной активности во фракции препарата протеиназ культуральной жидкости штамма <i>Tolypocladium inflatum</i> 62a	116
3.2. Исследование тромболитических свойств ближайшего аналога микромицета-продуцента <i>Tolypocladium inflatum</i> k1.....	117

3.2.1. Культивирование штамма-ближайшего аналога <i>Tolypocladium inflatum</i> k1, получение препарата протеиназ.....	118
3.2.2. Исследование препарата, полученного из культуральной жидкости штамма <i>Tolypocladium inflatum</i> k1, в экспериментах по тромболизису.....	118
3.2.3. Определение температурного и рН-оптимумов, а также оптимумов термо- и рН-стабильности препарата протеиназ штамма <i>Tolypocladium inflatum</i> k1	119
3.2.4. Фракционирование препарата протеиназ культуральной жидкости штамма <i>Tolypocladium inflatum</i> k1 методом изоэлектрофокусирования	121
3.2.5. Определение углеводного компонента во фракциях препарата протеиназ культуральной жидкости штамма <i>Tolypocladium inflatum</i> k1	124
3.2.6. Определение наличия коагулазной активности во фракциях препарата протеиназ культуральной жидкости штамма <i>Tolypocladium inflatum</i> k1	125
3.2.7. Электрофорез препаратов протеиназ, выделенных из культуральной жидкости штаммов-изолятов	126
3.3. Тромболитический потенциал микромицета <i>Tolypocladium inflatum</i> 62a для биотехнологического применения, терапии тромботических состояний и медицинской диагностики.....	127
3.3.1. Сопоставление свойств препаратов протеиназ и отдельных фракций микромицетов <i>Tolypocladium inflatum</i> 62a и <i>Tolypocladium inflatum</i> k1	128
3.3.2. Тромболитический потенциал препаратов, вырабатываемых микромицетом <i>Tolypocladium inflatum</i> 62a.....	130

3.3.3. Пути коммерциализации тромболитического препарата протеиназ <i>Tolypocladium inflatum</i> 62a	133
3.3.4. Пути масштабирования, производства и возможного применения препарата протеиназ <i>Tolypocladium inflatum</i> 62a	143
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	152
ВЫВОДЫ	155
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	157

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

α 2-PA – антитрипсин

CRP – С-реактивный белок

COX – циклооксигеназа

GP – гликопротеины

HIF – индуцированный гипоксией фактор

MIS – мультисистемный воспалительный синдром

PAI – ингибитор активатора плазминогена

PAR – рецептор, активируемый протеиназой

PDI – протеин-дисульфидные изомеразы

PLG – плазминоген

TAFI - активируемый тромбином ингибитор фибринолиза (TAFI)

t-PA – тканевый активатор плазминогена

TxA₂ – тромбоксан А

vWF – фактор фон Виллебранда

ВМК – высокомолекулярный кининоген

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

НМГ – низкомолекулярные гепарины

ОРДС – острый респираторный дистресс-синдром

ТЭЛА – тромбоэмболия легочной артерии

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

Сердечно-сосудистые заболевания занимают лидирующую позицию среди причин общемировой смертности (31%) и ежегодно уносят жизни более 8,9 млн. человек. При этом около 15,5% случаев смертности приходится непосредственно на ишемическую болезнь сердца, около 11,1% – на инсульты и связанные с ними последствия, около 2,3% – на состояния, связанные с развитием тромбоэмболии легочной артерии. Более того, практически все патологии сердечно-сосудистой системы и системы гемостаза так или иначе сопряжены с возникновением и развитием тромбозов в период лечения¹.

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

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

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

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

Одним из перспективных продуцентов, протеиназы которого обладают не только выраженной плазминоподобной активностью, но и активаторной к плазминогену активностью, является штамм почвенного микромицета *Tolypocladium inflatum* k1 (Шаркова и соавт., 2016). Виды *Tolypocladium* существуют как сапротрофы, так и как патогены насекомых (Bissett et al., 1983). *Tolypocladium inflatum*, а также *Tolypocladium cylindrosporum* являются энтомопатогенными представителями своего рода, которые изучались в качестве возможных агентов биологической борьбы с насекомыми. Различные свойства этих микромицетов, связанные с их патогенностью и способностью проникать через кутикулу насекомых, имеют большое биотехнологическое значение. В данных процессах могут участвовать ферментные комплексы, катализирующие липолиз, хитинолиз и протеолиз.

Перспективным биотехнологическим подходом к разработке новых тромболитических препаратов на основе продуцентов из группы *Tolypocladium* представляется изучение штаммов микромицетов данного рода, выделенных не только из почвенных экониш, но также полученных из других грунтов с отличными физико-химическими свойствами. Источником подобных штаммов может являться экониша донных грунтов Белого моря. Рядом исследователей было показано большое разнообразие микромицетов, существующих в данных физико-химических условиях. Песчаные грунты прибрежной зоны морей представляют собой специфические и практически

неизученные местообитания грибов. Их уникальность связана, в первую очередь, с особенностями литоральной зоны, для которой характерно периодическое затопление и осушение, регулярные изменения влажности, солености и температуры. Использование культуральных методов позволяет выделять из донных осадков разнообразные виды микромицетов, в том числе и некоторые новые для науки (Бубнова, 2009).

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

Цель и задачи работы

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

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Идентифицировать по молекулярно-биологическим признакам штаммы-изоляты рода *Tolypocladium*, выделенные из грунтов Белого моря.

2. Провести сравнительный анализ тромболитических показателей исследуемых штаммов друг с другом по значениям энзиматического индекса на диагностических средах с казеином, фибрином и фибриногеном, и выбрать наиболее специфичный в отношении фибриллярных белков.

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

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

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

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

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

Предметом исследования являлись разнообразные биотехнологические способы выявления и оценки тромболитического потенциала микромицетов,

необходимого для создания медицинских препаратов и диагностических наборов на основе их экзопротеиназ.

Научная новизна работы

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

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

Впервые изучены и сопоставлены биохимические свойства экзопротеиназ штаммов *Tolyposcladium inflatum* 62а и штамма *Tolyposcladium inflatum* k1 (ближайшего ранее описанного аналога, обладающего тромболитическим потенциалом) по показателям степени тромболизиса, фибринолитической и активаторной активности, а также активности в отношении отдельных белков системы гемостаза (реакции с хромогенными субстратами), термо- и рН-стабильности, наличие коагулазной активности и реакции на гликопротеины.

Впервые для протеиназ штамма *Tolyposcladium inflatum* 62а показано наличие выраженного пролонгированного во времени тромболитического эффекта в отношении лизиса фибринового геля, что свидетельствует о возможности его применения для разработки тромболитических

лекарственных препаратов, в т.ч. комбинированных, с медленным клиренсом из кровотока, позволяя минимизировать затраты на количество вводимой субстанции, тем самым снижая стоимость препарата и геморрагические риски для пациента. Также наличие подобного эффекта может быть использовано для разработки диагностикумов на патологии системы гемостаза, оценки резерва плазминогена и состояния фибринолитической системы. Помимо этого, возможно использование препарата протеиназ для создания аппликационных медицинских изделий для наружного применения – раневых повязок, противогематомных и ангиопротекторных мазей.

Теоретическая и практическая значимость работы

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

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

Методология и методы исследования

Автором выполнены анализ отечественной и зарубежной литературы по теме исследования, планирование и проведение экспериментальной и теоретической частей работы с использованием современных методов микробиологии и биотехнологии, биохимии, молекулярной биологии и

биоинформатики. Полученные результаты были проанализированы, систематизированы и изложены в тексте работы, сформулированы выводы и практические рекомендации.

Положения, выносимые на защиту

1. Штамм *Tolypocladium inflatum* 62a среди семи выделенных из грунтов Белого моря штаммов микромицетов, относящихся по видовой принадлежности к *Tolypocladium inflatum* и *Tolypocladium cylindrosporum*, обладает наиболее выраженным тромболитическим потенциалом, демонстрирует высокую специфичность к фибриллярным белкам при поверхностном культивировании на диагностических средах с казеином, фибрином и фибриногеном.

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

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

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

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов определяется значительным объемом проведенных исследований, использованием в работе современных

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

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

Структура работы

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

Публикации

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

Благодарности

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

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. СИСТЕМА ГЕМОСТАЗА В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ

Система гемостаза представляет собой жизненно-важную эволюционно-сложившуюся совокупность защитных реакций, проявляющихся в ответ на кровотечения при повреждении стенок сосудистого эндотелия, приводящую к контакту крови с соединительной тканью субэндотелиального слоя. В функции системы гемостаза входят предупреждение и ликвидация последствий кровотечений, обеспечение и поддержание динамической вязкости крови, восстановление нормального кровотока за счет удаления тромбов из кровеносного русла.

1.1.1. Компоненты системы гемостаза и система свертывания крови

Компоненты системы гемостаза – клетки крови, наружная и внутренняя стенки сосуда, плазменные факторы свертывания тесно взаимосвязаны друг с другом и образуют сложную каскадную структуру взаимодействий на уровне отдельных последовательных реакций, регулируемых нейрогуморальными механизмами, и запускающих «первичный (временный) гемостаз» (образование тромбоцитарного тромба в результате активации тромбоцитов) и «вторичный (постоянный) гемостаз» (коагуляция крови, купирование распространения тромба и тромболизис) (рис. 1).

Система гемостаза включает в себя несколько звеньев, к которым относятся система свертывания крови и противосвертывающая система, включающая антикоагуляционную подсистему и подсистему фибринолиза (ферментативного и неферментативного).

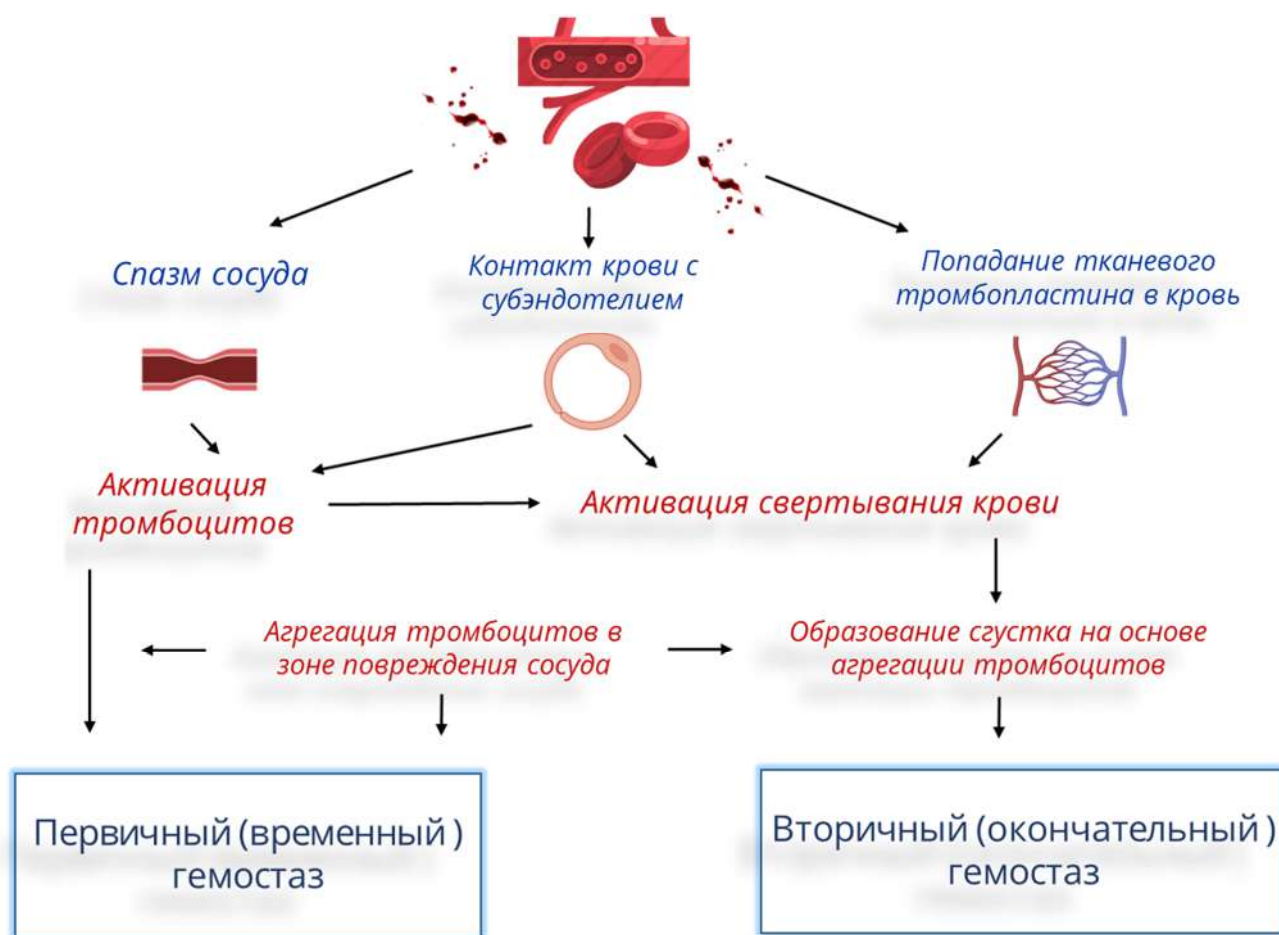


Рисунок 1. Взаимосвязь основных элементов системы гемостаза

Нормальное функционирование системы гемостаза возможно лишь при согласованности взаимодействия всех подсистем. Нарушения в любом из звеньев приводят к изменению функционального состояния остальных и сопровождаются компенсаторными изменениями с их стороны.

Свертывание крови или тромбообразование представляет собой комплексный защитный механизм, запускаемый в ответ на повреждение сосудов, и предохраняющий организм от выраженной кровопотери (рис. 2). Этот процесс инициируется, как правило, при значительном кровотечении, когда тромбоцитарного тромба недостаточно для его полной остановки.

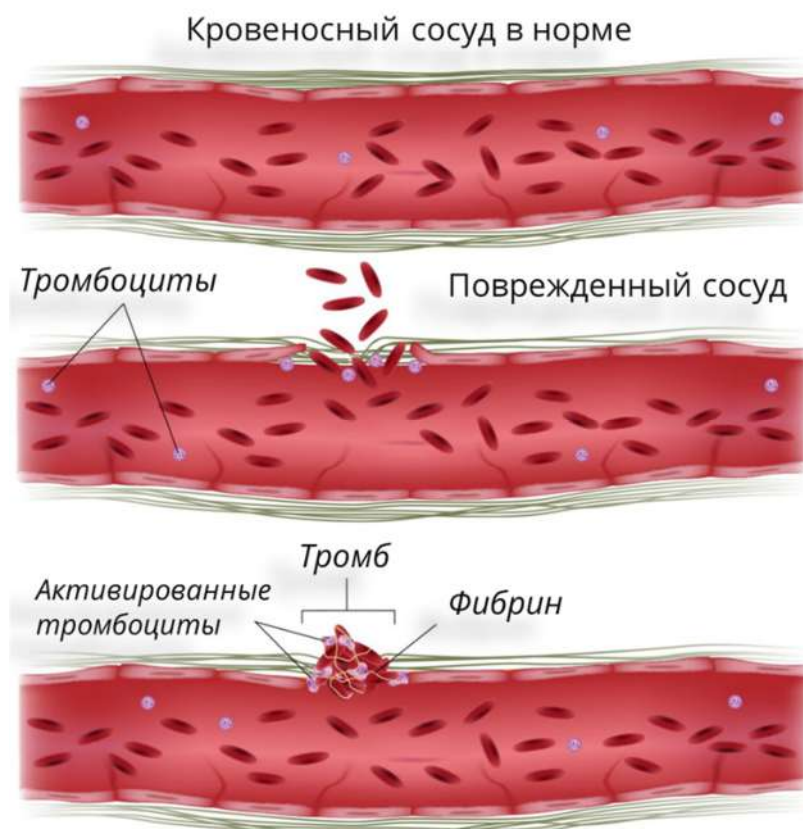


Рисунок 2. Этапы активации процесса тромбообразования в поврежденном сосуде

Природа происходящих последовательных реакций при тромбообразовании относится к ферментативной, при этом в процесс вовлекаются физиологически активные вещества – плазменные факторы коагуляции крови, к которым относится комплекс белков и ферментов, обозначаемых соответственно в хронологическом порядке римскими цифрами или соответствующими названиями (табл. 1).

Таблица 1. Характеристика факторов коагуляции крови (по Шмидт и Тевс, 2005)

Номер фактора	Название фактора	Тип молекулы	Функции
I.	Фибриноген	Белок	Под действием тромбина фибриноген превращается в нерастворимый в крови фибриллярный белок — фибрин, основное вещество тромба (сгустка).
II.	Протромбин	Гликопротеин	Полимеризуется в фибриноген, активирует факторы V, VIII, XIII, стимулирует противосвертывающую систему
III.	Тромбопластин	Трансмембранный белок	Кофактор фактора VII
IV.	Ионы Ca ²⁺	Двувалентный катион	Участвует в активации и агрегации тромбоцитов, полимеризации фибриногена, стабилизации фибрина. Связывает факторы протромбинного комплекса с фосфолипидами
V.	АС-глобулин	Белок	Регуляторный белок, активирует фактор X
VII.	Проконвертин	Гликопротеин	Активирует фактор X, ускоряет превращение протромбина в тромбин
VIII.	Антигемофильный глобулин	Гликопротеин	Кофактор фактора X
IX.	Кристалмас-фактор	Гликопротеин	Участвует в качестве катализатора, активирует фактор X в комплексе с фактором VIII и IV
X.	фактор Стюарта-Прауэра	Гликопротеин	Участвует в образовании протромбиназы, превращающей протромбин в тромбин
XI.	Предшественник тромбопластина	Гликопротеин	Участвует в активации факторов VIII и IX
XII.	фактор Хагемана	Белок	Участвует в активации фактора XI, превращении прекалликреина в калликреин
XIII.	Фибринолиза-фибрин стабилизирующий фактор	Глобулин	Стабилизирует фибрин, участвует в формировании плотного сгустка
-	Фактор Флетчера, прекалликеин	Белок	
-	Фактор Фицджеральда, Высокомолекулярный кининоген (ВМК)	Белок	

В основе процесса формирования фибринового сгустка лежит превращение растворимого фибриногена (белок, присутствующий в плазме крови) в нерастворимый фибрин. Этому процессу предшествует ряд

протеолитических реакций, приводящих к активации фермента тромбина, осуществляющего превращение фибриногена в фибрин (Северин, 2014).

Тромбин (молекулярная масса 39 кДа) относится к классу гликопротеинов, образуется в крови из неактивного предшественника протромбина (70 кДа), синтезирующегося в печени, содержащего остатки γ -карбоксихлутаминовой кислоты. В ходе синтеза последний подвергается ко-трансляционной модификации в ходе витамин К-зависимой реакции (Howard et al., 2006). Тромбин катализирует гидролиз пептидных связей, образованных остатками аргинина и лизина, обладает ограниченной субстратной специфичностью. В ходе частичного протеолиза тромбин превращает фибриноген в фибрин (Веремеенко, 1988).

Фибриноген также представляет собой синтезирующийся в печени гликопротеин с молекулярной массой 340 кДа. Молекула фибриногена является гексамером, содержащим два набора из трех различных полипептидных цепей (обозначаемых соответственно $A\alpha_2$, $B\beta_2$, γ_2), связанных друг с другом дисульфидными мостиками (рис. 3). N-концевые участки этих трех цепей содержат остатки цистеина, которые участвуют в перекрестном сшивании цепей. С-концевые части цепей α , β и γ содержат домен приблизительно из 225 аминокислотных остатков, который может функционировать как единица молекулярного распознавания (Suzuki et al., 2020). В фибриногене, так же, как и в ангиопоэтине, этот домен участвует в белок-белковых взаимодействиях. На фибриногенных α - и β -цепях имеется небольшая пептидная последовательность (называемая фибринопептидом). Эти небольшие пептиды являются своеобразным якорем, предотвращающим самопроизвольное формирование фибриногена с полимерами (Doolittle, 1984).

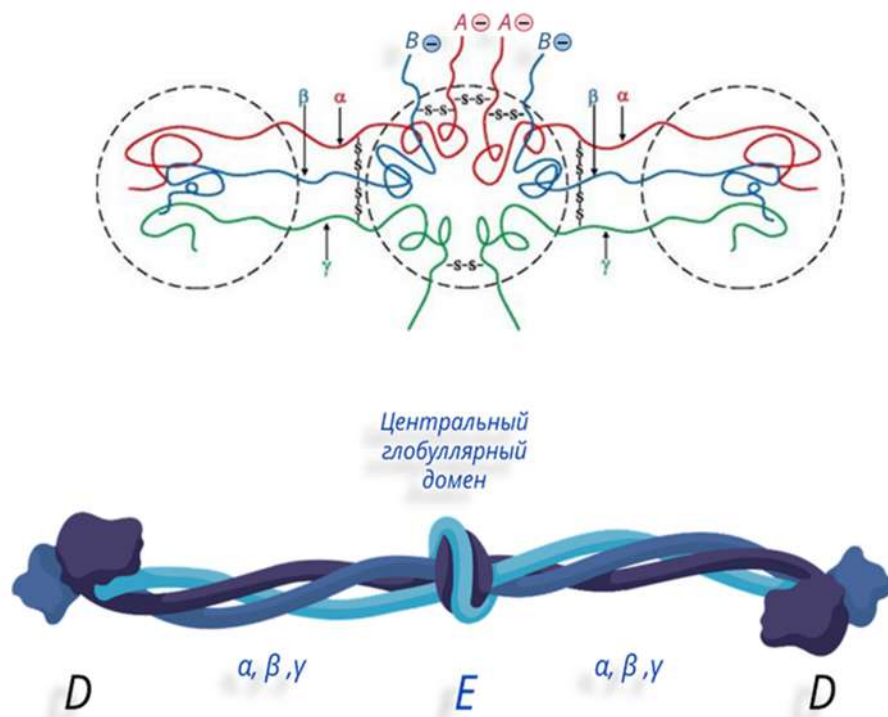


Рисунок 3. Строение молекулы фибриногена (из центрального глобулярного домена E выступают N-концевые участки фрагментов A и B цепи. Мономер фибрина, образующийся из фибриногена, имеет состав $(\alpha, \beta, \gamma)_2$) (по Северину Е.С., 2014, в модификации)

Преобразование фибриногена в фибрин происходит в несколько этапов. Сначала тромбин расщепляет фибринопептиды A и B, расположенные на N-конце фибриногенной α - и β - цепи соответственно (Blombäck et al., 1978). Полученные в результате мономеры фибрина полимеризуются из конца в конец из протофибрилл, которые, в свою очередь, связывают латерально с образованием волокон фибрина (Hermans, McDonagh, 1982). На заключительной стадии фибриновые волокна связываются с образованием фибринового геля (рис. 4, 5) (Lorand et al., 1977).

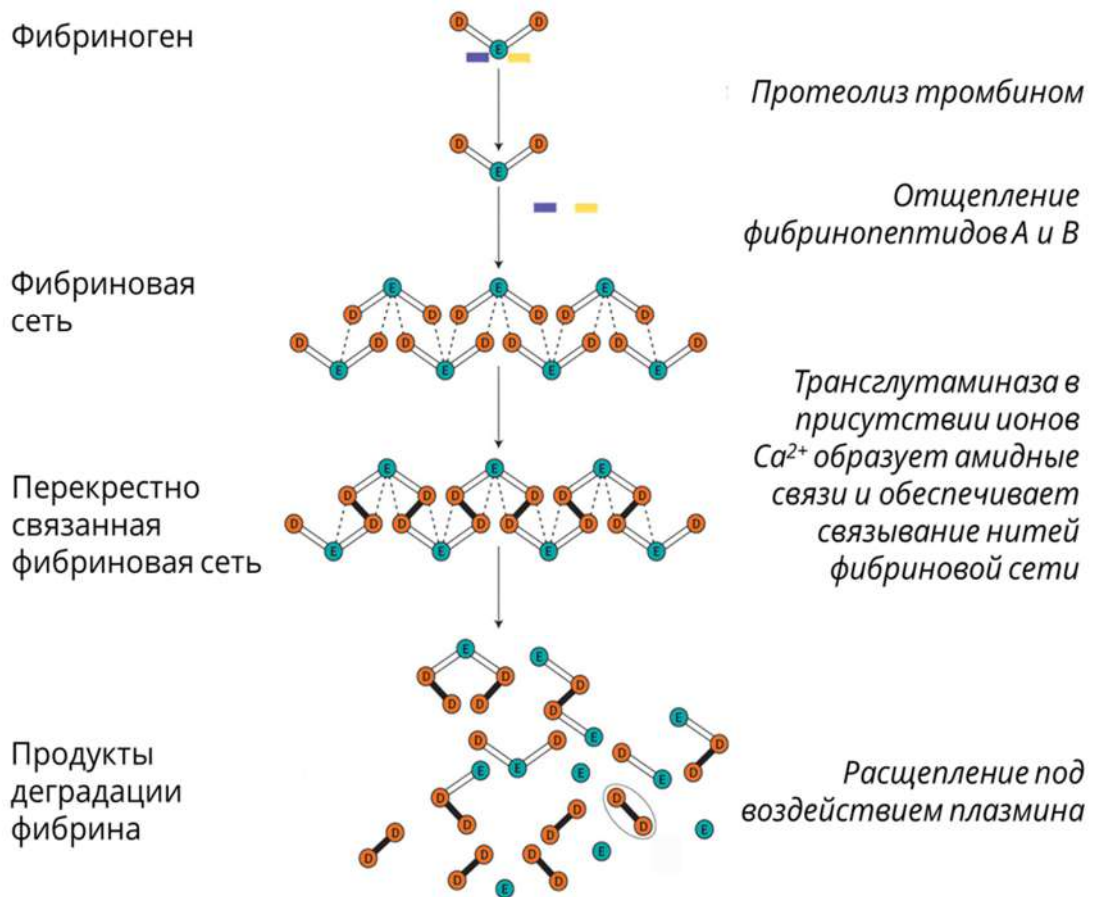


Рисунок 4. Этапы формирования и агрегации фибринового геля

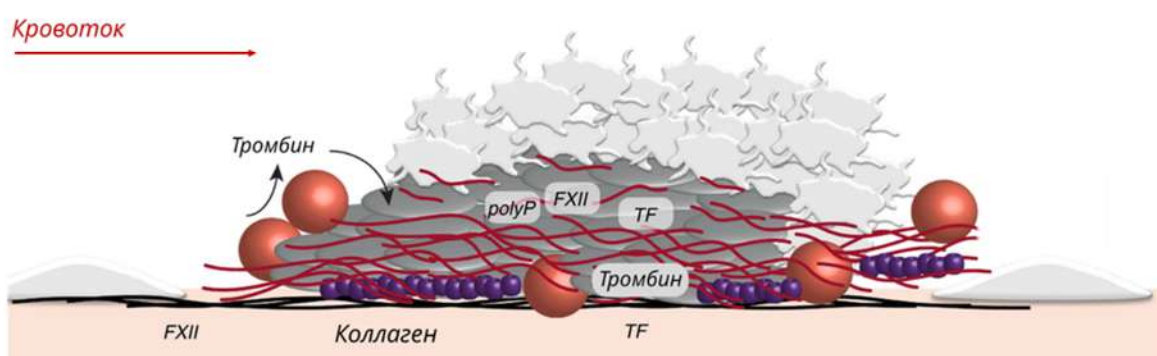


Рисунок 5. Агрегация фибриновых волокон при образовании фибринового геля (по Krishnaswamy A. et al., 2010, в модификации)

В процессе свертывания крови условно выделяют три фазы (I, II, III соответственно): инициации (образования протромбиназы), усиления (превращения протромбина в тромбин) и распространения (превращения фибриногена в фибрин) (рис. 6) (Kumar, Sabu, 2019).

критической реакцией в каскаде коагуляции, который регулирует гемостаз в организме (Krishnaswamy, 2010).

Третья стадия процесса коагуляции, включающая превращение фибриногена в фибрин, условно подразделяется на 3 части: этап образования мономеров фибрина (за счет высвобождения двух фибринпептидов А и Б от фибриногена, индуцированного фактором Па); этап димеризации и олигомеризации фибрина и модификации до легкорастворимой структуры волокон-протофибрилл, и заключительный этап формирования труднорастворимого фибрина, устойчивого к воздействиям большинства протеаз за счет влияния фибринстабилизирующего фактора в присутствии ионов Ca^{2+} .

К моменту окончания реакций третьей стадии сгусток становится прочным и устойчивым к воздействию протеолитических ферментов (Струкова, 2002). Таким образом, свертывание крови *in vivo* – единый многоступенчатый процесс, который связан с гемостатическими реакциями тромбоцитов.

1.1.2. Противосвертывающая система крови

Противосвертывающая система крови имеет рефлекторно-гуморальную природу с индуцированным характером проявления. В случае значительных кровотечений процесс свертывания крови проявляется в качестве ключевой реакции защиты организма. Номинально система фибринолиза включает в себя антикоагулянтное звено и фибринолитическое звено.

Физиологические первичные антикоагулянты образуются независимо от протеолиза. Они в основном представлены такими ингибиторными факторы, как гепарин, протеин С, протеин S и тромбомодулин (табл. 2). Некоторые из них встречаются в естественной среде в организме кровососущих животных, таких как пиявки и москиты.

Таблица 2. Общая характеристика наиболее значимых антикоагулянтов

Название:	Тип Молекулы:	Свойства и функции:
Гепарин	Мукополисахарид (от 3 до 43 кДа)	Существует исключительно в связанном виде, образует конгломераты с различными компонентами крови, ингибирует процесс образования протромбиназы, блокирует превращение протромбина в тромбин и взаимодействие тромбина с фибриногеном
Тромбомодулин	Интегральный мембранный белок (74 кДа)	Высокоаффинный рецептор тромбина, находящийся на клетках эндотелия кровеносных сосудов, ингибирует коагуляционный потенциал тромбина, совместно с тромбином активирует протеин С, чему способствует протеин S.
Протеин С	Сериновая протеаза (легкая цепь 21 кДа, тяжелая цепь 41 кДа)	Витамин- К -зависимый белок, в активном состоянии имеет свойства сериновой протеазы, инактивирует факторы Va и VIIa, стимулирует фибринолиз и прерывает тромбиногенез, также в активированной форме имеет выраженную противовоспалительную активность.
Протеин S	Гликопротеин (~ 570 кДа)	Витамин К - зависимый одноцепочечный плазменный протеин, синтезирующийся в печени является кофактором активированного протеина С, вместе с которым регулирует процесс свертывания крови. Участвует в каскаде, ограничивающем генерацию тромбина на периферии тромба, в плазме существует в двух формах – свободной и связанной.

Антикоагулянты тесно связаны с антитромбоцитарными препаратами и тромболитическими препаратами, влияя на различные пути свертывания крови. В частности, антитромбоцитарные препараты ингибируют агрегацию (слипание) тромбоцитов, тогда как антикоагулянты ингибируют каскад коагуляции с помощью факторов свертывания крови, которые образуются после первоначальной агрегации тромбоцитов (Kumar, Sabu, 2019).

Неферментативный фибринолиз выполняет важную функцию поддержания общей динамической вязкости крови, в частности ее жидкого состояния, таким образом обеспечивая естественную профилактику тромбозов. Его компоненты способны подавлять ранние стадии

фибринообразования. Интересно и то, что неферментативный фибринолиз способствует предупреждению тромбообразования во время стрессовых для организма ситуаций, при которых происходит трансформация адреналина из фактора риска в компонент противосвертывающей системы (Shibata et al.,

Ферментативный фибринолиз представляет собой процесс растворения тромбов, индуцированный плазмином, расщепляющим фибрин. В процессе ферментативного фибринолиза участвуют и вовлекаются такие компоненты, как плазмин, плазминоген, их активаторы и ингибиторы. Функционирование этой системы приводит к синтезу мощного протеолитического фермента – плазминогена, обладающего широким действием *in vivo* (Шиффман, 2001). Взаимосвязь основных этапов, компонентов и реакций, происходящих в процессе ферментативного фибринолиза, показаны на рисунке 7.

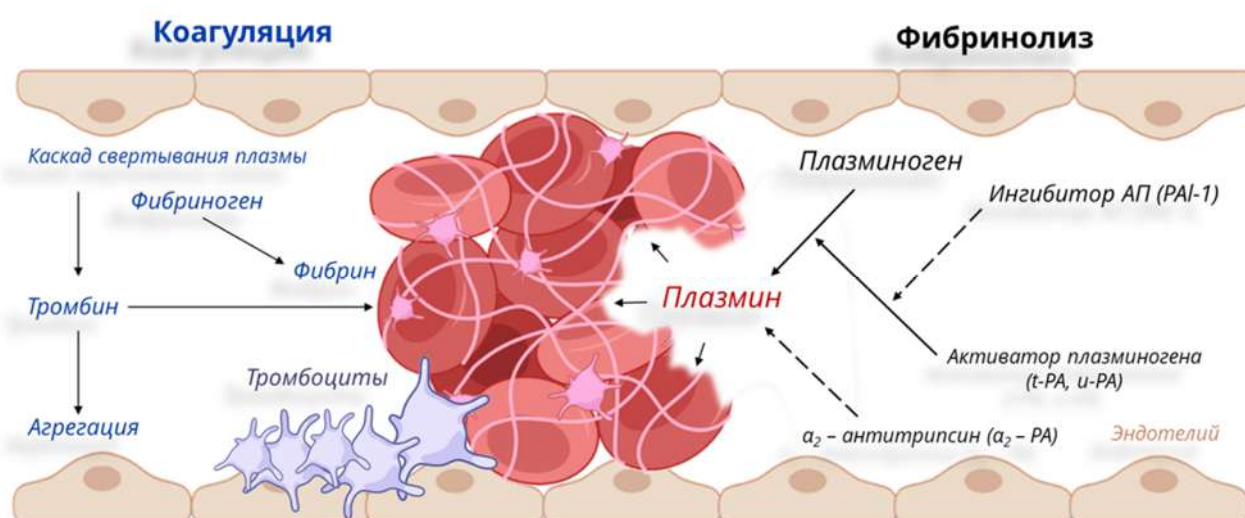


Рисунок 7. Основные этапы и реакции процесса ферментативного фибринолиза

Основной путь активации ферментативного фибринолиза (внешний путь) осуществляется за счет влияния тканевого активатора плазминогена (t-PA), являющегося сериновой протеазой, обнаруженной на эндотелиальных клетках выстилки кровеносных сосудов. В качестве фермента он катализирует превращение плазминогена в плазмин, главный фермент, ответственный за

разрушение сгустка. Поскольку t-PA работает на системе свертывания крови, то он (также как альтеплаза, ретеплаза и тенектеплаза) находит применение в клинической медицине для лечения эмболических или тромботических инсультов. Тканевый активатор плазминогена также играет важную роль в миграции клеток и ремоделировании тканей (Wang et al., 2005).

Плазмин представляет собой сериновую протеазу, которая участвует в растворении сгустков фибрина. В своей структуре содержит пять схожих структурных доменов, т.н. “kringle”-доменов (K1-K5), имеющих форму петель (рис. 8). Помимо фибринолиза, белки плазминового протеолиза обнаруживаются в других системах: они активируют коллагеназы, некоторые медиаторы системы комплемента и ослабляют стенку антрального фолликула (приводя к овуляции). Они расщепляют фибрин, фибронектин, тромбоспондин, ламинин и фактор фон Виллебранда (Charin et al., 2014).

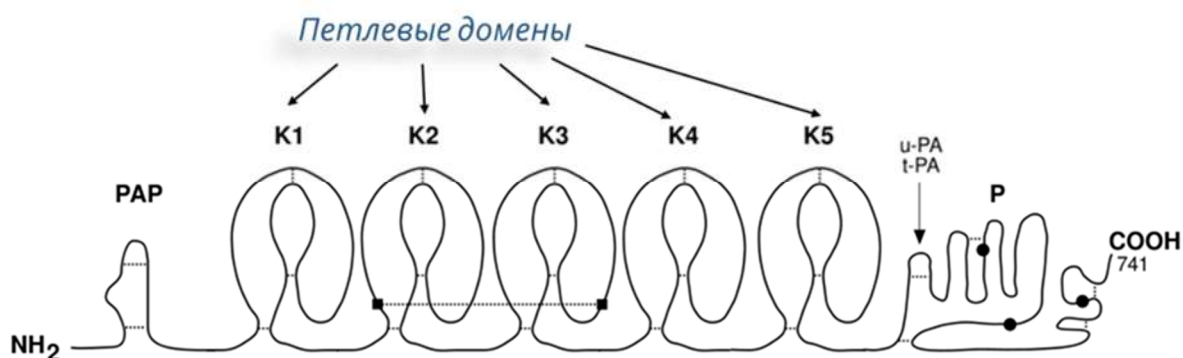


Рисунок 8. Структура и петлевые домены в молекуле плазмина (по Charin et al., 2014 в модификации)

Плазмин выделяется в виде профермента, называемого плазминогеном (PLG), являющегося одноцепочечным гликопротеидом из 791 аминокислотного остатка. При разрыве полипептидной связи между остатками Arg560 и Val561 плазминоген превращается в плазмин (активную протеиназу). В N-концевой части молекулы плазминогена (и плазмина) находятся высокоаффинные лизинсвязывающие участки, которые обеспечивают взаимодействие с фибрином. Помимо тканевого активатора (t-PA) плазминоген может быть активирован за счет участия других ферментов,

например, урокиназа, способных превращаться из одноцепочечной формы в двуцепочечную под действием плазмина и вызывать превращение плазминогена в плазмин (Lin et al., 2020).

Внутренний механизм активации плазминогена осуществляется плазменными активаторами. Описаны два возможных варианта – Хагеман-зависимый и Хагеман-независимый. В результате этого механизма происходит инициация активности фактора Хагемана (фактора XII) и протеолитической калликреин-кининовой системы. Образующийся калликреин помимо генерации кининов, способствует превращению плазминогена соответственно в протеолитический фермент плазмин. Фактор Хагемана оказывается связующим звеном между процессами воспаления и свертывания крови (Henkin et al., 3; 3).

1.1.3. Тромбозы и тромботические осложнения

Нормальный гемостаз может нарушаться патологическими факторами, что приводит к неконтролируемому образованию сгустков и закупорке сосудов в артериях или венах. Артериальный тромбоз возникает в результате образования сгустка на фоне разрыва атеросклеротической бляшки, что приводит к агрегации тромбоцитов и образованию тромбов. Венозные тромбы богаты фибрином и эритроцитами и могут возникать, несмотря на неповрежденную эндотелиальную стенку. Артериальный тромбоз является причиной инфаркта миокарда и инсульта, тогда как венозный тромбоз приводит к венозной тромбоэмболии и тромбозу легочной артерии (Furie, 2008).

В основе сосудистого гомеостаза и тромбообразования в зависимости от сосудистого повреждения или структуры сосудов лежат два основных механизма. Один опосредуется коллагеном, а другой зависит от тканевого фактора. При повреждении слоя эндотелиальных клеток коллаген может высвобождаться из субэндотелиального пространства. Тромбоциты посредством гликопротеинов (GP) GPIIb/IIIa и GPIb/IX, взаимодействуют с

коллагеном и фактором фон Виллебранда. Воздействие коллагена приводит к адгезии тромбоцитов и образованию монослоя тромбоцитов. Тромбоциты образуют трехмерную структуру за счет агрегации через свои активированные интегрины GPIIb / IIIa (αIIbβ3). Активированные тромбоциты привлекают другие циркулирующие тромбоциты путем секреции агрегационных медиаторов, таких как тромбоксан A₂, АДФ, 2 мультимера сверхбольшого фактора фон Виллебранда и серотонина, а также путем производства тромбина. Более глубокое повреждение тканей приводит к высвобождению тканевого фактора из гладких мышц, адвентициальных клеток и перицитов. Тканевый фактор опосредует превращение протромбина в тромбин, образование фибрина и активацию каскада свертывания крови. Эндотелиальные клетки играют важную роль в контроле распространения тромба и его последующем разрешении (рис. 9) (Kourenova et al., 2017).

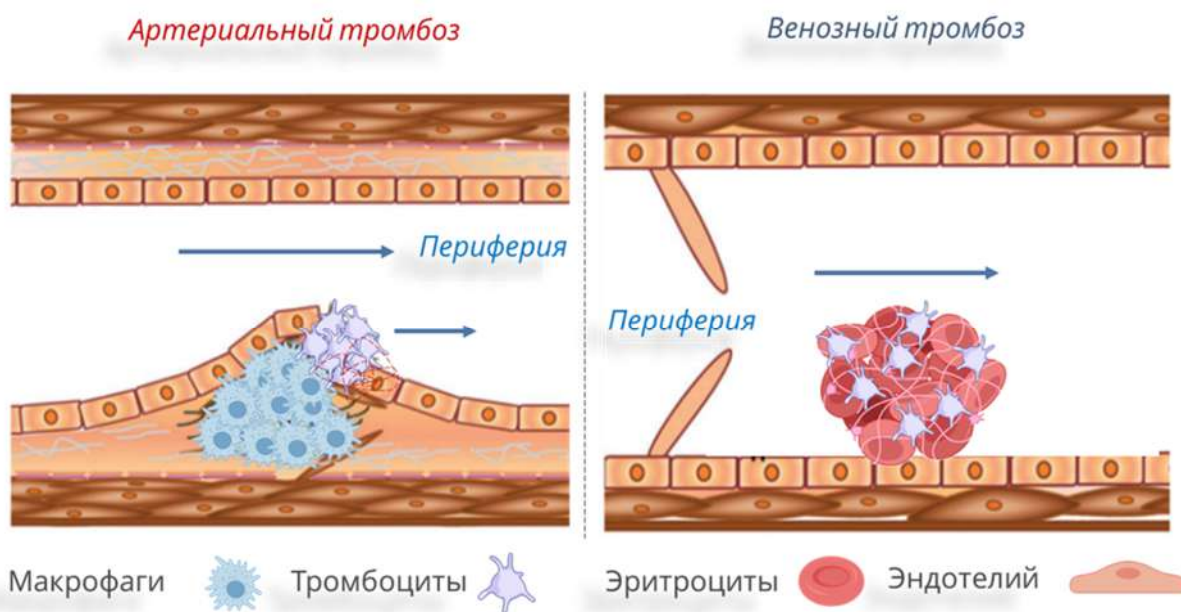


Рисунок 9. Сравнение механизмов артериального и венозного тромбозов

К различным факторам, увеличивающим риски развития артериального тромбоза, чаще всего относят артериальную гипертензию, высокий уровень холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), курение, беременность, диабет, химиотерапию, возраст, инфекционные заболевания,

вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) и высокий уровень фактора фон Виллебранда в плазме. Среди иных факторов риска часто упоминаются сниженная активность ADAMTS13, фермента, расщепляющего мультимеры фактора фон Виллебранда, что приводит к повышенным рискам ишемического инсульта, системная красная волчанка, васкулит, аваскулярный некроз или антифосфолипидные антитела (Sonneveld et al., 2015).

Терапия артериальных тромбов нацелена на активацию и агрегацию тромбоцитов. В последние десятилетия наблюдается рост распространения стенокардии, обструктивной болезни коронарных артерий, инфаркта миокарда и непроходимости коронарных артерий. Патофизиология формирования артериального тромбоза связана с секрецией протеин-дисульфидных изомераз (PDI, ERp5, ERp57) посредством которых тромбоциты и активированные эндотелиальные клетки – PDI могут реагировать с оксидом азота (NO) и активными формами кислорода, способствующими инициации тромбообразования. Активированные эндотелиальные клетки могут влиять на тромбообразование за счет активации тканевого фактора и увеличения образования фибрина. Помимо этого, функционирование активированных эндотелиальных клеток важно для агрегации тромбоцитов и контроля быстрого увеличения выработки тромбина на поверхности активированных тромбоцитов (Williams et al., 2016).

Существует множество молекулярных и иммунологических механизмов, способствующих венозному тромбозу. Венозные тромбы содержат большое количество эритроцитов и фибрина в дополнение к потоку тромбоцитов. Низкая скорость кровотока может привести к гипоксическим состояниям, которые опосредуют увеличение экспрессии молекул эндотелиальной адгезии и последующего прикрепления лейкоцитов. Эритроциты в сгустке меняют форму с двойной вогнутой на многогранную, обеспечивая плотную упаковку и сопротивление фибринолизу (Mackman, 2012).

Образование тромба происходит в условиях повышенной коагуляции, повреждения эндотелия и венозного застоя (то есть триады Вирхова). Факторы

риска тромбоза прямо или косвенно связаны с одним из этих состояний, и обычно известные факторы риска включают иммобилизацию и травму. Пониженная оксигенация (то есть гипоксия) также является фактором риска тромбоза, поскольку частота тромбоза увеличивается при системной или местной гипоксии. Гипоксия возникает, когда потребность в кислороде превышает его поступление, например, когда кровоток снижается из-за неподвижности или нарушается из-за травмы. Снижение оксигенации запускает множество молекулярных и клеточных сигнальных путей, которые могут способствовать регуляции образования тромбов. Другими словами, гипоксия является не только следствием закупорки сосудов, но и стимулирует тромбообразование. Исследования человеческих популяций и животных моделей гипоксии и тромбоза предполагают, что гипоксия и ее последующая передача сигналов способствуют образованию и распространению тромба (Kumar et al., 2009).

Сосудистый ответ на гипоксию контролируется прежде всего факторами транскрипции, индуцируемыми гипоксией (HIF). HIF гетеродимерные факторы ядерной транскрипции, состоящие из субъединиц α и β , которые вместе регулируют транскрипцию генов, обеспечивающих гомеостатический ответ на снижение оксигенации (Dzhalilova & Makarova, 2020). При исследовании венозной гипоксии было показано, что локализованная гипоксия существует в карманах венозных клапанов при непрерывном обтекаемом потоке. В экспериментальной модели у мышей, вызванной ограничением кровотока и эндотелиальным нарушением нижней полой вены, новообразованный венозный тромб в 10 раз менее насыщен кислородом по сравнению с венозной кровью, а уровни HIF-1 и HIF-2 повышены во вновь образовавшемся по сравнению с рассасывающимся венозным тромбом. и стабилизируется в окружающем сосуде (Hammer et al., 1981). Также недавно было показано, что гипоксия связана с повышенным риском тромбоза за счет того, что гены-мишени гипоксии и HIF модулируют коагуляцию, фибринолиз и тромбообразование в ответ на гипоксию (рис. 10) (Gupta et al., 2019).

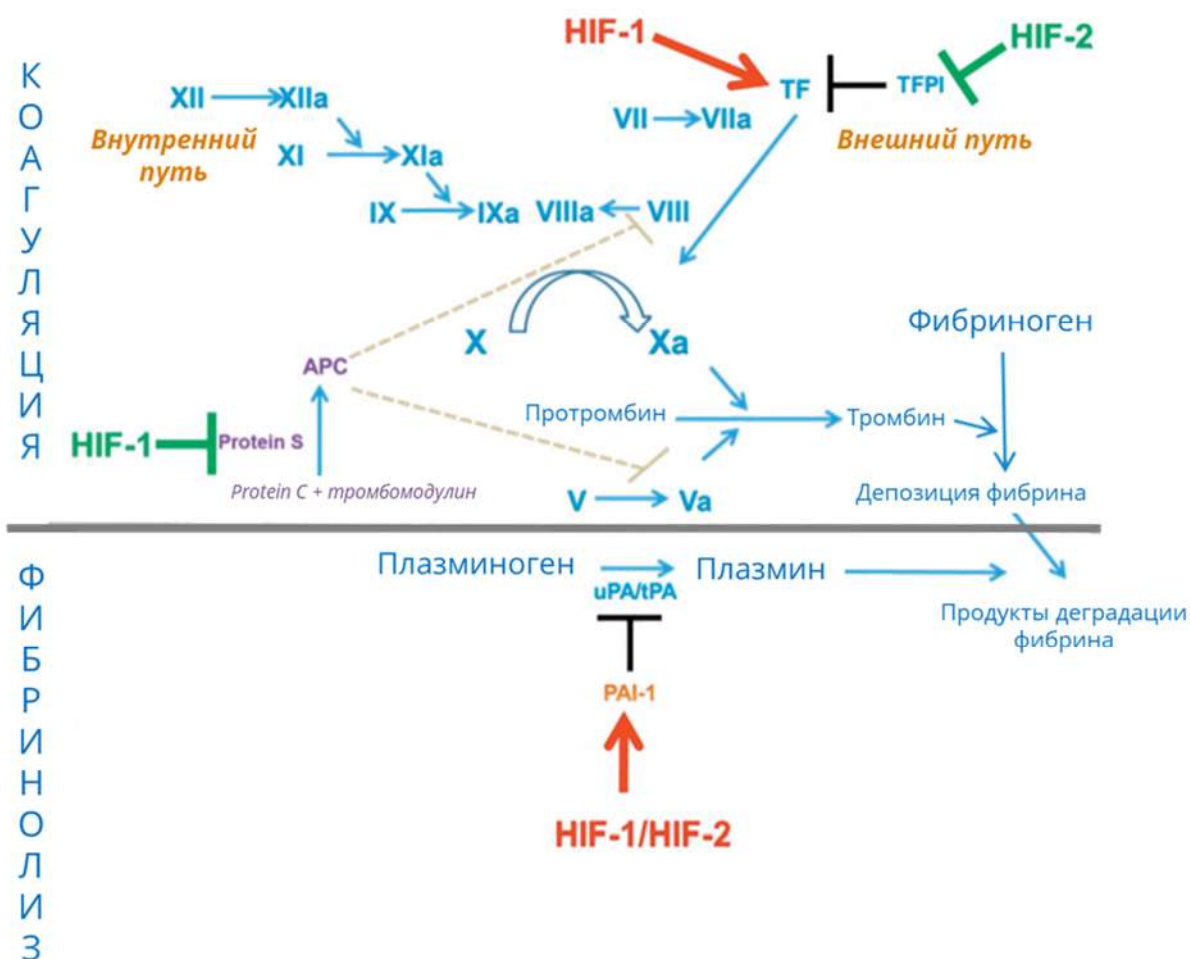


Рисунок 10. Влияние гипоксии на процессы коагуляции и фибринолиза (по в модификации)

Помимо гипоксии, множество других различных факторов способствует риску венозных тромбозов. Согласно исследованиям, примечательно что женщины и мужчины всех возрастов, независимо от пола и национальности подвержены риску развития осложнений, ассоциированных с венозными тромбозами. Возраст и ожирение являются важными факторами риска и после 40 лет риск удваивается с каждым десятилетием жизни. Предшествующие эпизоды венозных тромбозов и атеротромбоза также способствуют увеличению риска. Инфаркт миокарда связан с повышенным риском транзиторных тромбозов глубоких вен и тромбоэмболии легочной артерии независимо от традиционных факторов риска атеросклероза. Продукты деградации фибрина, оцененные по изменению уровней D-димера в плазме,

связаны с острым венозным тромбозом. Концентрация D-димера остается повышенной у пациентов с венозными тромбозами даже после лечения. Высокий базальный уровень D-димера в плазме является долгосрочным маркером риска венозных тромбозов (Rindle, 2016).

Повышение уровня эстрогена из-за беременности, ожирения или перорального приема противозачаточных средств также является фактором риска венозных тромбозов. Повышенный уровень эстрогена приводит к повышению факторов свертывания крови, которые имеют решающее значение для предотвращения кровопотери во время родов, но одновременно повышают риск тромбоза глубоких вен (Maskman, 2018). Помимо экологических и приобретенных факторов риска, существуют определенные генетические мутации, которые также увеличивают риск венозных тромбозов. Наиболее известная из подобных - лейденская мутация фактора V, которая приводит к гиперкоагуляции. В частности, в этом конкретном случае происходит невозможность активации протеина C, следовательно, становится невозможным разрушение и инактивация фактора V. Другими генетическими факторами риска, повышающими риск венозных тромбозов, являются мутации протромбина (G20210A) и фибриногена (C10034T) и мутации белков, опосредующих антикоагуляцию. Последние представляют собой мутации в антитромбине, протеине C и протеине S. Кроме того, группы крови, отличные от O, также связаны с повышенным риском венозных тромбозов (Tirado et al., 2005).

1.1.4. Тромботические осложнения при COVID-19

В условиях пандемии новой коронавирусной инфекции (пандемии, вызванной коронавирусом SARS-CoV2) появился новый риск для развития тромботических осложнений. Несмотря на то, что COVID-19 является респираторным заболеванием, он увеличивает риск венозных и артериальных тромбозов. Важно отметить, что коагулопатия, вызванная COVID-19, поражает различные органы, включая сосудистую сеть легких, ног, селезенки, сердца и головного мозга. Эти осложнения обычно связаны с полиорганной

недостаточностью и высокой летальностью в тяжелых случаях заболеваний. Текущие клинические данные показывают, что и легочная эмболия (ТЭЛА), и тромбоз глубоких вен (ТГВ) являются наиболее часто отмечаемыми тромботическими событиями при COVID-19 (Ali, 2021).

Сообщалось также о других тромботических осложнениях, включая инсульт, острую ишемию конечностей и острые коронарные синдромы. Мультисистемный воспалительный синдром у детей (MIS-C) в результате инфекции SARS-CoV2 также может увеличивать риск коагулопатии (Oxley et al., 2020).

Клинически признаки воспаления и коагулопатии обычно наблюдаются у пациентов, инфицированных SARS-CoV2. Провоспалительные цитокины, включая IL-6 и IL-8, повышены у пациентов с COVID-19, а также наблюдается быстрое повышение уровня D-димера и повышенное количество продуктов деградации фибриногена (Lodigiani, 2020).

Связь между COVID-19 и процессами тромбообразования может быть опосредована несколькими молекулярными путями, которые не регулируются во время клинического прогрессирования заболевания и, таким образом, вносят свой вклад в связанный с ним тромбоз. Усиление ренин-ангиотензиновой системы, как следствие подавления ангиотензин-конвертирующего фермента 2 (ACE2), является важным фактором. Кроме того, нарушение регуляции иммунного / воспалительного ответа является хорошо изученным фактором риска свертывания крови. Нельзя исключить эффект «двойного удара», при котором оба фактора могут аддитивно или синергетически увеличивать риск тромбоза у пациентов с COVID-19 SARS-CoV2 использует ACE2 для интернализации человеческих клеток и, таким образом, может привести к снижению активности ACE2. Следовательно, это приводит к увеличению ангиотензина II и снижению ангиотензина 1-7. Стоит отметить, что в то время как ангиотензин II обладает провоспалительным и протромботическим действием, ангиотензин 1-7

является важным противовоспалительным и антитромботическим пептидом. Ангиотензин 1-7 связывает Mas-рецепторы эндотелия и увеличивает выработку оксида азота и простаглицлина, таким образом подавляя активацию тромбоцитов. Было показано, что ACE2 широко экспрессируется на эндотелиальных клетках и что возможно прямое инфицирование эндотелия SARS-CoV2. Следовательно ренин-ангиотензиновой системы, нарушение регуляции в сосудистой сети пациентов с COVID-19 может инициировать каскад событий, которые приводят к усилению коагулопатии (Verdecchia et al., 2020).

Повреждение эндотелия также по-видимому, вносит свой вклад в патофизиологию COVID-19. Это также может указывать на потенциальную роль фактора фон Виллебранда (vWF) в коагулопатии, связанной с COVID-19. Помимо того, что vWF находится в плазме, он откладывается в субэндотелиальных пространствах, где он связан с коллагеном типа VI (Baker). При повреждении эндотелия субэндотелиальный vWF высвобождается, далее мультимеризуется дисульфидными связями и активируется путем воздействия как на тромбоцит-связывающий, так и коллаген-связывающий домены. Следовательно, активные мультимеры vWF действуют как молекулярные клеи, которые склеивают тромбоциты и субэндотелиальные коллагены, активируя агрегацию тромбоцитов и тромбоз (Koka et al., 2008).

Еще одним возможным патологическим источником тромбозов при COVID-19 могут служить активированные митогеном протеинкиназы (MAPKs; ERK, p38 и JNK) считаются центральными киназами, которые рано активируются при врожденном иммунном ответе. Активация MAPKs, вероятно, опосредованная передачей сигналов Toll-подобных рецепторов, индуцирует экспрессию множества генов, которые в совокупности регулируют врожденный и воспалительный ответ (Bohgaki et al., 2004). MAPKs значительно активируются при различных сердечно-сосудистых патологиях, включая тромбоз. Например, активация передачи сигналов p38 индуцирует

экспрессию тканевого фактора, основного инициатора свертывания крови, и опосредует тромботические события при антифосфолипидном синдроме. Следовательно, хроническая активация путей МАРК также может способствовать повышению риска тромбоза.

Одним из наиболее тяжелых клинических проявлений при COVID-19 помимо вышеописанных случаев тромботических осложнений является развитие острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), при котором требуется искусственная вентиляция легких у тяжелобольных пациентов. Патофизиология ОРДС возникает в результате острого воспаления в альвеолярном пространстве и невозможности нормального газообмена. Увеличение провоспалительных цитокинов в легких приводит к привлечению лейкоцитов, что способствует дальнейшему распространению местного воспалительного ответа. Постоянным выводом при ОРДС является отложение фибрина в воздушных пространствах и паренхиме легких. У пациентов с COVID-19 наблюдается повышенный уровень D-димеров и фибриногена. Отложения фибрина обнаруживаются в легких пациентов из-за нарушения регуляции свертывающей и фибринолитической систем. Тканевый фактор находится на поврежденных альвеолярных эндотелиальных клетках и на поверхности лейкоцитов способствуют отложению фибрина, в то время как значительно повышенные уровни ингибитора активатора плазминогена 1 (РАI-1) из эпителия легких и эндотелиальных клеток создают гипофибринолитическое состояние. Накопление факторов свертывания в легких также может приводить к ОРДС за счет активации рецепторов, активируемых протеазой (PAR), которые экспрессируются на клетках легких, включая клетки альвеолярного эпителия, фибробласты, моноциты и макрофаги. Передача сигналов PAR, индуцированная тканевым фактором, фактором свертывания крови Ха, фактором VIIa или тромбином, может усиливать фиброз в дополнение к стимулированию образования фибрина. Фиброз характеризуется миграцией, пролиферацией фибробластов, и отложение коллагена во внутриальвеолярных пространствах. PAR-1 по-

видимому воздействует на фибробласты как через тромбин, так и фактор Ха, способствуя их пролиферации, индуцируя выработку проколлагена и усиливает экспрессию различных факторов роста, включая соединительную ткань и фактор роста (CTGF). Передача сигналов PAR может усилить воспаление при остром повреждении легких за счет увеличения экспрессии провоспалительных цитокинов, включая фактор роста тромбоцитов (рис. 11)

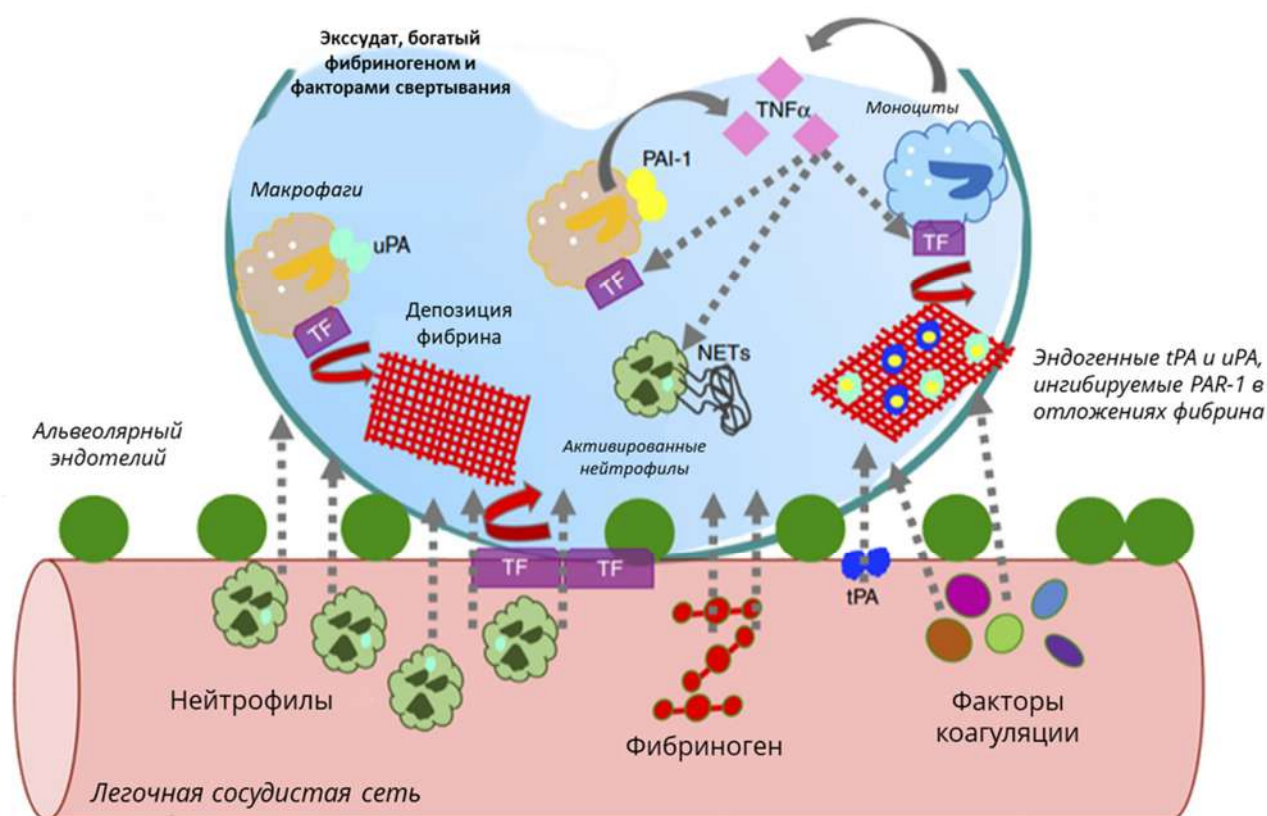


Рисунок 11. Формирование отложений фибрина в альвеолярном пространстве при остром респираторном дистресс-синдроме (по Whyte et al., 2020 в модификации)

В легких пациентов с ОРДС существует состояние гиперкоагуляции, ведущее к отложению фибрина во внутриальвеолярном пространстве. Воспаление модулирует коагуляцию, активируя С-реактивный белок (CRP), тем самым увеличивая воздействие тканевого фактора на моноциты и альвеолярные макрофаги, которые, в свою очередь, способствуют развитию тромбина. образование и отложение фибрина (Seeger et al., 1985). Печеночный

синтез фибриногена, белка острой фазы увеличивается в 2-10 раз в плазме во время инфекции, а также происходит местный синтез в эпителии легких во время пневмонии, что еще больше усугубляет отложение фибрина. Отложение фибрина усиливает воспаление и фиброз, а также повреждает легочный сурфактант (Sebag et al., 2011). Это сочетается с гипофибринолитическим состоянием в альвеолярном пространстве, где, как было показано, повышено содержание фибринолитических ингибиторов. Было обнаружено, что уровни активируемого тромбином ингибитора фибринолиза (ТАFI) и ингибитора протеина С были значительно повышены в бронхоальвеолярной жидкости пациентов с интерстициальным заболеванием легких по сравнению со здоровыми людьми из контрольной группы. Кроме того, сообщалось, что уровни α 2-макроглобулина повышаются при обструктивном заболевании легких, что может коррелировать с увеличением плазминогена, наблюдаемым у пациентов с ОРДС. Однако основным ингибитором фибринолиза в патогенезе ОРДС описан ингибитор активатора плазминогена 1 (PAI-1), уровень которого, повышен при коронавирусе тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV) и ALI (Gralinski et al., 2013).

1.2. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ТРОМБОТЕРАПИИ

1.2.1. Антитромбические средства

Нарушения в любом из звеньев системы гемостаза могут привести к спонтанным кровотечениям в случае снижения свертываемости крови или к образованию тромба и закупорке сосуда, если свертываемость патологически повышается, и в таких случаях будет требоваться медикаментозное вмешательство, поскольку возникают серьезные риски для здоровья пациента. В случае терапии тромботических состояний и осложнений наиболее распространенным медикаментозным подходом является применение антитромбических средств.

Антитромбические препараты подразделяются на три основные группы в зависимости от того, на какой компонент системы гемостаза они действуют:

антикоагулянты (вещества, непосредственно влияющие на свертываемость, препятствуют образованию нитей фибрина и последующему тромбообразованию, способствуют прекращению роста уже возникших тромбов, подразделяются на прямые и непрямые, действуют быстро и кратковременно), антиагреганты (вещества, блокирующие агрегацию тромбоцитов и эритроцитов и их прилипание к эндотелию кровеносных сосудов, могут не только предупреждать «склеивание», но и вызывать дезагрегацию тромбов) и фибринолитики (вещества, разрушающие тромбы, лизирующие фибрин, либо способствующие образованию пламина из его неактивного предшественника – пламиногена, в зависимости от специфичности действия по отношению к пламину условно подразделяются на несколько поколений) (рис. 12).

Антитромбические препараты



Рисунок 12. Основные группы антитромбических препаратов и их представители

1.2.2. Антикоагулянты и антиагреганты

Выделяют несколько основных представителей разных антитромботических групп, наиболее часто применяемые в тромботерапевтической практике.

Гепарин и его производные:

Гепарин – это глюкозаминогликан, ингибирующий свертывание крови. Это старейшее лекарственное средство, используемое в качестве антикоагулянта, однако его применение может быть сопряжено с определенными недостатками, основными из которых являются индуцированная тромбоцитопения (ГИТ) и кровотечения. Несмотря на эти ограничения, гепарин по-прежнему остается одним из широко распространенных в использовании сердечно-сосудистых препаратов (Cohen, 2001). Кроме того, низкомолекулярные гепарины (НМГ), полученные путем деполимеризации гепарина, также находят свое применение в качестве антикоагулянтов. Они демонстрируют лучший терапевтический индекс при более низкой частоте индуцированной гепарином тромбоцитопении по сравнению с гепарином. Каждый НМГ отличается своей молекулярной массой и терапевтическими свойствами. НМГ вводят инъекционно, а основным путем их выведения из организма – почечный. Следовательно, период полураспада молекулы выше у пациентов с почечной недостаточностью, что приводит к ее накоплению. Среди НМГ наиболее популярны эноксапарин, далтепарин, надропарин, тинзапарин, цертопарин, ревипарин, ардепарин, парнапарин и бемипарин (Hirsh et al., 2001).

Кумарин и его производные:

Антикоагулянты – производные кумарина, были обнаружены в 1939 году путем идентификации антагониста витамина К – дикумарола, выделенного из сена донника (*Melilotus officinalis*). Дальнейшие исследования производных кумарина привели к открытию варфарина, который изначально использовался

как родентицид, а позже одобрен для клинического применения в качестве антикоагулянта и первого перорального ингибитора тромбина. Впоследствии варфарин показал свою эффективность в предотвращении эмболических инсультов. Клиническими ограничениями подобных антагонистов витамина К были кровотечения, побочные эффекты со стороны желудочно-кишечного тракта, локальные некрозы. Тем не менее, варфарин по-прежнему остается самым распространенным антагонистом витамина К среди используемых на практике (Ansell et al., 2008).

Ингибиторы тромбина:

Применение ингибиторов тромбина в клинической практике тромботерапии в качестве антикоагулянтов за последние несколько десятилетий доказало свою эффективность. Гирудин - один из наиболее важных естественных ингибиторов тромбина. Терапия гирудином, как правило, бывает связана с повышенным риском кровотечения, а также с образованием ненейтрализующих антител у пациентов (Hoppensteadt et al., 2008). Впоследствии были разработаны препараты - ингибиторы тромбина с большей эффективностью и терапевтическим эффектом. К ним относятся аргатробан, бивалирудин, лепирудин и дабигатран этексилат. Первым успешно использованным в широкой клинической практике ингибитором тромбина является аргатробан. Он был рекомендован в качестве альтернативного антикоагулянта для пациентов, страдающих тромбоцитопенией, и его клиническое применение значительно уменьшало риск кровотечения по сравнению с гепарином. Бивалирудин является двухвалентным обратимым ингибитором, и по сравнению с гепарином - почти на 50%, в то время как эффективность оставалась одинаково высокой. Другим подобным препаратом, рекомендованным для применения у пациентов с тромбоцитопенией являлся лепирудин (Lee & Ansell, 2011).

Ингибиторы фактора Ха:

Фактор Ха относится к классу сериновых протеаз и является частью протромбиназного комплекса. Ингибиторы фактора Ха – важный класс антикоагулянтных препаратов, снижающих образование тромбина. Эти небольшие молекулы связываются с активным центром фактора X (Ха), который, в свою очередь, ингибирует образование тромбина. Они демонстрируют различное структурное и функциональное разнообразие и могут представлять собой природные или синтетические молекулы. Их способ действия может быть прямым путем связывания с фактором Ха или опосредованным связыванием с антитромбином III (АТ), что приводит к инактивации фактора Ха. Фондапаринукс – молекула, представляющая собой пентасахарид гепарина. В США данное соединение было одобрено для применения после операции, а также на начальных этапах экстренного лечения таких тромботических заболеваний, как тромбоэмболия легочной артерии и тромбоз глубоких вен. Другим ингибитором FХа непрямого действия является идрапаринукс, который представляет собой гиперметилированный вариант фондапаринукса и проявляет большее сродство к антитромбину III (АТ). По уровню безопасности с точки зрения воздействия на организм пациента и развития нежелательных побочных эффектов, ингибиторы фактора Ха считаются более безопасными, чем ингибиторы тромбина (Bauer, 2006).

Антиагрегационные препараты:

Активация тромбоцитов инициируется фактором фон Виллебранда (vWF), взаимодействующим с коллагеном и рецепторами поверхностных гликопротеинов тромбоцитов, что приводит к его прикреплению к субэндотелию сосудов. Активированные тромбоциты дополнительно высвобождают тромбоксан А₂ (ТхА₂), тромбин и аденозиндифосфат (ADP). Эта серия событий в конечном итоге приводит к экспрессии поверхностных гликопротеинов тромбоцитов (GPIIb-IIIa), что способствует агрегации

тромбоцитов и образованию тромбов. Антиагрегантные препараты используются для профилактики и лечения тромботических расстройств. Первым использованным антиагрегантным препаратом был аспирин, для которого было обнаружено, что реакция соединительной ткани тромбоцитов может быть значительно нарушена поглощением аспирина. Это подавляет образование тромбоцитарной пробки и тем самым увеличивает время свертывания. Дальнейшие исследования показали, что антиагрегантный эффект аспирина во многом обусловлен его необратимой инактивацией фермента циклооксигеназы, в первую очередь циклооксигеназы 1 (COX1). Ингибирование фермента простагландинсинтазы/циклооксигеназы препятствует выработке простагландина тромбоцитами. Простагландин (PН2) является субстратом для синтеза ТхА2 тромбоксан-А-синтазой и, таким образом, ингибирование COX1 аспирином является причиной его использования в качестве антиагрегантного препарата. Помимо аспирина, тиклопидин был самым ранним антагонистом рецептора АДФ, использование которого было прекращено позднее из-за его побочных эффектов, таких как тромбоцитопения. Последовательно разрабатывается ряд ингибиторов рецептора АДФ, таких как клопидогрель, прасугрел и тикагрелор. Клопидогрель - ингибитор рецептора P2Y12, который необратимо блокирует связывание АДФ. Прасугрел - еще один необратимый ингибитор рецептора P2Y12. С другой стороны, тикагрелор в основном блокирует рецептор P2Y1, а также частично ингибирует рецептор P2Y12 (Orrea & Popescu, 2013).

1.2.3. Тромболитические препараты

Несмотря на все достижения в области разработки и применения антитромботических препаратов, антикоагулянты и антитромбоцитарные препараты обладают значительными побочными эффектами для организма человека, чаще всего сопряженными с выраженными кровотечениями. Однако основным недостатком этого подхода к терапии является то, что эти группы препаратов не могут воздействовать на существующий тромб в кровотоке. В

современной медицине ферментативная тромболитическая (фибринолитическая) терапия приобретает все большее значение для купирования сложных тромботических осложнений.

Основным преимуществом использования фибринолитических агентов перед антикоагулянтами и антиагрегантами является то, что они могут воздействовать на существующие тромбы или волокна фибриновой сети. Основной эффект этих ферментативных препаратов прямо или косвенно направлен именно на фибрин. Их часто называют ферментами, разрушающими сгустки, и их разделяют на два типа в зависимости от механизма действия. Первый тип – активаторы плазминогена; превращающие плазминоген в активный плазмин, который расщепляет образовавшийся фибриновый тромб. К данной группе, например, относятся активатор плазминогена тканевого типа (t-PA) и урокиназа. Многие активаторы плазминогена, такие как альтеплаза, ретеплаза, тенектеплаза, урокиназа, стрептокиназа и анистреплаза, доступны для клинического использования и широко используются для лечения сердечно-сосудистых заболеваний в течение последних десятилетий (Kotb, 2014). Вторым типом тромболитических агентов – это плазминоподобные (фибринолитические) ферменты прямого действия, т.е. не требующие активации плазминогена. Вместо этого они растворяют сгусток, воздействуя непосредственно на него, например, к подобным агентам относятся плазмин, наттокиназа и люмброкиназа (Altaf et al., 2021).

Активаторы плазминогена, которые также классифицируют как непрямые тромболитики, относят к классу сериновых протеаз, которые стимулируют процесс образования плазмина из плазминогена. Данные ферменты подразделяют на три группы, а именно на активаторы плазминогена первого, второго и третьего поколения. Активаторы плазминогена первого поколения – изначально первые препараты, открытые в данной области, стрептокиназа и урокиназа, – обладают малоспецифичным к фибрину действием и зачастую вызывают кровотечения. Активаторы плазминогена второго поколения были

разработаны для повышения специфичности взаимодействия с молекулами фибрина и, соответственно, уменьшения кровотечений. Хотя разработка данной группы препаратов и привела к снижению числа возникающих осложнений, связанных с активаторами плазминогена первого поколения, риск побочных эффектов, таких как кровотечения при их использовании сохранялся. Активаторы плазминогена третьего поколения – это в основном варианты тканевого активатора плазминогена (t-PA), созданные с помощью генной инженерии (за исключением стафилокиназы и десмотеплазы), обладающие такими свойствами, как селективность к фибрину, улучшенный период полувыведения и увеличенное время почечного клиренса (Flemmig, Melzig, 2012).

1.2.3.1. Первое поколение тромболитических препаратов

Тромболитики первого поколения не являются специфичными к фибрину и их применение зачастую приводит к системным кровотечениям, тем не менее, их использование в качестве терапевтического подхода к сердечно-сосудистым заболеваниям является важным этапом развития тромботерапии.

Стрептокиназа

Стрептокиназа является металлосодержащим ферментом, продуцируемым β -гемолитическим стрептококком, используемым в качестве широкодоступного вещества для тромболитической терапии. При соединении с плазминогеном фермент образует комплекс, активирующий его переход в крови или в кровяном сгустке в плазмин – протеолитический фермент, растворяющий волокна фибрина в кровяных сгустках и тромбах, вызывающий деградацию фибриногена и других плазменных белков, в том числе факторов свертывания V и VII. Стрептокиназа – стрептококковый белок с антигенными свойствами, поэтому возможна её нейтрализация в организме соответствующими антителами. В такой ситуации ускорение фибринолиза достигается введением избыточных (необходимых для нейтрализации антител) количеств фермента. Применение стрептокиназы может быть

сопряжено с большим количеством аллергических реакций в связи с чужеродностью фермента для организма человека, а также в виду неспецифичности активации плазминогена – стрептокиназа активирует плазминоген, не связанный с тромбом, при этом у пациента может возникать истощение противосвертывающей системы и большое количество геморрагических осложнений (Koren et al., 1985).

Урокиназа

Урокиназа – сериновая протеаза человека, впервые выделенная из мочи человека, однако впоследствии она была обнаружена в различных тканях и органах, в том числе крови и внеклеточном матриксе. Урокиназа высвобождается в виде неактивной одноцепочечной молекулы-предшественника с массой 55 кДа, а протеолитические ферменты, такие как плазмин, расщепляют предшественник с образованием активной формы урокиназы. Протеолитическое расщепление, осуществляющееся по остаткам Lys157 дает активную форму урокиназы, которая представляет собой гетеродимер А-цепи с дисульфидной связью с молекулярной массой 20 кДа и цепи В с молекулярной массой 34 кДа. Цепь А состоит из домена, подобного эпидермальному фактору роста, и домена крингла, тогда как цепь В является каталитической единицей (Kasai et al., 1985).

1.2.3.2. Второе поколение тромболитических препаратов

Тромболитики второго поколения были разработаны для преодоления недостатков активаторов плазминогена первого поколения, увеличения специфичности действия в отношении фибрина и снижения вероятности кровотечений при применении (Flemmig, Melzig, 2012).

Тканевый активатор плазминогена и альтеплаза

Тканевый активатор плазминогена (t-РА) представляет собой сериновую протеазу из 527 аминокислот с молекулярной массой 70 кДа. Он секретируется в виде одиночного полипептида, который расщепляется плазмином на

двухпочечную форму, связанную дисульфидными связями. С-концевая легкая цепь несет домен каталитической сериновой протеазы, тогда как N-концевая тяжелая цепь включает домен эпидермального фактора роста, домен цинкового пальца и два домена крингла. Плазминоген взаимодействует только с доменом крингла 2, в то время как фибрин связывается с доменом крингла 2 и пальцевым доменом фибронектина типа III t-PA, что свидетельствует о стимулирующем эффекте фибрина на t-PA. Из кинетических исследований t-PA также было обнаружено, что активация плазминогена ферментом заметно усиливается в присутствии фибрина. Таким образом, подтверждается его специфичность по отношению к фибрину.

Альтеплаза – это первый рекомбинантный терапевтический фермент, который стал использоваться в клинической практике, представляющий собой рекомбинантный t-PA. Она используется для лечения тяжелых тромботических состояний, в частности, острого ишемического инсульта, тромбоэмболии легочной артерии и острого инфаркта миокарда. Препарат имеет короткий период полураспада (4-8 минут) и разрешена к применению в течение 3 часов после патологического воздействия на сердечно-сосудистую систему. Альтеплаза является основным одобренным тромболитическим препаратом при остром ишемическом инсульте, хотя ее применение может (хоть и в меньшей степени по сравнению с тромболитиками 1 и 2 поколения) быть связано с некоторым риском кровоизлияния в мозг и отека (Kaur et al. 2004).

Анистреплаза (APSAC)

Анистреплаза (анизоилированный комплекс активатора стрептокиназы плазминогена или APSAC) представляет собой эквимольную смесь стрептокиназы и плазминогена. Активный центр плазминогена защищен от ингибиторов плазмина обратимым ацилированием гидрохлоридом п-амидинофенил-п-анизата (APAN). После инъекции деацилирование начинается с гидролиза п-анизатной группы, оставляя активный комплекс

плазминоген-стрептокиназа. APSAC более стабилен, обладает улучшенным периодом полужизни и связывающей способностью с фибрином. APSAC является легко доступным активатором плазминогена и проявляет большую специфичность в отношении плазминогена, связанного со сгустком (Ali et al., 2014).

1.2.3.3. Третье поколение тромболитических препаратов

Для современной тромболитической терапии в настоящее время разработаны активаторы плазминогена третьего поколения с улучшенными свойствами. Большинство из этих классов лекарств представляют собой варианты t-РА с улучшенными фармакокинетическими и фармакодинамическими свойствами – увеличенной устойчивостью к ингибиторам, более высокой безопасностью при введении, более длительным периодом полувыведения и т.д. Их повышенная скорость клиренса делает их пригодными для болюсного введения. Некоторые варианты, не содержащие t-РА, такие как стафилокиназа и десмотеплаза, также относятся к этой категории (табл. 3).

Таблица 3. Характеристика некоторых тромболитиков третьего поколения

Тромболитический препарат третьего поколения:	Варианты названия/ аббревиатура	Особенности структуры/использования:
Ретеплаза	Рекомбинантный активатор плазминогена, r-PA	Ретеплаза представляет собой негликозилированный вариант t-PA с укороченной одноцепочечной делецией, рекомбинатно продуцируемый в <i>E.coli</i> и имеющий молекулярную массу 39 кДа. Он состоит из 355 из 527 аминокислот нативного t-PA; ровно 1–3 и 176–527 аминокислоты t-PA. Таким образом, ретеплаза включает только домены каталитической протеазы вместе с доменом крингла 2, в то время как в ней отсутствуют домен эпидермального фактора роста, домен пальца и домены крингла 1 t-PA. Молекулы достигли увеличенного периода полужизни с 4 до 15 минут, так как в них отсутствует крингл 1 домен, который отвечает за быстрый почечный клиренс. Отсутствие фибринсвязывающего пальцевого домена снижает сродство связывания молекулы, хотя крингл-2 домен взаимодействует с фибрином (Kohnert et al., 1992). Уровень смертности и геморрагического инсульта в течение 30 дней одинаков для ретеплазы и альтеплазы.
Тенектеплаза	Рекомбинантный активатор плазминогена, TNK-tPA	Тенектеплаза представляет собой рекомбинантный мутантный вариант t-PA. Это гликопротеин 65 кДа с 527 аминокислотами. Мутации включают Asp103Thr, Glu117Asn и 4 замены аланина (Lys296Ala, His297Ala, Arg298Ala и Arg299Ala). Эти точечные мутации увеличивают специфичность фибрина в 14 раз и устойчивость к ингибитору активатора плазминогена 1 (PAI-1) в 80 раз (Smalling, 1996). Мутации в крингле 1 домен продлевает время почечного клиренса и, таким образом, увеличивает период полураспада примерно до 10-24 мин (Cannon et al., 1997). Это делает его пригодным для болюсного введения. Клинические испытания, такие как испытание TIMI 10B (тромболизис при инфаркте миокарда), испытания ASSENT-1 и ASSENT-2 (оценка безопасности и эффективности нового тромболитического средства), показали аналогичную эффективность и безопасность при использовании для лечения острого инфаркта миокарда. Однако частота кровотечений была меньше по сравнению с альтепазой (Zeymer and Neuhaus, 1999). Торговое название тенектеплазы - TNKase™ (Genentech, Inc.), она была одобрена USFDA в 2000 году для лечения инфаркта миокарда.
Ланотеплаза	Рекомбинантный активатор плазминогена, n-PA	Ланотеплаза представляет собой новый укороченный мутантный вариант t-PA, созданный путем удаления домена пальца и домена эпидермального фактора роста. Кроме того, она имеет точечную мутацию в домене крингл 1 - Asn117Gln. Это, в свою очередь, приводит к удалению сайта гликозилирования. Данные модификации увеличивают время почечного клиренса, и период полувыведения молекулы из плазмы составляет 37–45 мин. Он также подходит для болюсного введения. Фермент представляет собой отдельный полипептид с молекулярной массой 53,6 кДа. Нарботка фермента осуществляется в линиях

		клеток яичника китайского хомячка (СНО). По сравнению с альтеплазой более высокая проходимость сосудов при тромбозе была показана для ланетоплазы в течение 90 минут, однако легкие кровотечения при геморрагическом инсульте наблюдались чаще, чем при терапии альтеплазой (Verstraete, 2000).
Памитеплаза	Рекомбинантный активатор плазминогена, солиназа	Памитеплаза - еще один укороченный мутант t-PA, лишенный крингл-1 домена (остатки 92–173) вместе с точечной мутацией Arg274Glu. Этот вариант устойчив к расщеплению плазмином и имеет период полураспада около 30–47 мин. По сравнению с t-PA, более высокий фибринолиз был продемонстрирован памитеплазой в исследовании <i>in vivo</i> с использованием модели коронарного тромбоза собак. В другом исследовании сообщалось о сопоставимых результатах для t-PA и памитеплазы, где скорость потока ТИМІ-3 составляла 25% через 30 минут и 50% через 60 минут для памитеплазы, в то время как для t-PA она составляла соответственно 16% и 48%. Рекомбинантная продукция памитеплазы достигается в линиях клеток СНО (Yokota and Tanji, 2008).
Дутеплаза	Рекомбинантный активатор плазминогена, met-t-PA	Дутеплаза в другом варианте t-PA с одноточечной мутацией Val245Met. Продукция фермента осуществляется в линиях клетках линии СНО. Дутеплаза представляет собой негликозилированную двухцепочечную форму в отличие от одноцепочечной формы альтеплазы. Согласно исследованию ESPRIT, частота проходимости коронарной артерии, связанной с инфарктом, была достигнута у 70% пациентов через 90 минут при инфузии дутеплазы с поправкой на вес вместе с пероральным аспирином и внутривенным гепарином. Безопасность молекулы аналогична безопасности альтеплазы (Kalbfleisch et al. 1992; Malcolm et al., 1996).
Монтеплаза	Рекомбинантный активатор плазминогена, E6010	Мутантный вариант t-PA, в котором была достигнута точечная мутация в домене эпидермального фактора роста (Cys84Ser). Однако увеличенный период полураспада, составляющий около 23 минут, делает мутант пригодным для болюсного введения. Скорость потока ТИМІ-3 составляла 69% через 60 минут после лечения острого инфаркта миокарда монтеплазой. В рандомизированном двойном слепом исследовании, проведенном в Японии, сообщалось о более высокой скорости ранней реканализации для молекулы по сравнению с тисокиназой, нативным вариантом t-PA. Кроме того, во время испытания не наблюдалось смертельного кровотечения (Kawai et al. 1997).

Десмотеплаза	Bat-PA, DSPA α 1, v-PA	Десмотеплаза - активатор плазминогена третьего поколения, не вариант t-PA. Активаторы плазминогена слюны <i>Desmodus</i> (DSPAS) представляют собой группу из четырех ферментов, выделенных из обыкновенной летучей мыши-вампира, <i>Desmodus rotundus</i> и десмотеплаза - один из них, названный DSPA α 1 или Bat-PA. Это одноцепочечный белок 50 кДа, который может быть продуцирован как в линиях клеток CHO, так и в клетках насекомых рекомбинантными методами. Обладает увеличенным конечным периодом полураспада. по сравнению с другими тромболитическими ферментами, такими как t-PA. DSPA α 1 содержит единственный крингл-домен, очень похожий на крингл-1 домен t-PA, но он лишен какого-либо сайта связывания лизина. Помимо крингл-домена, он также содержит сигнальный пептид, домен эпидермального фактора роста (EGF), серин домен протеазы и домен finger. Также в домене протеазы отсутствует сайт расщепления плазмином (Hacke et al., 2008).
Амедиплаза	MEN 9036	Амедиплаза представляет собой химерный фермент из 365 аминокислот с крингл-2-доменом t-PA (1-3 и 176-275 остатков) и протеазным доменом одноцепочечной урокиназы scu-PA (159-411). Молекулярная масса белка составляет 39,9 кДа, и рекомбинантная продукция достигается в линиях клеток CHO. Амедиплаза показала в десять раз меньшую аффинность связывания с фибрином по сравнению с альтеплазой при внутреннем и внешнем лизисе сгустка. Однако способность молекулы проникать в сгусток превосходила t-PA (Rijken et al., 2004). Также амедиплаза показала немного лучшую активность, чем тенекеплаза и scu-PA, в другом методе внешнего лизиса сгустков (Guimaraes et al., 2006).
Стафилокиназа	SAK	Стафилокиназа - еще один вариант, не относящийся к t-PA, принадлежащий к активаторам плазминогена третьего поколения. Это внеклеточный белок, продуцируемый золотистым стафилококком, который образует стехиометрический 1: 1. комплекс с плазмином или плазминогеном и активирует больше молекул плазминогена. SAK представляет собой мономер из 136 аминокислот без какой-либо дисульфидной связи с молекулярной массой около 15,5 кДа. Комплексы SAK связываются с молекулами плазминогена, которые связаны с частично разрушенным фибрином. α 2-антиплазмин ингибирует комплекс плазминоген-SAK в отсутствие фибрина, однако в присутствии фибрина лизинсвязывающий домен комплекса занят, предотвращая ингибирование α 2-антиплазмином, и наблюдается четырехкратное увеличение активности в присутствии фибрина, таким образом, фермент более специфичен к фибрину, чем его ближайшие аналоги. Нарботка рекомбинантной SAK достигается в <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> и дрожжах. <i>Hansenula polymorpha</i> (Mousa et al., 2012).

1.2.4. Новые подходы в терапии тромбозов и терапии тромботических осложнений активаторами плазминогена

С появлением нанотехнологий появился также и значительный интерес к интеграции наномедицины и тромболитической терапии для лечения острых тромботических событий. Наномедицинские подходы к целенаправленному фибринолизу могут улучшить клинические результаты за счет модификации текущих фармацевтических методов, когда стратегии на основе интервенционных катетеров недоступны или не рекомендуются (как, например, при ишемическом инсульте из-за окклюзии в более мелких сосудах) (рис. 13).

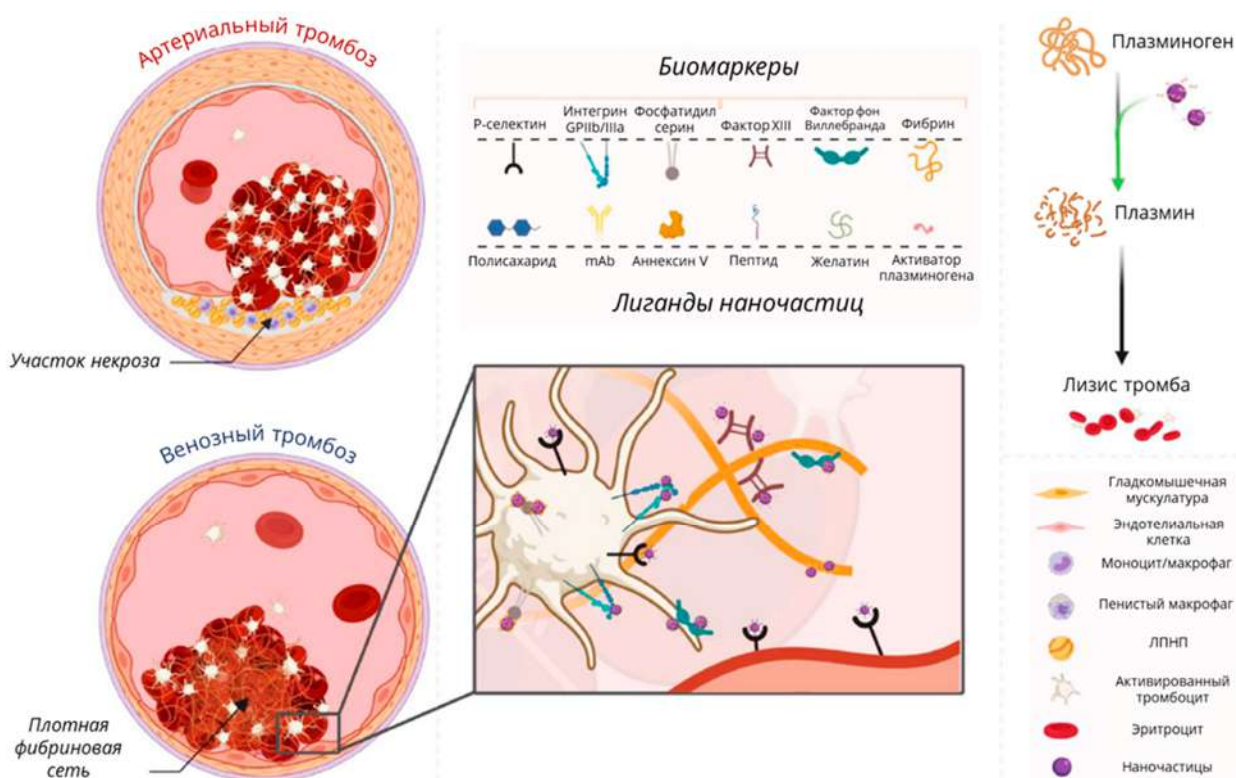


Рисунок 13. Применение наночастиц в терапии тромбозов активаторами плазминогена (по Zenych et al., 2020 в модификации)

Современная тромболитическая терапия, нацеленная в основном на инъекции активаторов плазминогена, все же ограничена узким терапевтическим окном, скоростью выведения препаратов и рисками геморрагических осложнений. Векторизация активаторов плазминогена с

помощью подходов наномедицины защищает лекарство от ферментативной деградации, улучшает терапевтические результаты и снижает побочные эффекты в доклинических моделях. Предполагается, что локальное действие в месте тромба наночастиц, «расщепляющих сгустки», обеспечит более высокую скорость реканализации и уменьшит опасные для жизни кровотечения, связанные с их внутривенным введением. Можно также ожидать возможность замены внутривенной инфузии болюсной инъекцией активаторами плазминогена первого и второго поколения из-за увеличенного периода полувыведения препарата. В идеальных условиях лечения синергетическая комбинация эндоваскулярных и нанотерапевтических методов представляла бы более точный подход к лечению тромботических патологий. В качестве потенциально применимых для тромботерапии частиц описываются липосомальные векторы, векторы на основе полимеров и магнитных частиц (Zenych et al., 2020).

Направленное введение лекарств с помощью наноносителей позволяет накапливать их в месте тромба и может усиливать тромболитический проникновение в глубоко локализованные тромбы. В настоящее время мишенями наночастиц являются в основном фибрин и тромбоциты, тем не менее, идентификация новых молекул-мишеней и разработка недорогих и специфических нацеливающих групп является перспективным направлением биомедицины. Фукоидан, который в настоящее время проходит клинические исследования в качестве диагностического средства для визуализации тромбоза (Chauvierre et al., 2019), может стать доступной и высококачественной альтернативой носителям-антителам и носителям-пептидам. Другая стратегия нацеливания на тромбы основана на использовании магнитных наночастиц под воздействием внешнего магнитного облучения. Тем не менее, несмотря на обилие доклинических работ, посвященных индукции магнитных частиц и активаторов плазминогена с помощью магнитного поля, не существует клинически одобренного медицинского устройства, которое могло бы воздействовать высокой силой

магнитного поля на наночастицы в глубоких кровеносных сосудах. Следовательно, вероятно, предпочтительнее создать наночастицы, способные воздействовать на тромбоз без внешних триггеров (Rouzet et al., 2011).

1.3. МИКРОМИЦЕТЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ ПРЕПАРАТОВ, ЭФФЕКТИВНЫХ В ОТНОШЕНИИ ТРОМБОТЕРАПИИ И ДИАГНОСТИКИ ПАТОЛОГИЙ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

1.3.1. Фибринолитические ферменты прямого действия, выделенные из разных групп живых организмов

Исследования активаторов плазминогена привели к разработке рекомбинантных и химерных белков. Однако, несмотря на то, что к настоящему времени достигнуто значительное улучшение специфичности лизиса фибрина препаратами, безопасности введения, увеличения срока действия и т.п., все же применение подобных тромболитиков сопряжено с риском кровотечений, аллергических реакций и индивидуальной непереносимости. В связи с этим, поиск новых и более эффективных тромболитических лекарств продолжается. Катетерное местное введение активаторов плазминогена ускоряет процесс тромболизиса, однако полностью избежать системного кровотечения невозможно. В последние десятилетия активно исследуются фибринолитические ферменты прямого действия из различных источников, которые могут обходить активацию плазминогена и при этом разрушать фибриновый сгусток. Они были выделены как из немикробных, так и из микробных источников (Cardoso et al., 2022).

Наиболее распространенным терапевтическим агентом данной категории является плазмин, – фермент, разрушающий фибрин, который можно вводить без каких-либо кровотечений и аллергических реакций. Систематически вводимый плазмин часто ингибируется α 2-антиплазмином, что приводит к нивелированию терапевтического эффекта. Однако при местном применении плазмин не блокируется ингибиторами, и приводит к фибринолизу. Впоследствии он ингибируется α 2-антиплазмином, когда он попадает в

кровоток после тромболизиса. Модели на животных *in vivo* и клинические испытания показали пользу и безопасность плазмина как сердечно-сосудистого препарата, который может осуществлять фибринолиз (Marder, 2011). На сегодняшний день созданы многочисленные рекомбинантные варианты плазмина для терапевтического применения. Одним из них является миниплазмин – усеченный мутант, полученный из плазминогена путем протеолиза с использованием эластазы поджелудочной железы свиньи. Он содержит домен крингл-5 и домен сериновой протеазы плазмина. Рекомбинантная наработка миниплазминогена достигается в *Escherichia coli* с использованием системы экспрессии T7 и активируется урокиназой с образованием миниплазмина. Однако кинетические данные для тромболизиса миниплазмином противоречивы, что ограничивает его применение в терапии (Fu et al., 2008). Микроплазмин – это еще один вариант плазмина, генерируемый автолизом плазмина при высоком щелочном pH (pH 11), и представляет собой белок массой 29 кДа. Это гетеродимер, состоящий из цепи «А» с 31 аминокислотой и цепи «В» с 230 аминокислотами. Микроплазминоген можно рекомбинантно продуцировать в *Pichia pastoris* и *E. coli*. Данный препарат находит применение в качестве терапевтического средства для лечения витреомакулярной адгезии (Chen et al., 2008). Третий и наиболее важный вариант терапевтического плазмина – это дельта-плазмин, который представляет собой усеченный мутант, образованный удалением 2–5 крингл доменов, оставляющих только крингл 1 домен, присоединенный к сериновому протеазному домену плазмина. Рекомбинантная наработка дельта-плазминогена осуществляется в системе экспрессии *E. coli* T7 и было обнаружено, что он функционально схож с плазминогеном человека. Он был преобразован в активный дельта-плазмин активаторами плазминогена, такими как t-РА, урокиназа и стрептокиназа. Несмотря на то, что он показал фибринолитическую эффективность, эквивалентную плазмину (Hunt et al., 2008), требуется дальнейшая валидация препарата.

Другой важный источник фибринолитических ферментов – яд змей. Фибролаза – это фибринолитический фермент, выделенный из змеи щитомордника *Agkistrodon contortrix contortrix*. Это цинковая металлопротеиназа, состоящая из 203 аминокислот, имеющих молекулярную массу приблизительно 29 кДа. Эксперименты на животных моделях, а также клинические исследования фазы I и II доказали эффективность и безопасность препарата данной металлопротеиназы при введении (Deitcher et al., 2006). Лебетаза – еще один фибринолитический фермент прямого действия, выделенный из другой змеи *Vipera lebetina*. Это одноцепочечный полипептид из 214 аминокислот, составляющих 23,7 кДа, и металлопротеиназа (ингибируется ЭДТА). Лебетаза достигает фибриногенолиза за счет быстрого растворения A α -цепи вместе с медленным лизисом B β -цепи. Использование лебетазы в отдельных терапевтических случаях представляется более безопасным, поскольку фермент проявляет меньшую геморрагическую активность (Siigur, Siigur, 1991).

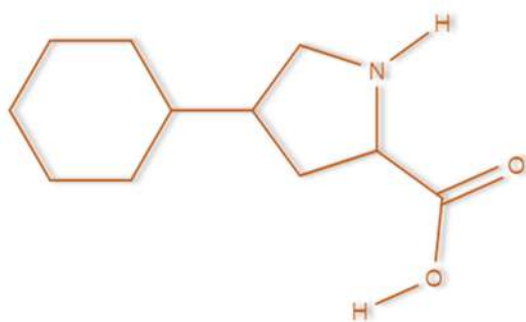
Дождевые черви являются богатым источником протеаз с тромболитическим потенциалом. Первоначально был охарактеризован фибринолитический фермент дождевого червя, выделенный из *Lumbricus* протеаз. Выявлены еще несколько видов – *Eisenia fetida*, *E. andrei*, *L. bimastus* и др. дождевых червей-продуцентов фибринолитических ферментов. Они продуцируют множественные тромболитические протеазы: *L. rubellus* – около шести вариантов люмброкиназы, а *E. fetida* – семь вариантов фибринолитических ферментов (EFE a-g) (Wang et al. 2003). Эти ферменты проявляют большую специфичность к фибрину по сравнению с активаторами плазминогена, такими как t-РА и урокиназа. Люмброкиназы представляют собой фибринолитические ферменты прямого действия, которые также обладают такими функциями, как активация плазминогена, уменьшение количества тромбоцитов агрегация, разжижение крови и т. д. Молекулярная масса этих ферментов колеблется от 20 до 35 кДа, и они сохраняют свою

активность в широком диапазоне pH (pH 1–11). На экспериментальных моделях *in vivo* потенциал для перорального применения препаратов на основе этих ферментов (Lee et al., 2007; Yan et al., 2010), в настоящее время проводятся клинические исследования.

Растения также являются богатым источником протеолитических ферментов. Сообщается, что неочищенные препараты растений демонстрируют растворение сгустков *in vitro* и обладают значительной стабильностью в широком диапазоне температур и pH. *Fagonia arabica*, *Vasopa monnieri*, *Leea indica*, *Leucas aspera*, *Clausena suffruticosa*, *Urena sinuate* и *Trema orientalis* – это лишь некоторые представители среди растений, продуцирующих тромболитические ферменты (Emran et al., 2015). Ферменты из некоторых других растений, таких как *Calotropis gigantea*, *Wrightia tinctoria* и *Synadenium grantii*, *Cynanchum puciflorum*, *Asclepias curassavica* и *Pergularia* проявляют прокоагулянтную активность (индуцирование образования сгустков), а также способность растворять сгустки. Эти ферменты представляют собой сериновые протеазы или цистеиновые протеазы. Было обнаружено, что протеаза, выделенная из *C. gigantea* обладает очень высоким тромболитическим потенциалом, при этом экспериментальное исследование показало, что применение данной протеиназы сопряжено с высоким риском кровотечения; тогда как ферменты из *S. grantii* и *W. tinctoria*, также демонстрирующие тромболитический потенциал, не показали при применении побочных эффектов по типу кровоизлияний (Shivaprasad et al. 2009). Ферменты цистеинпротеазы из плодов *Bromelia hieronymi*, *B. balansae* и оценивали на предмет их тромболитического потенциала и обнаружили, что при низкой концентрации они проявляли прокоагулянтную активность, а при увеличении концентрации – фибринолитическую активность (Errasti et al., 2016). Тромболитические ферменты также выделяют из водорослей. Показано, что морские водоросли рода *Codium* такие как *Codium intricatum*, *C. latum* и *C. diaricatum*, продуцируют множество фибринолитических ферментов. СР I

(протеаза *C. intricatum*) и СІР ІІ (протеаза *C. intricatum*) – это два фибринолитических фермента прямого действия, выделенные из *C. intricatum*. Молекулярная масса СІР І и СІР ІІ составляла приблизительно 20 кДа в денатурирующих условиях. Протеаза, выделенная из *C. latum*, получившая наименование СІР, также показала фибринолитический потенциал. Хотя фибринолитические ферменты этих водорослей разнообразны, в экспериментах они показали почти одинаковые характеристики. Они представляют собой сериновые протеазы и преимущественно гидролизуют цепь А α фибриногена, в то время как длительная инкубация расщепляет все субъединицы (Matsubara et al., 2000).

Бактерии, наряду с другими организмами являются важными продуцентами фибринолитических ферментов. Получение подобных препаратов из бактерий предполагает ряд преимуществ, в частности бактериальные белки считаются пригодными для перорального применения, а также набирать тромболитические препараты в бактериальных системах экспрессии намного проще в формате биотехнологических производств (al., 2004). Знаменательной вехой в истории тромботерапии стало открытие микробного препарата стрептокиназы из грамположительного патогенного гемолитического стрептококка *Streptococcus haemolyticus*, способного активировать плазминоген. Стрептокиназа смогла стать первым, как в РФ, так и в мире в целом медицинским препаратом микробного происхождения, подобным физиологическим активаторам (урокиназе, тканевому активатору), который нашел широкое применение в клинической практике (рис. 14 а, б).



(а)



(б)

Рисунок 14. Структура молекулы стрептокиназы (а), колонии *Streptococcus haemolyticus* (б)

Большинство бактерий-продуцентов тромболитических препаратов относятся к роду *Bacillus*. Наттокиназа, первоначально выделенная из *Bacillus* фибринолитическим ферментом (Sumi et al., 1987). Помимо наттокиназы, из ферментов были выделены из *Bacillus* sp. Субтилизин QK1 и субтилизин QK2 – это две сериновых фибринолитических протеиназы с молекулярной массой 42 кДа и 28 кДа соответственно, выделенные из *B. subtilis* штамм QK02. Бафибриназа – тромболитический фермент массой 32,3 кДа образуется *B. subtilis* штаммом AS-S20-I (Mukherjee et al., 2012). Второй по величине род продуцентов бактериальных фибринолитических ферментов – *Streptomyces*. Термофильный штамм *Streptomyces megasporus* SD5 продуцировал химотрипсин-подобную сериновую пептидазу с молекулярной массой 35 кДа с фибринолитическим потенциалом. Другой представитель этого рода, *Streptomyces omiyaensis*, синтезировал тромболитическую сериновую протеазу, SOT (Uesugi et al., 2011). Среди других родов бактерий также

известны представители, способные синтезировать фибринолитические протеиназы, в частности, *Paenibacillus* sp. IND8, *Serratia* sp. RSPB11, *Pseudomonas* sp. IND11, *Treponema denticola*, *Proteus penneri*, *Pseudomonas* sp. TKU015 и другие представители (Simkhada et al., 2010).

Физико-химические особенности ферментов микромицетов, обуславливающие их тромболитическое применение

Впервые ферменты грибов для борьбы с тромботическими состояниями использовал М. Стефанини, которому в 1958 г. удалось получить инъекционный препарат, представляющий собой белок, седиментированный под действием солей тяжелых металлов (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}). Почти одновременно в Московском университете был получен сходный препарат тромболитического действия из *A. oryzae* штамм МГУ – «аспергиллин М». Впоследствии в конце XX века в РФ впервые были получены ферментные препараты активаторы пламиногена биотехнологического происхождения – трихолизин (триаза) и лонголитин. Их продуценты – *Trichothecium roseum* и – являются физиологически и морфологически близкими анаморфными грибами, которые существуют в природных условиях как сапротрофы и нематофаги. К хищным грибам-нематофагам относят грибы, способные использовать в пищу микроскопических беспозвоночных животных – нематод. Для реализации этой «пищевой» стратегии грибы образуют внеклеточные протеолитические ферменты – хитиназы и коллагеназы (J. Yang et al., 2007).

Способность микромицетов расти на твердых субстратах, таких как остатки агропромышленных отходов, сделала их более подходящими для экономичного производства фибринолитических ферментов. Виды *Aspergillus* представляют собой наиболее широко распространенную группу микромицетов, и лишь немногие из них оказываются продуцентами тромболитических ферментов (Tao et al., 1998). В качестве источников пищи и энергии они способны перерабатывать комплексные органические

соединения, которые будучи сложно организованными со стерической точки зрения молекулами, не могут преодолевать клеточную мембрану.

Вегетативное тело большинства микромицетов является мицелием, состоящим из ветвящихся гиф с апикальным ростом и боковым ветвлением. Отличительной чертой микромицетов является осмотрофный способ питания. Мицелий поглощает питательные вещества из субстрата всей поверхностью, и это предполагает выделение грибным мицелием в субстрат многочисленных внеклеточных ферментов, способных разрушать высокомолекулярные олимерные соединения до олиго- и мономеров.

Особое место среди грибных экзоферментов занимают протеолитические ферменты. Они чрезвычайно разнообразны, обладают как широкой, так и узкой субстратной специфичностью, способностью к ограниченному протеолизу и устойчивостью в экстремальных условиях. Это обуславливает высокие адаптивные способности грибов и возможность осваивать ими уникальные экологические ниши (Павлюкова, 1998). Протеолитические ферменты играют важную роль в физиологии и развитии грибов. Внешний гидролиз белковых субстратов внеклеточными протеазами необходим для выживания и роста как сапрофитных, так и патогенных видов.

Протеолитические ферменты микромицетов-патогенов способствуют развитию воспаления путем взаимодействия с кининовой системой, а также участвуют в коагуляции и фибринолитических процессах. Химическая природа протеолиза заключается в гидролизе амидных связей в белковых молекулах, причем существует два возможных механизма реакции: ковалентный катализ (нуклеофильная атака, инициируемая группами самого фермента) и общий основной катализ, под действием связанной молекулы воды. Принципиально механизмы отличаются лишь молекулами, принимающих участие в реакции нуклеофильной атаки (Антонов, 1991) (рис.15).

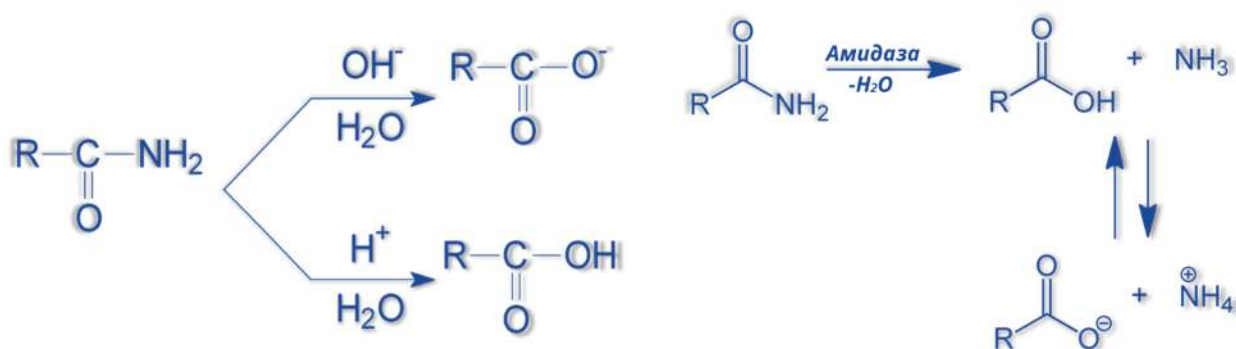


Рисунок 15. Схема механизма гидролиза амидной связи с участием молекул ВОДЫ

Процесс протеолиза по своему характеру может быть ограниченным и неограниченным. Неограниченный, или исчерпывающий, протеолиз сводится к полной деструкции белка – то есть к распаду молекулы на отдельные аминокислотные остатки. Однако исчерпывающий гидролиз белковых субстратов, при всей его значимости, никак не является единственной функцией системы протеолитических ферментов. Чрезвычайно важные функции в организме выполняют реакции ограниченного протеолиза, которые регулируют активность многих белков, а также играют чрезвычайно ответственную физиологическую роль (Степанов, 2005). Ограниченным протеолизом называют разрыв одной или нескольких строго определенных связей в молекуле белка. Он ведет к активации неактивных форм ферментов и является важнейшим регуляторным механизмом, который может способствовать возникновению новых физиологических функций или регулировать уже существующие (рис. 6). Реакции ограниченного протеолиза участвуют в процессе образования и инактивации практически всех ферментов, гормонов и других биологически активных белков, и пептидов, и, следовательно, в контроле активности основных биорегуляторов человеческого организма (рис. 16).

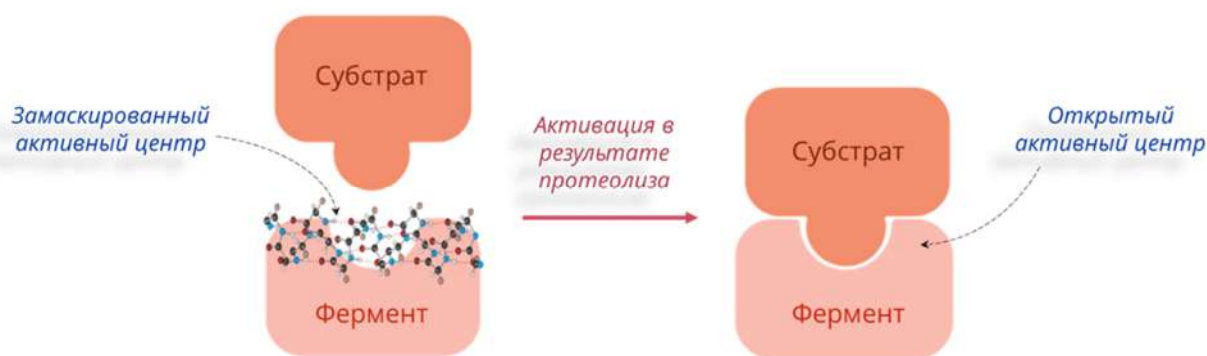


Рисунок 16. Схема активации механизма ограниченного протеолиза

На текущий момент описано и хорошо изучено достаточно большое число протеиназ. Безусловно, это оказалось возможным благодаря широкому разнообразию их функций и множественности субстратов, последовательно образующихся при расщеплении глобулярного белка до коротких пептидов, а затем до соответствующих мономеров – аминокислот. Большинство ферментов системы фибринолиза являются протеолитическими. Для этих ферментов характерна высокая скорость активации и значительная экономичность регуляторного действия.

В современной биомедицинской промышленности протеазы микромицетов находят широкое коммерческое применение, в связи с этим в последние годы резко возрос интерес к поиску новых источников их получения. Особенно эффективными протеазы микромицетов считаются в виду их высокой продуктивности по сравнению с аналогичными ферментами других живых организмов. Объем рынка подобных ферментов превысил миллиард долларов и продолжает стремительно развиваться (рис. 17) (Meenu et al, 2000).



Рисунок 17. Структура рынка протеаз, синтезируемых микромицетами (по данным Global Biotech Handbook 2022 с изменениями)

Протеазы микромицетов широко используются в биотехнологии, в основном в пищевой, кожевенной промышленности, производстве моющих средств, в экологических процессах биоремедиации и получении терапевтических пептидов (Rao et al., 1998). Протеолитические ферменты некоторых грибов обладают рядом полезных для медицины свойств, в частности они способны к селективному протеолизу компонентов плазмы крови, воздействию на факторы крови, подобно тромбину, индуцируя коагуляцию плазмы и крови человека.

Среди наиболее перспективных культур были выявлены и достаточно подробно исследованы представители родов *Cladosporium*, *Fusarium*, Японскими учеными было установлена способность протеаз микромицетов рода *Cephalosporium* (совр. – *Acremonium*) демонстрировать свойства

ферментов фибринолиза, и особенности ферментов системы коагуляции крови (Toshio Satoh et al., 1977). На кафедре микробиологии МГУ имени М.В. Ломоносова у экзопротеаз, выделенных из микромицета *Aspergillus ochraceus*, была впервые обнаружена активность активатора протеина С и получен лиофилизированный комплексный препарат этих белков (Егоров и др., 2009).

Однако данные разработки, оказывающие непосредственное воздействие на фибрин, до настоящего момента не использовались широко в клинической практике, т.к. часто их применение вызывало достаточно серьезные побочные эффекты для организма в виде обширных кровотечений, токсических осложнений, геморрагических патологий и аллергических реакций. Согласно современным подходам к разработке лекарственных средств, необходимо, чтобы итоговая фармацевтическая композиция тромболитического средства была не только специфичной и эффективной с точки зрения фармакокинетики и фармакодинамики, но и соответствовала многочисленным стандартам безопасности, учитывающим метаболизм продуктов распада препарата, пути и время полувыведения из организма, возможные отдаленные побочные эффекты для системы гемостаза и др. В настоящее время исследуются продуценты фибринолитических ферментов с потенциальной тромболитической активностью среди различных групп грибов: сапротрофов, фитопатогенных форм, возбудителей заболеваний человека, немато- и энтомофагов. Продуценты демонстрируют способность к синтезу тромболитических соединений в различных условиях температурного и рН оптимума, характерных для каждого рода микромицетов (табл. 4).

Таблица 4. Характеристика протеиназ некоторых микромицетов

Микромицет	Фермент	Тип фермента	Mr, Topt, pHopt	Тип воздействия	Источник
<i>Aspergillus oryzae</i> KSK-3	-	-	36.5 kDa	-	Batomunkuev a and Egorov, 2001
<i>Aspergillus oryzae</i> KSK-3	-	Сериновая протеаза	30 kDa, 50 °С, pH 6.0	-	Shirasaka et al. 50 °С, 2012
<i>Fusarium pallidoroseum</i>	-	Металлопротеаза	40 °С, pH 7.0	-	El-Aassar, 1995
<i>Fusarium sp. BLB</i>	-	Сериновая протеаза	27 kDa, 50 °С, pH 9.5	-	Ueda et al., 2007
<i>Fusarium sp. CPCC 480097</i>	-	Сериновая металлопротеаза	28 kDa, 45 °С, pH 8.5	Расщепляет фибриноген α -цепи, низкое сродство к β - и γ -цепям	Wu et al., 2009
<i>Cochliobolus lunatus</i>	Fu-P	-	pH 6.98	-	Abdel-Fattah and Ismail, 1984
<i>Rhizopus chinensis-12</i>	-	Гидросульфурилметаллопротеиназа	18 kDa, 45 °С, pH 10.5	Сходное сродство к α , β и γ цепям фибриногена.	Xiao-lan et al. 45 °С, 2005
<i>Perenniporia fraxinea</i>	-	Металлопротеаза	42 kDa, 35–40 °С, pH 6.0	Расщепляет α -цепь фибриногена, а затем β - и γ -цепи.	Kim et al., 2008
<i>Oidiodendron flavum</i>	-	-	22 kDa, 45–55 °С, pH 8.0		Tharwat, 2006
<i>Paecilomyces tenuipes</i>	PTEFP	Сериновая протеаза	14 kDa, 35 °С, pH 5.0	Быстро растворяющаяся цепь фибриногена A α , отсутствие сродства к цепям β и γ	Kim et al., 2011
<i>Ganoderma lucidum</i>	-	Металлопротеаза	52 kDa, pH 7.0–7.5	Расщепляет A α и B β цепь фибриногена	Choi and Sa, 2000

1.3.3. Микромицеты рода *Tolyposcladium* как продуценты перспективных тромболитических препаратов

Поиск новых продуцентов перспективных тромболитических препаратов среди представителей аскомицетов представляется чрезвычайно перспективным, т.к. про данную группу микромицетов известно, что они чаще, чем микромицеты многих других таксономических групп, образуют протеиназы с высокой фибринолитической активностью – плазминоподобной и активаторной к плазминогену.

Относительно недавно был найден новый штамм почвенного микромицета *T. inflatum* k1, который проявлял активаторную к плазминогену активность, на 20% превышающую фибринолитическую (плазминоподобную) (Шаркова и др., 2015). Штаммы этого вида известны как продуценты эффективного иммуносупрессорного антибиотика циклоспорина, при этом образование у них фибринолитических ферментов ранее не было подробно изучено (Survase et al., 2009). *Tolyposcladium inflatum* относится к семейству *Ophiocordycipitaceae*, отряда *Hypocreales*, класса *Sordariomycetes*. Представляет собой анаморфу аскомицетного гриба *Cordyceps subsessilis* (в настоящее время носит название *Elaphocordyceps subsessilis*) (Hodge et al., 1996).

Исследование кариотипа секвенированного штамма *T. inflatum* NRRL 8044 (ATCC 34921) установило, что *T. inflatum* имеет 6 хромосом размером от 3,8 до 6,6 МБ и мини-дополнительную хромосому размером 1 МБ с общим размером генома примерно 30,45 МБ. Общий размер выборки (30,348 МБ) близко соответствовал этой оценке и содержал 194 контига в 101 каркасе с N50 1,5 МБ и Nmax 3,56 МБ (Stimberg et al., 1992). Аннотационный вычислительный конвейер MAKER 2.0 предсказал, что 9998 генов в составе генома, которые кодируют белок. Средняя длина гена (1,67 т.п.н.), длина экзона (570 п.н.) и длина интрона (77,5 п.н.), что аналогично оценкам для других видов *Ascomycota*. Однако *T. inflatum* имеет более высокое среднее

содержание GC (58%) и более компактный геном с более высокой плотностью генов (329 генов / Mb), чем близкородственные нитчатые аскомицеты. При этом в результате анализа генома было выявлено, что, хотя *T. inflatum* наиболее известен как продуцент циклоспорина, также было показано, что он продуцирует и другие биоактивные вторичные метаболиты, включая инсектицидные соединения, такие как эфрапептины и толипин, дикетопиперазины и карбоксистерин. антибиотик эргоконин-С и другие ранее не исследованные классы ферментов (Khalidi et al., 2010). Согласно полученным данным, *T. inflatum* имеет большой потенциал для продукции вторичных метаболитов. Большинство этих основных ферментов попали в один из 36 кластеров вторичных метаболитов, идентифицированных SMURF, или дополнительных 2 кластеров (всего 38), идентифицированных antiSMASH (Bushley et al., 2013).

Для почвенного штамма *T. inflatum* k1 Шарковой и соавторами в 2014 г. производились исследования тромболитических фракций, выделенных из культуральной жидкости микромицета. В частности, было показано, что *T. inflatum* k1 представляет перспективный продуцент активаторов плазминогена. активностью. Были получены две фракции внеклеточных белков, содержащие протеиназы, проявляющие активаторную к плазминогену активность, но различающиеся по способности гидролизовать фибрин и казеин. Активность протеиназы одной из фракций характеризовалась отсутствием плазминоподобной и низкими значениями общей протеолитической активности. Она полностью подавлялась ингибитором сериновых протеиназ и незначительно ингибиторами металлопротеиназ и цистеиновых протеиназ, т.е. представляла собой тиолзависимую ЭДТА чувствительную сериновую протеиназу. Наличие выраженной активаторной к плазминогену активностью у этой протеиназы позволило считать ее перспективной для создания новых препаратов для лечения тромбоэмболических осложнений.

1.3.4. Белое море как экологическая ниша для скрининга новых штаммов микромицетов рода *Tolypocladium*

Виды *Tolypocladium* существуют как сапротрофы, так и как патогены насекомых (Bissett et al., 1983). *Tolypocladium inflatum*, а также *Tolypocladium* являются энтомопатогенными представителями своего рода, которые изучались в качестве возможных агентов биологической борьбы с насекомыми. Микромицеты данных видов были выделены из почвы, а также из насекомых представителей отрядов *Coleoptera (Elateridae)*, *Lepidoptera (Noctuidae)*, *Diptera (Culicidae, Bibionidae, Anthomyiidae)* и *Hymenoptera (Sericidae, Formicidae)* (Humber, Hansen, 2006). Различные свойства этих грибов, связанные с их патогенностью и способностью проникать через кутикулу насекомых, имеют большое биотехнологическое значение. В процессах, сопряженных с проницаемостью через кутикулу насекомого могут участвовать ферментные комплексы, катализирующие липолиз, протеолиз и хитинолиз. Таким образом, уровень ферментативной активности отдельных ферментов также может служить диагностическим инструментом для выбора эффективного биологического препарата. Рост *Tolypocladium* sp. в гемолимфе личинок-хозяев связан с секрецией микромицетом разнообразных вторичных метаболитов, а также ферментных комплексов, облегчающих деструкцию оболочек насекомого (Bandani et al., 2000). К подобным метаболитическим соединениям энтомогенных грибов относятся фибринолитические ферменты, а также деструксины и эфrapeптины, считаются важными детерминантами вирулентности микромицета. Впоследствии в ряде исследований было показано, что хитинолитическая активность некоторых энтомопатогенов необходима для роста и распространения микромицета - перфорации наружных оболочек, облегчающие проникновение возбудителей в ткани восприимчивых насекомых. (Pelizza et al., 2007).

Исследования энтомопатогенности штамма *Tolypocladium cylindrosporum* LPSC 1065, выделенного в Аргентине, показали, что эффективность данного

микробиота в отношении различных групп насекомых может сохраняться не только в умеренных температурных условиях (23-35 °C), но и в достаточно широком температурном диапазоне (4-40 °C), при этом эффективность в психрофильных условиях некоторых других представителей микробиоты рода *Tolypocladium* была сопоставима с представителями данного рода, выделенных при нормальных условиях из максимально освоенных микробиотами экониш, таких как, например, лесные или луговые почвы. Для микробиоты данной группы была характерна гибкость метаболизма и отмечено, что в зависимости от условий, особенно экстремальных и малоблагоприятных, например, при высокой или низкой температуре, может проявляться модифицированная активность и стабильность ферментов, а также общий метаболизм микробиоты может меняться из-за температурной зависимости активации процессов ферментации и катализа, денатурации белков и стабильности клеточной мембраны (Scorsetti et. al., 2012). В связи с этим, особенно перспективным с точки зрения биотехнологических подходов к разработке новых тромболитических препаратов на основе продуцентов из группы *Tolypocladium* представляется исследование штаммов микробиоты данного рода, выделенных не только из почвенных экониш, но также полученных из грунтов с отличными физико-химическими свойствами.

Источником подобных штаммов может являться экониша донных грунтов Белого моря. Рядом исследователей было показано большое разнообразие микробиоты, существующих в данных физико-химических условиях. Использование культуральных методов позволяет выделять из донных осадков разнообразные виды грибов, в том числе и некоторые новые для науки (Бубнова, 2009).

Песчаные грунты прибрежной зоны морей представляют собой специфические и практически неизученные местообитания грибов. Их уникальность связана, в первую очередь, с особенностями литоральной зоны, для которой характерно периодическое затопление и осушение, регулярные изменения влажности, солёности и температуры. Литораль одновременно

находится под воздействием факторов, характерных как для моря, так и для суши. Промытые песчаные грунты распространены, как правило, на абразионных и абразионно-аккумулятивных формах берегового рельефа. В Белом море наиболее распространены литоральные грунты разной степени заиления, а чистые, промытые пески встречаются относительно редко. (Бубнова, 2017).

При этом большинство исследований микромицетов и свойств их ферментных комплексов проводились на штаммах, выделенных либо в умеренно-теплых, либо в теплых водоемах, в то время как протеиназные комплексы микромицетов, выделяемые из донных грунтов холодных водоемов мало изучены и могут обладать рядом уникальных характеристик, определяющих их потенциальное применение для тромботерапевтического использования.

Согласно данным, полученным рядом исследователей, в Кандалакшском заливе Белого моря в таксономической структуре преобладают анаморфы аскомицетов, а самой многочисленной и разнообразной группой является класс *Sordariomycetes*. Среди представителей рода *Tolyposcladium* чаще всего обнаруживались виды *Tolyposcladium inflatum* и *Tolyposcladium cylindrosporum*. (Хуснуллина и соавт., 2018; Бубнова и соавт., 2020). Исследование особенностей ферментативных комплексов данных микромицетов, обладающих тромболитическими свойствами может являться актуальным направлением скрининга новых продуцентов тромболитических препаратов. При этом, благодаря экологическим особенностям микромицетов, выделенным из данной экониши, ферментные комплексы микромицетов рода *Tolyposcladium* из донных грунтов Белого моря могут обладать необычными физико-химическими свойствами: оптимумами действия, показателями фибринолитической и активаторной к плазминогену активностей, временем действия, стабильностью и т.п. характеристиками, определяющими их успешное биотехнологическое применение для диагностики и терапии тромботических состояний.

Сравнение свойств ферментных препаратов, выделенных из микромицетов рода *Tolypocladium*, полученных из донных грунтов Белого моря со свойствами охарактеризованного почвенного штамма-продуцента тромболитических веществ *Tolypocladium inflatum* k1 позволит выявить наиболее оптимальный микромицет-продуцент с биотехнологической точки зрения, сравнить свойства выделяемых тромболитических препаратов и охарактеризовать возможность их медицинского применения. Помимо этого, может быть возможным создание комбинированных тромболитических препаратов, например, обладающих синергичным эффектом от применения, позволяющих достичь более выраженного терапевтического эффекта или более широко проводить диагностические исследования.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования

Объектом исследования служили изоляты микромицетов из грунтов Белого моря, предположительно относящиеся к роду *Tolyrocladium*, любезно предоставленные заведующим кафедрой микологии и альгологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, д.б.н. Кураковым А.В. Грибы изолировали из донных грунтов Белого моря (с глубин 0-30 м) различными методами посева (разведения, мелкоземом) и на различные органические субстраты-приманки. Исследовали верхние слои (до 3-5 см) донных грунтов, которые в Кандалакшском заливе сформированы песком и галькой с примесью ила (рис. 18). Образцы отбирали в 3-кратной повторности в зоне литорали и с глубин 10, 20 и 30 м методом дайвинга в стерильные пластиковые флаконы в летние месяцы 2014-2016 гг. В местах отбора донных грунтов зарегистрированы остатки водорослей. Посев проводили в день отбора образцов или после нескольких суток хранения при 4°C. Повторность образцов в посевах 3-6-кратная. Посев из разведения 1:10 проводили на среду сусло-агар, приготовленную на морской воде (САм). Для подавления роста бактерий в среду добавляли антибиотики широкого спектра.

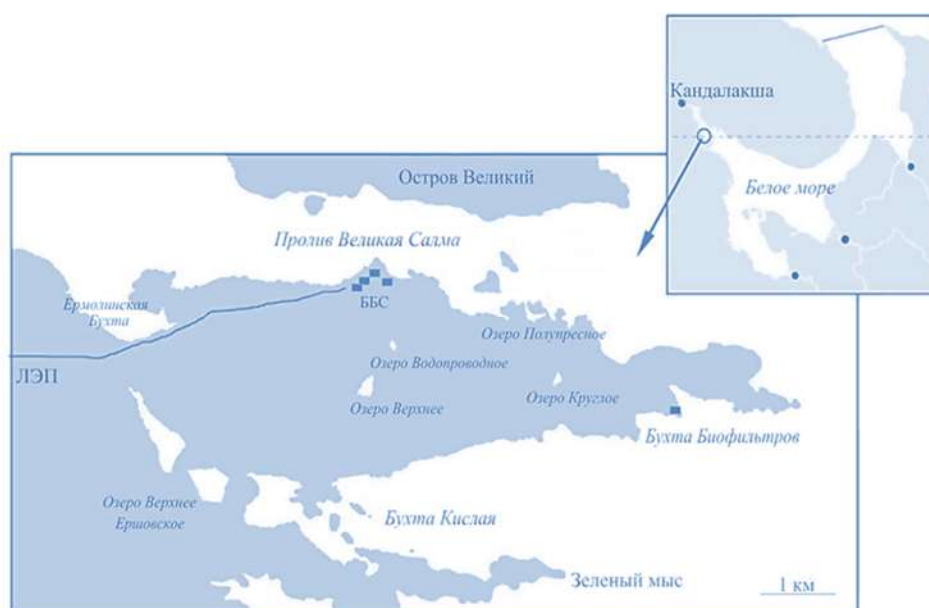


Рисунок 18. Места отбора проб изолятов из грунтов Белого моря

Другим объектом исследования служил штамм микромицета *T. inflatum* k1, любезно предоставленный к.б.н. Шарковой Т.С., который был ранее изучен как продуцент протеиназ, обладающих фибринолитической и активаторной к плазминогену активностью (Шаркова и др., 2016). Посевной материал получали смывом спор с поверхности культуры, выращенной в пробирках на скошенном сусло-агаре (СА) в течение 7 сут при 25°C в питательную среду состава (%): сусло – 6.7, глюкоза – 2, пептон – 0.1 (Батомункуева и Егоров, 2001). После 2 суток культивирования часть биомассы переносили в ферментационную среду состава (%): глицерин – 7, глюкоза – 3, гидролизат рыбной муки – 3, NaNO₃ – 0.2, MgSO₄ x 7H₂O – 0.1, K₂HPO₄ – 0.1. Культивирование микромицета осуществляли в колбах объемом 750 мл, содержащих 100 мл среды, на орбитальной качалке (200 об/мин) при 28°C. Чистые культуры грибов хранили в пробирках со скошенным СА при 4°C.

2.2. Молекулярно-генетическая идентификация изолятов микромицетов из грунтов Белого моря

Идентификацию культур проводили по морфолого-культуральным признакам на СА и агар Чапека с использованием определителей (Gams, 1971; Kohlmeyer, Kohlmeyer, 1979; Bissett, 1983; Zare, Gams, 2001; Klich, 2002; Rice, Currah, 2005; Crous et al., 2007; Domsch et al., 2007; Seifert et al., 2011), по генетическим признакам – с помощью секвенирования ITS-участка 5,8S рДНК. Чистые культуры микромицетов культивировали на плотной или жидкой среде, содержащей при 25°C в течение 7-20 суток в зависимости от целей эксперимента. Мицелий отделяли от среды центрифугированием и растирали с жидким азотом в стерильной керамической ступке.

Выделение ДНК проводили с использованием СТАВ буфера (0.5 М NaCl, 10 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 10 мМ ЭДТА, 2% (w/v) СТАВ) по стандартному протоколу экстракции (Rogers, Bendich, 1985). Для амплификации рДНК были использованы универсальные праймеры ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG)

и ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) с применением стандартных ПЦР-протоколов (White et al., 1990).

Для ПЦР использовали HS Taq ДНК-полимеразу производства компании «Евроген» (Россия). Фрагменты ДНК разделяли стандартным электрофорезом в 1.2% агарозном геле с добавлением EtBr. В качестве буферной системы использовали Трис-ацетат-ЭДТА-буфер (ТАЕ). После электрофореза гели анализировали в УФ свете с длиной волны 360 нм. Ампликон экстрагировали из геля с помощью набора CleanUp Mini («Евроген», Россия). Секвенирование последовательностей проводила компания «Евроген». ДНК секвенировали с использованием набора BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, США) на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 xl (Applied Biosystems, CA, США). Полученные последовательности нуклеотидов использовали для поиска соответствия в базе данных GenBank (NCBI) и видовой идентификации с помощью биоинформатического программного обеспечения BLAST (рис. 19, 20).



Рисунок 19. Основные этапы скрининга изолятов микромицетов из грунтов Белого моря

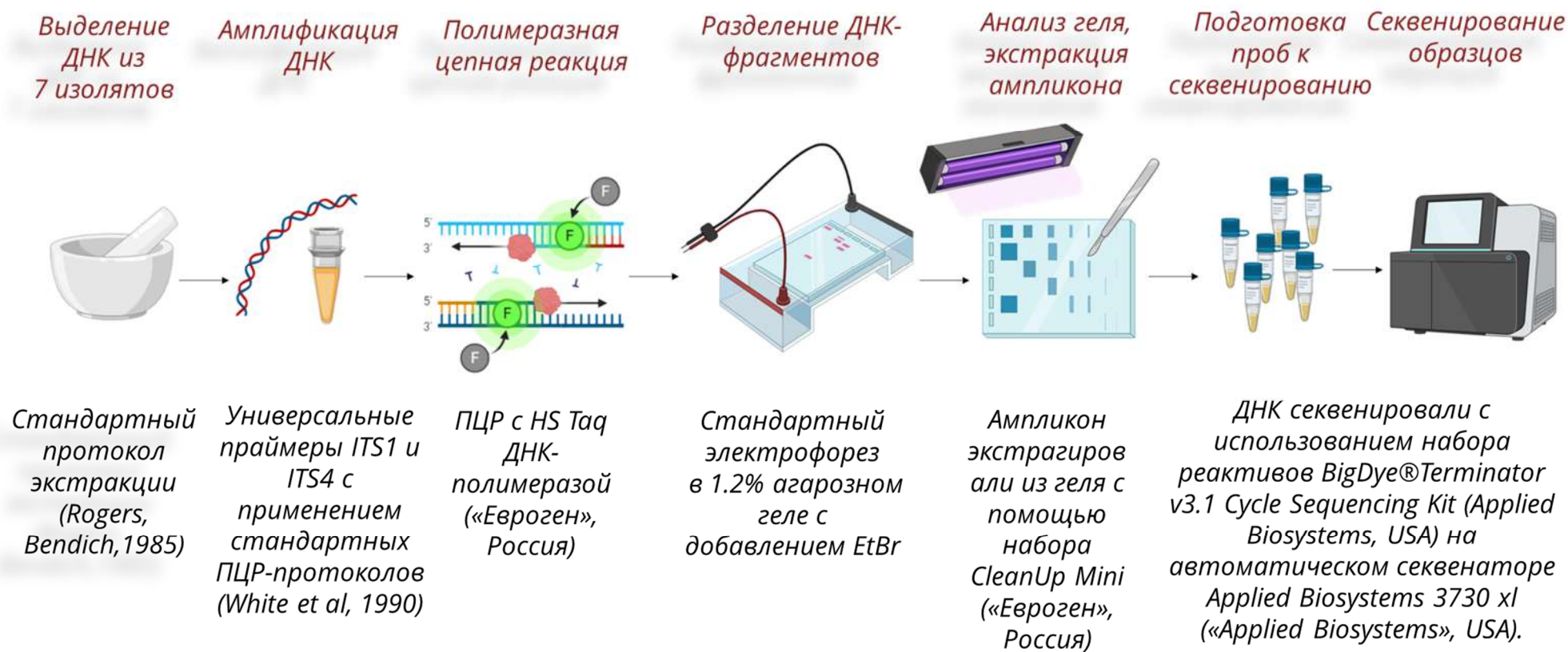


Рисунок 20. Основные этапы идентификации изолятов микромицетов, выделенных из донных грунтов Белого моря

2.3. Выявление протеолитического потенциала штаммов (определение энзиматического индекса штаммов микромицетов)

Выявление протеолитического потенциала штаммов микромицетов проводили в условиях поверхностного культивирования в чашках Петри на среде Чапека с добавлением разных субстратов, содержащих белок (казеина, фибрина, фибриногена). Посев производили уколом в центр чашки, измерения диаметров зон колоний и их гидролитической активности проводили через 7 суток. Энзиматический индекс (EI) рассчитывали как отношение диаметра зоны лизиса (D) к диаметру колонии микромицета (d) (рис. 21).

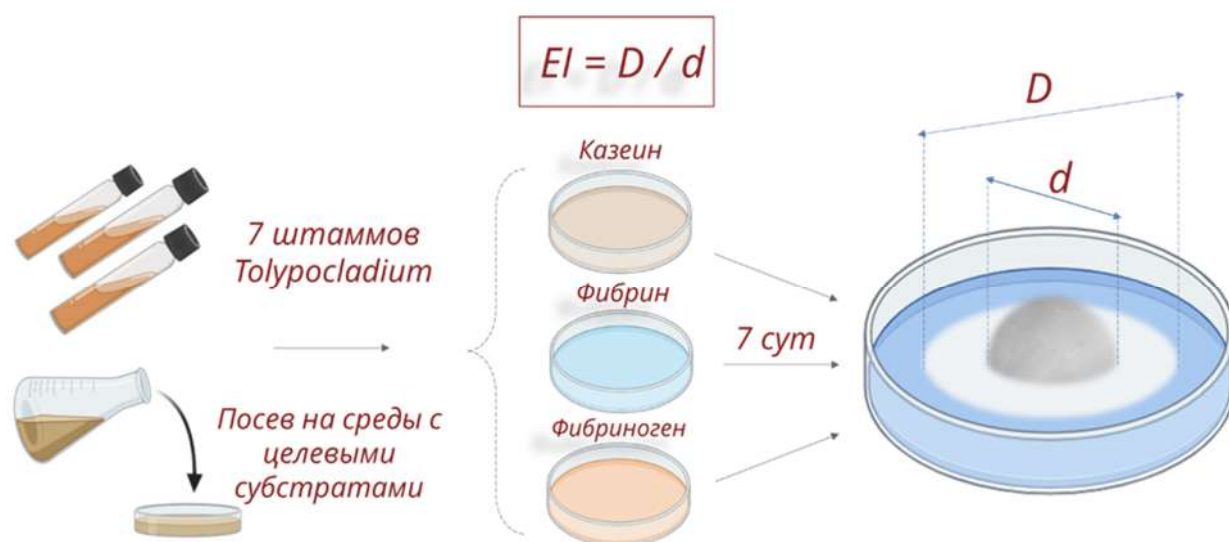


Рисунок 21. Схема определения энзиматического индекса микромицетов на разных белоксодержащих субстратах

2.4. Зависимость радиальной скорости роста микромицетов-продуцентов от pH, температуры и солености

Оптимальные условия для роста штаммов определяли при их выращивании на агаризованной среде Чапека в чашках Петри при различных температурах (4, 12, 20, 28 и 37°C) и значениях pH (4.0, 5.0, 6.0, 7.0 и 8.0). pH среды устанавливали добавлением 0.1M раствора соляной кислоты или гидроксида натрия; значения солености среды – доведением концентрации

NaCl до 10, 26, 31 и 50%. Посев проводили уколом в чашку Петри со средой в трехкратной повторности. Диаметр (мм) колонии измеряли ежедневно в течение 10 суток. Скорость радиального (линейного) роста рассчитывали по формуле: $Kr = \Delta R / \Delta t$ (Паников, 1991), где R – размер колонии (мм), t – время (сут).

2.5. Определение концентрации белка

Концентрацию белка определяли с помощью метода с бицинхониновой кислотой (Redinbaugh, 1986). Готовили растворы А (1.0 г бицинхониновой кислоты (4,4'-дикарбокси-2,2'-бихинолин, динатриевая соль; 2.0 г $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,16 г тартрата натрия ($\text{C}_4\text{H}_4\text{Na}_2\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); 0,4 г NaOH; 0,95 г NaHCO_3 , объем доводили водой до 100 мл), Б (1,0 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ растворяли в воде, объем доводили водой до 25 мл), В (смешивали растворы А и Б в соотношении 50:1 по объему). Растворы А и Б хранили при комнатной температуре, раствор В готовили в день проведения анализа. В процессе измерения к 50 мкл раствора белка добавляли 950 мкл раствора В, инкубировали 30 мин при 37 °С, затем измеряли поглощение при 562 нм относительно раствора, не содержащего белка. Значения для построения калибровочной кривой получали тем же способом, что и при анализе образцов: 12 образцов, содержащих от 0 до 50 мкл раствора БСА (рис. 22).

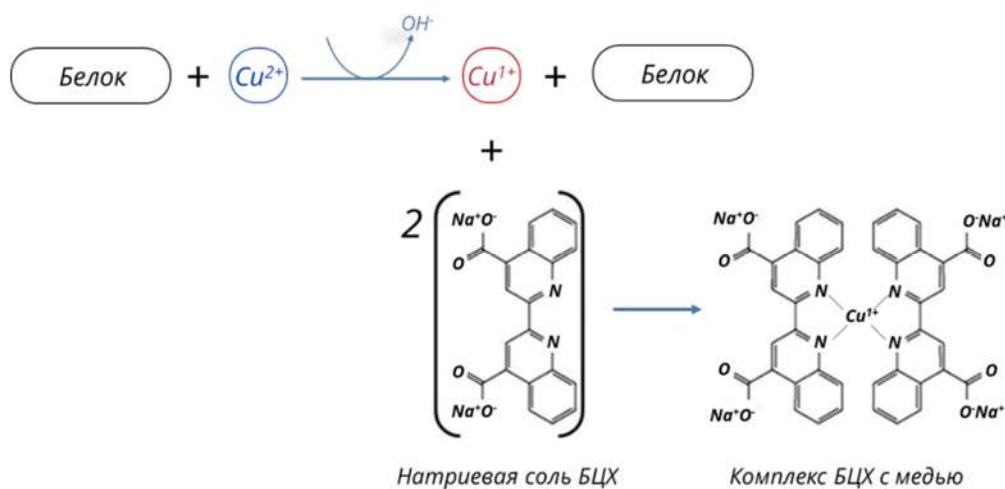


Рисунок 22. Формирование комплекса Cu^+ с бицинхониновой кислотой (качественная реакция)

2.5. Получение препарата протеиназ из культуральной жидкости и его разделение методом изоэлектрофокусирования

Для наработки и последующего выделения препарата протеиназ штаммы выращивали в глубинных условиях на орбитальных качалках (200 об/мин) в колбах объемом 750 мл со 100 мл питательной среды при 28°C. Посевной материал получали смывом спор микромицетов с агаризованной среды Чапека в среду, содержащую сусло, глюкозу и пептон (Батомункева и Егоров, 2001), с дальнейшим культивированием в течение 2 суток. Дальнейшее культивирование осуществляли на ферментационной среде – посевной материал в объеме 3 мл переносили в среды культивирования – органоминеральную (среда №1) и минеральную (среда №2) по содержанию азота, и культивировали в течение 3 суток. Среда №1 имела состав (в г/л): глюкоза – 30.0, глицерин – 70.0, гидролизат рыбной муки – 5.0, NaNO₃ – 2.0, KН₂PO₄ – 0.5, MgSO₄ – 0.5; среда № 2 (в г/л): глюкоза – 35.0, крахмал – 10.0, NH₄NO₃ – 5.0, NaCl – 2.0, KН₂PO₄ – 0.5, MgSO₄ – 0.5. Культуральную жидкость отделяли от биомассы фильтрованием водоструйным насосом через фильтровальную бумагу (“ФС”, Россия). Внеклеточные белки из полученной культуральной жидкости осаждали сульфатом аммония при 80%-ной степени насыщения. Осадок белков формировался при 4°C в течение 12 ч. Затем его отделяли центрифугированием при 15000 g (20 мин, 4°C), растворяли в минимальном объеме 0.01M Трис-НСl-буфера, рН 8.2, содержащего 0.002M ацетат кальция, и диализовали в диализных мешках против того же буфера (12 ч, 4°C). Полученный раствор белков центрифугировали в аналогичных условиях для удаления осадка и затем лиофильно высушивали (рис. 23).

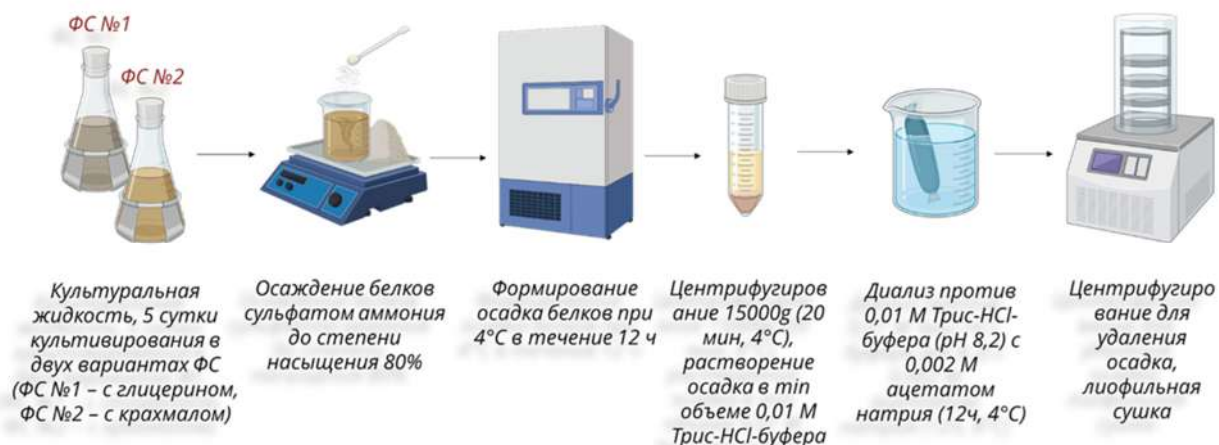


Рисунок 23. Основные этапы получения протеиназ из культуральной жидкости микромицетов (основные этапы)

Белковые фракции разделяли методом изоэлектрофокусирования (ИЭФ) на колонке объемом 110 мл (ЛКВ, Швеция) в градиенте плотности сахарозы 0-40% и рН 3-10, создаваемом амфолинами (Pharmacia, Швеция), при напряжении 700В в течение 36 ч (Осмоловский и др., 2013). Во фракциях (объемом 1 мл) после элюции с колонки определяли рН, содержание белка по оптической плотности при 280 нм и общую протеолитическую активность (рис. 24). Дальнейшие эксперименты по определению тромболитического потенциала и тромболитической активности проводили в «пиковых» фракциях после ИЭФ.

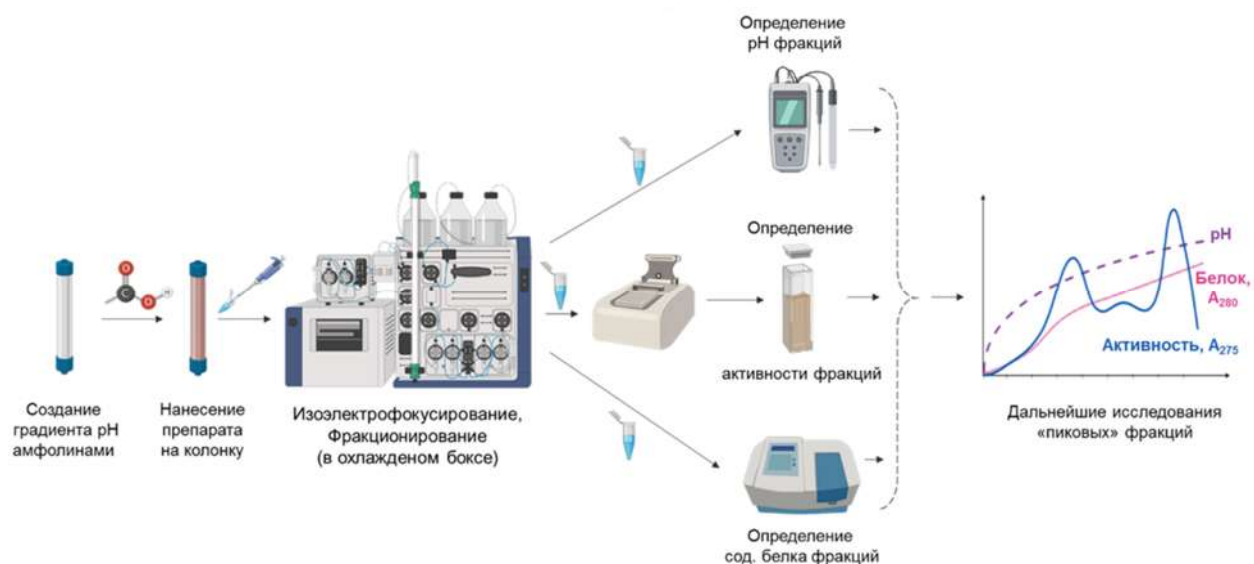


Рисунок 24. Изоэлектрофокусирование препаратов протеиназ микромицетов (основные этапы)

2.6. Определение общей протеолитической активности

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

2.7. Определение фибринолитической активности

Способность фермента расщеплять фибрин также оценивали по количеству высвобожденного тирозина. К 200 мкл пробы добавляли 400 мкл 1%-го раствора фибрина в 0.1М Трис-НСl буфере (рН 8.2). Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 30 мин в термошейкере при 600 об/мин. Реакцию останавливали добавлением 600 мкл 10% ТХУ, далее образцы центрифугировали в течение 5 мин при 14000 об/мин, затем в надосадочной

жидкости измеряли поглощение при длине волны 275 нм. Для определения количества тирозина в пробе использовали калибровочную кривую по тирозину. За единицу активности, как и в случае с определением общей протеолитической активности, принимали количество мкмоль тирозина, отщепившегося за минуту в 1 мл исследуемой пробы.

2.8. Определение фибринолитической и активаторной к плазминогену активности методом фибриновых пластин

Фибринолитическую и активаторную к плазминогену активности в препаратах микромицетов, а также во фракциях, полученных после ИЭФ, определяли на фибриновых пластинах методом «фибриновых чашек» Аструпа-Мюллерц-Лассена (Astrup, Mullertz, 1952; Lassen, 1952). Для приготовления фибриновых пластин смешивали 900 мкл 3%-го раствора бычьего фибриногена в 0.5М NaCl (физиологический раствор), затем добавляли 200 мкл раствора тромбина (из расчета 2 мг/мл раствора NaCl), аккуратно перемешивали и переносили полученный раствор в чашки Петри. Образование фибринового геля происходило при комнатной температуре в чашках с открытыми крышками. Инкубация продолжалась в подобных условиях в течение 2,5 ч, затем часть чашек оставляли на 30 минут в термостате с закрытыми крышками при температуре 86°C, для инактивации плазминогена. Прогретые и непрогретые чашки с фибриновыми пластинами хранили в холодильнике с вложенными под крышки бумажными фильтрами, для предохранения фибринового геля от попадания сконденсировавшихся капель воды. Для измерения фибринолитической и активаторной к плазминогену активности на пластины наносили по 30 мкл пробы и помещали чашки в термостат на 4 ч (рис. 25). Затем на пластинах измеряли итоговую площадь зоны лизиса в мм². Разность в диаметрах и площадях зон лизиса на прогретых и непрогретых чашках служила показателем способности фермента не только к прямой фибринолитической активности, но и его способности

активировать плазминоген. Для последующего использования полученных результатов, данные выражали в усл. ед./мл.



Рисунок 25. Схема эксперимента (основные этапы) по определению фибринолитической и активаторной к плазминогену активности на фибриновых пластинах

2.8. Определение протеолитической активности в отношении отдельных белков системы гемостаза

Протеолитическую активность в культуральной жидкости, препаратах и отдельных фракциях микромицетов после ИЭФ в отношении отдельных белков системы гемостаза определяли по гидролизу хромогенных пептидных субстратов (ХПС) (Osmolovskiy et al., 2012), имеющих в качестве хромофора пара-нитроанилидную группу (-pNA): плазмина (HD-Val-Leu-Lys-pNA; For-Ala-Phe-Lys-pNa), тромбина (Tos-Gly-Pro-ArgpNA и H-D-Phe-Pip-Arg-pNA), сериновых протеаз (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA), урокиназы (pGlu-Gly-Arg-pNA), фактора Ха (HD-Ile-Pro-Arg-pNa), субтилизина (Z-Ala-Ala-Leu-pNa), эластазы (Suc-Ala-Ala-Ala-pNa) и трипсина (Bz-Arg-pNa). Для проведения реакции смешивали 200 мкл пробы, 50 мкл 0.05M Трис-НСl-буфера, рН 8.2 и 100 мкл 0.05%-го раствора соответствующего субстрата. Смесь инкубировали в течение 5 мин при 37°C, реакцию останавливали добавлением 200 мкл 0.1N NaOH. В контрольную пробу добавляли те же компоненты за исключением

хромогенного субстрата. Образующийся в ходе реакции из бесцветного хромогенного субстрата пара-нитроанилин (pNA) имеет жёлтую окраску и обнаруживается спектрофотометрическим методом по оптическому поглощению при длине волны 405 нм. Измерение оптической плотности проводили при 405 нм на спектрофотометре Hitachi 200-20 (Япония). За единицу активности (Е) во всех случаях принимали количество мкМ отщепившегося пара-нитроанилина (рис. 26).



Рисунок 26. Схема эксперимента (основные этапы) по определению активности протеиназ с хромогенными пептидными субстратами

2.9. Изучение динамики накопления протеиназ, образуемых штаммами микромицетов

Динамику накопления протеиназ, образуемых штаммами микромицетов, изучали в течение 5 суток глубинного культивирования штаммов в ферментационной среде с глюкозой (на 100 мл воды: глюкоза – 4 г, крахмал – 1 г, гидролизат рыбной муки – 0.5 г, пептон – 0.5 г, NaCl – 0.2 г, K₂HPO₄ – 0.05 г, MgSO₄ x 7H₂O – 0.005 г) по изменению параметров концентрации белка, pH, общей протеолитической активности, специфической протеолитической активности с хромогенным субстратом (плазминоподобной, субстрат – HD-Val-Leu-Lys-pNA), а также по фибринолитической и активаторной к

плазминогену активностям. На основании полученных данных определяли штаммы с наиболее высоким тромболитическим потенциалом.

2.10. Определение рН- и температурного оптимума активности, и оптимума стабильности препарата

рН-оптимум активности препаратов микромицетов, а также во фракциях, полученных после ИЭФ, определяли в 0.4М универсальном (натрий-ацетат-фосфат-боратном) буфере с рН от 3.0 до 11.0. К 150 мкл буфера с соответствующим значением рН добавляли 100 мкл раствора фермента и 100 мкл раствора субстрата. Для определения рН-стабильности препаратов микромицетов, а также фракций, полученных после ИЭФ, проводили инкубацию препарата в растворах буфера с разными значениями рН при 37°C в течение 2 ч, после чего определяли казеинолитическую активность. Полученные результаты выражали в % от исходной общей протеолитической активности (рис. 27).

Температурный оптимум активности препаратов микромицетов, а также во фракциях, полученных после ИЭФ, определяли в 0.05М Трис-НС1 буфере, рН 8.2, по казеинолитической активности при 25, 30, 37, 45, 55 и 65°C. Термостабильность препаратов микромицетов, а также фракций, полученных после ИЭФ, изучали при инкубации фермента при заданных температурах в течение 2 ч и выражали в % от исходной общей протеолитической активности фермента (рис. 27).

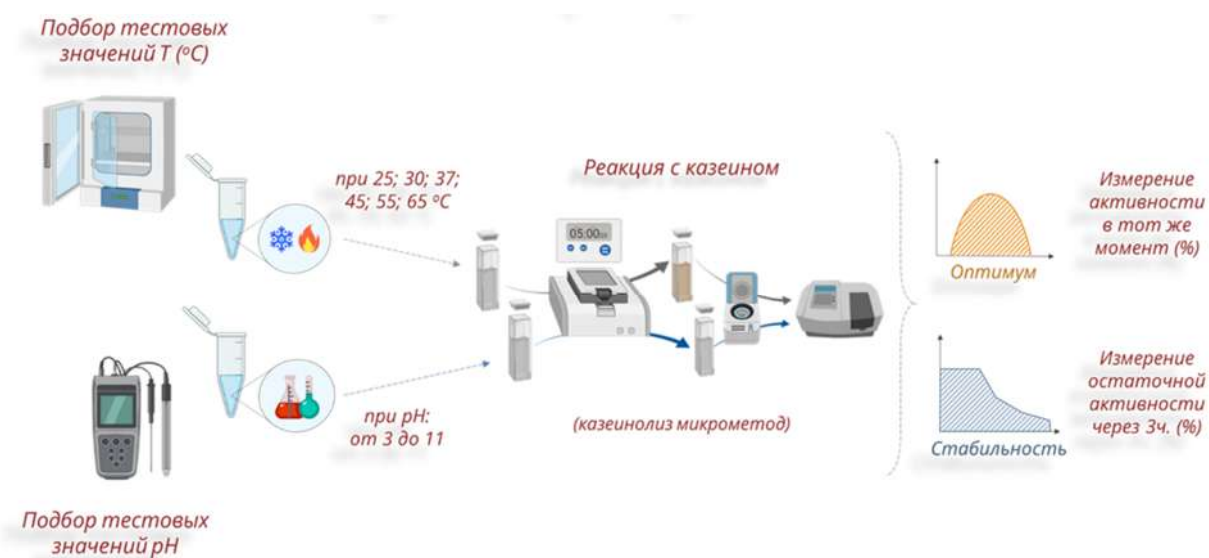


Рисунок 27. Схема определения рН/Т-оптимума, рН/Т-стабильности препарата

2.11. Определение тромболитического эффекта (степень эффективности тромболиза)

Для исследования тромболитического эффекта (степень тромболиза) препаратов микромицетов, а также фракций, полученных после ИЭФ, формировали фибриновый сгусток в пробирках типа Eppendorf путем добавления в каждую пробирку 100 мкл человеческой плазмы, полученной из крови донора, и 20 мкл тромбина, фиксировали массу пробирки до, во время (после каждого этапа) и после эксперимента. Добавляли к каждому образцу фибринового сгустка препарат протеиназ и фиксировали изменение массы через равные промежутки времени (30, 60 и 90 мин). По остаточной массе сгустка (выраженной в % от его первоначальной массы) определяли степень протекания тромболиза в образцах в динамике (Kotb et al., 2015) (рис. 28).

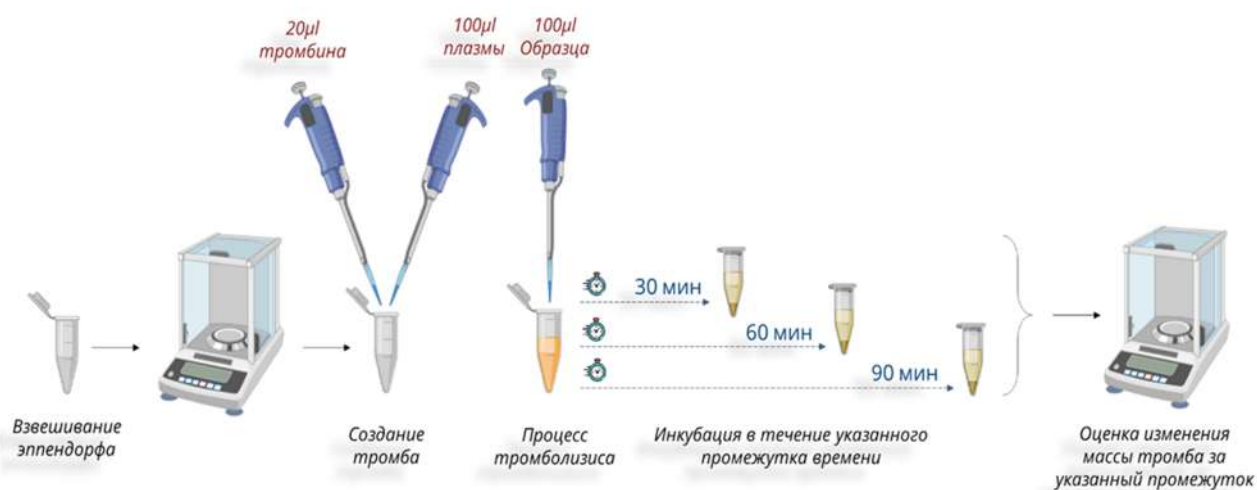


Рисунок 28. Схема экспериментов по определению степени тромболиза (основные этапы)

2.12. Препаративный электрофорез белков

Электрофоретическое разделение белков препаратов микромицетов, а также фракций, полученных после ИЭФ, проводили в ПААГ по методу Дэвиса в трис-глициновом буфере, рН 8.3, с концентрацией акриламида в верхнем геле 6.0% и в нижнем – 7.5%. После проведения электрофореза часть геля разрезали поперек на фрагменты 0.5-0.7 мм, заливали 500 мкл 0.05М Трис-НСI-буфера, рН 8.2, для элюции белков из геля и оставляли на 1 ч при -4°C . В элюатах проводили определение протеолитической активности. Неразрезанную часть геля окрашивали 0.08%-ным раствором Кумасси бриллиантового голубого G-250 в 3.5% хлорной кислоте (Holbrook et al., 1976).

2.13. Определение углеводного компонента в составе препаратов протеиназ

Углеводный компонент в составе молекул протеиназ микромицетов определяли с помощью периодной кислоты и реактива Шиффа (фуксинсернистой кислоты – 1 г основного фуксина растворяли в 200 мл дистиллированной воды (комнатной температуры), тщательно взбалтывая в течение 3-5 мин). Раствор фильтровали через бумажный фильтр. К фильтрату добавляли 10 мл 1М хлористоводородной кислоты и 1 г метабисульфита калия

или натрия. Раствор в хорошо закрытой колбе помещали в темноту на 24 ч. После обесцвечивания фуксина реактив приобретал желтоватый или коричневый цвет в зависимости от качества основного фуксина. Для окончательной очистки фуксина от примесей добавляли к нему 3-5 растолченных таблеток активированного угля, хорошо взбалтывали и отфильтровывали в склянку с притертой пробкой методом дот-блоттинга на нитроцеллюлозных мембранах (Thronton et al., 1996). В качестве положительного контроля использовали раствор внеклеточной дрожжевой инвертазы (0.5 мг/мл), а в качестве отрицательного – 0.5 мг/мл БСА (рис. 29).

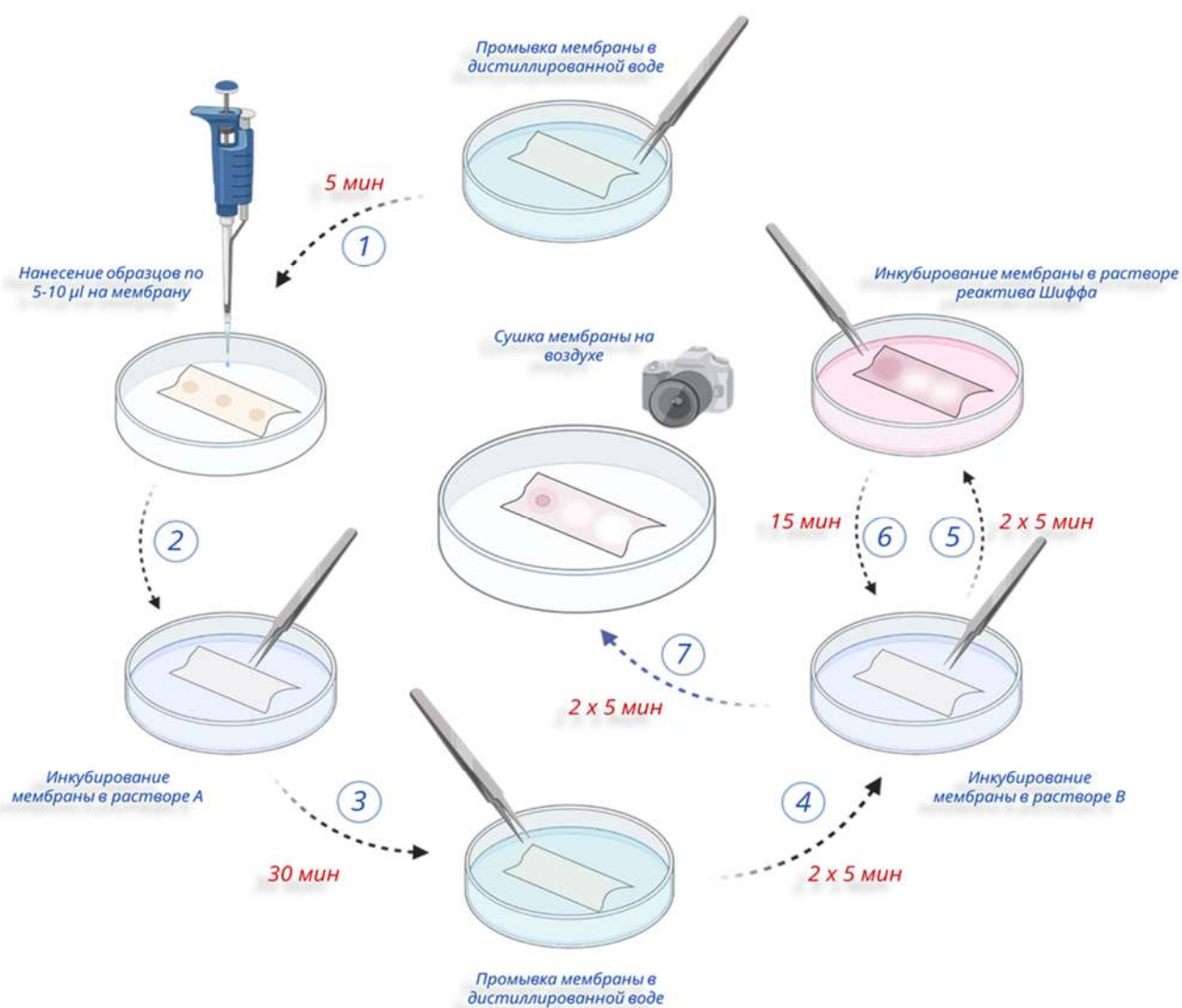


Рисунок 29. Основные этапы определения углеводного компонента в составе протеиназ

2.14. Выявление коагулазной активности

Наличие коагулазной активности в препаратах микромицетов, а также в отдельных фракциях, полученных после ИЭФ, выявляли по визуализации фибринового волокна в экспериментах со свертыванием фибриногена человека (Fibrinogen from Human Plasma, Sigma-Aldrich, США) и быка (Bovine fibrinogen 9001-32, H2B Medical, США), а также в экспериментах с плазмой человека и плазмой кролика. В пробирки типа Eppendorf добавляли 0,1 мл препарата протеиназ и 0,2 мл 0,4% раствора фибриногена и оценивали визуализацию фибринового волокна. В качестве контроля использовали 0,1% раствор протромбина (рис. 30).

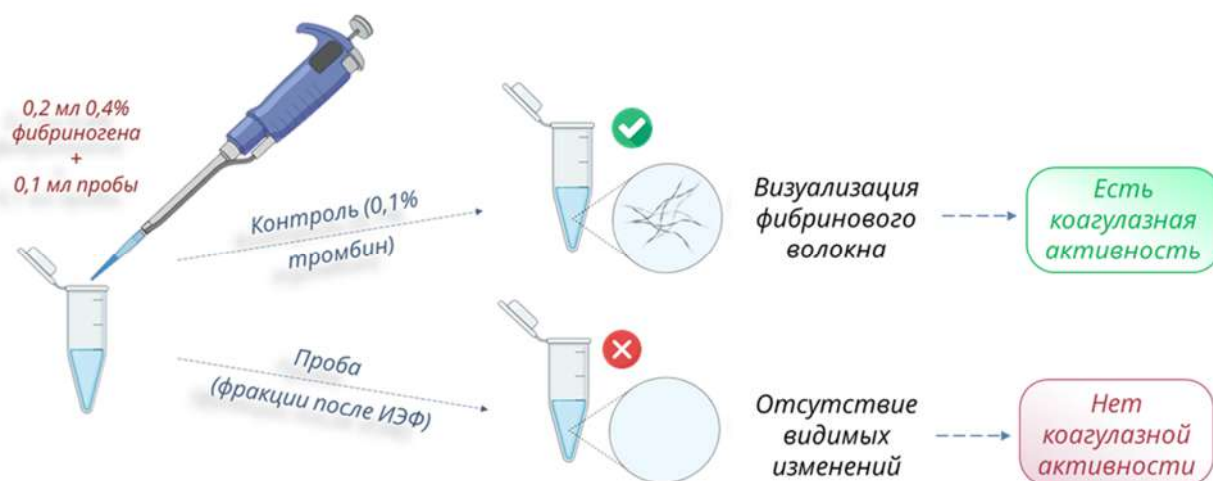


Рисунок 30. Схема экспериментов по выявлению коагулазной активности

2.15. Обработка результатов

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

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ²

3.1. Идентификация изолятов микромицетов из грунтов Белого моря

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

3.1.1. Молекулярно-генетическая идентификация изолятов микромицетов из грунтов Белого моря

Изоляты штаммов микромицетов, полученные из грунтов Белого моря, были идентифицированы по молекулярно-генетическим признакам с помощью ПЦР и дальнейшего секвенирования ITS-региона 5,8S рДНК. Фрагменты ДНК выделенных изолятов, разделенные стандартным электрофорезом в 1.2% агарозном геле с добавлением EtBr, представлены на рис. 31.

² 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. **Fokichev N.S.**, Kokaeva L.Yu., Popova E.A., Kurakov A.V., Osmolovskiy A.A. Thrombolytic potential of micromycetes from the genus *Tolytocladium*, obtained from White Sea soils: screening of producers and exoproteinases properties // *Microbiology research*. 2022. V. 13, № 4. P. 898–908. doi: 10.3390/microbiolres13040063. IF(WoS): 0.98, Q2. Вклад автора в печатных листах: (0,63/0,56) (здесь и далее в скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах).

2. **Фокичев Н.С.**, Корниенко Е.И., Крейер В.Г., Шаркова Т.С., Осмоловский А.А. Тромболитическая активность и свойства препарата протеиназ, образуемых микромицетом *Tolytocladium inflatum* k1 // *Микология и фитопатология*. 2021. Т. 55, № 6. С. 449–456. doi: 10.31857/S002636482106009X. IF(РИНЦ): 0.915. (0,44/0,39).

3. **Фокичев Н.С.**, Корниенко Е.И., Крейер В.Г., Осмоловский А.А. Исследование тромболитического потенциала экзопротеиназ, образуемых микромицетом *Tolytocladium inflatum* 62а, выделенным из грунтов Белого моря // *Микология и фитопатология*. 2023. Т. 57, № 2. С. 95–103. doi: 10.31857/S0026364823020071. IF(РИНЦ): 0.915. (0,50/0,45).

Патенты РФ:

Фокичев Н.С., Осмоловский А.А., Лукьянова А.А., Корниенко Е.И., Налобин Д.С. Способ оценки тромболитического потенциала микромицетов. // Патент RU 2788697, МПК C12Q 1/37, C12N 9/50, C12N 1/14 № 2020123049, Заявл. (10.07.2020); Опубл. (24.01.2023). (0,94/0,84).

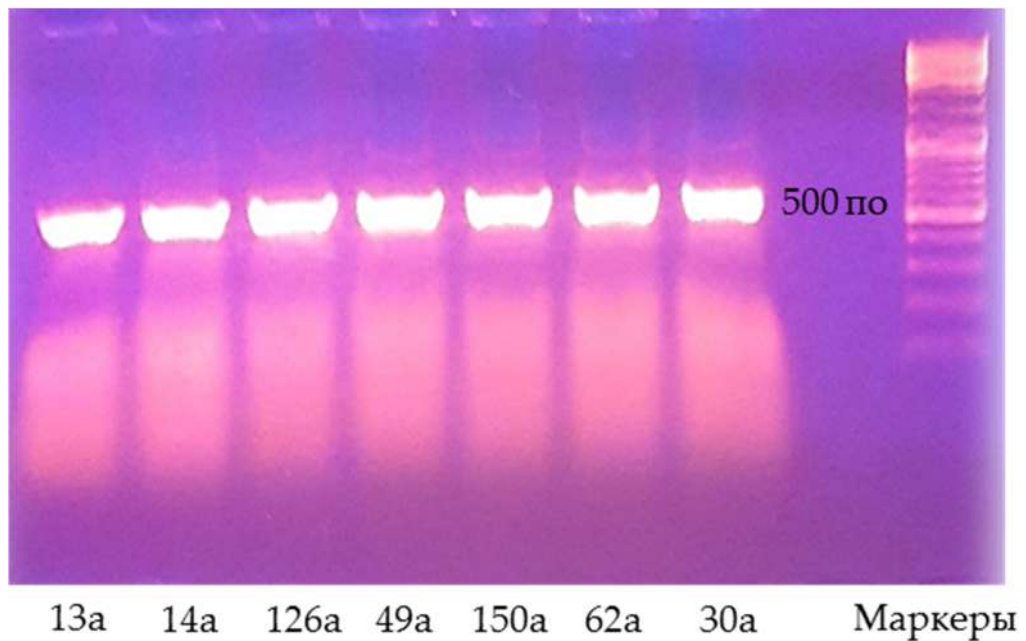


Рисунок 31. Электрофореграмма фрагментов ДНК штаммов-изолятов, разделенных в агарозном геле с добавлением EtBr

После проведения электрофореза ампликоны секвенировали, и полученные последовательности нуклеотидов использовали для поиска соответствия в GenBank для видового определения с помощью пакета программ BLAST.

В результате идентификации штаммов-изолятов до вида по последовательности 5,8S рДНК установлено, что выделенные штаммы относились к видам *Tolyposcladium inflatum* и *Tolyposcladium cylindrosporium*, но не были идентифицированы как на 100% идентичные известным штаммам. Штаммам были присвоены идентификационные наименования *Tolyposcladium cylindrosporium*: 150a; *Tolyposcladium inflatum*: 13a; 14a; 30a; 49a; 62a; 126a. Помимо видовой идентификации штаммов, проводили выравнивание полученных последовательностей модулем программ BLAST, а также строили филогенетическое дерево (рис. 32) взаимосвязи полученных штаммов (кладограмма) с помощью пакета программ ClustalW, согласно которому полученные штаммы можно условно разделить на отдельные подгруппы в зависимости от их филогенетической близости друг к другу. В первую группу

вошел *T. cylindrosporum* 150а, во вторую – *T. inflatum* 30а, *T. inflatum* 49а и *T. inflatum* 126а, в третью – штаммы *T. inflatum* 13а, *T. inflatum* 14а и *T. inflatum* 62а.

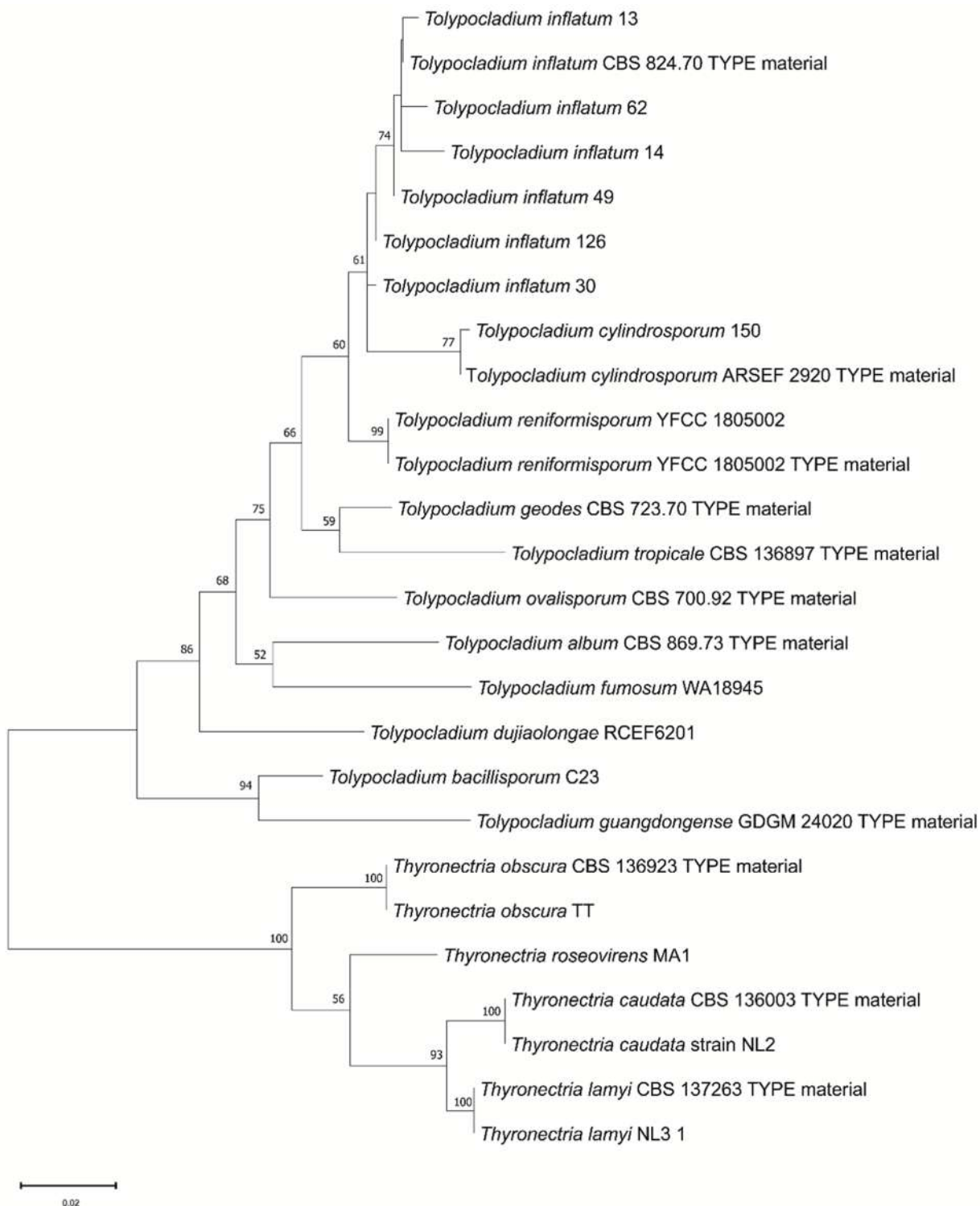


Рисунок 32. Филогенетическое древо изолятов рода *Tolypocladium*, выделенных из грунтов Белого моря

3.1.2. Изучение зависимости радиальной скорости роста микромицетов от pH, температуры и солености

Влияние условий pH и температуры на радиальную скорость роста штаммов было исследовано для значений pH в интервале от 4 до 8, для значений температур от 4°C до 37°C при росте штаммов микромицетов на чашках со средой Чапека. Результаты представлены на графиках на рис. 33 (а) - (ж) для каждого штамма.

Согласно полученным результатам, температура культивирования значительно влияет на радиальную скорость роста всех выделенных штаммов рода *Tolyrocladium*. При значениях температуры 4°C и 37°C практически не происходит роста мицеллия на чашках Петри со средой Чапека. При значениях температуры от 12°C до 20°C скорость роста достигает умеренных промежуточных показателей по сравнению со скоростью роста при 28°C, при которых достигается наиболее эффективный максимально быстрый рост всех штаммов (в среднем радиальная скорость роста при данном значении температуры выше скоростей при 20°C на 20%, при 12°C на 45%, при 4°C на 75%, при 37°C на 90%). В целом, относительно профилей радиальных скоростей роста выделенных штаммов, можно заключить, что они находятся в области относительно близких значений, что можно наблюдать на графиках на рис. 33.

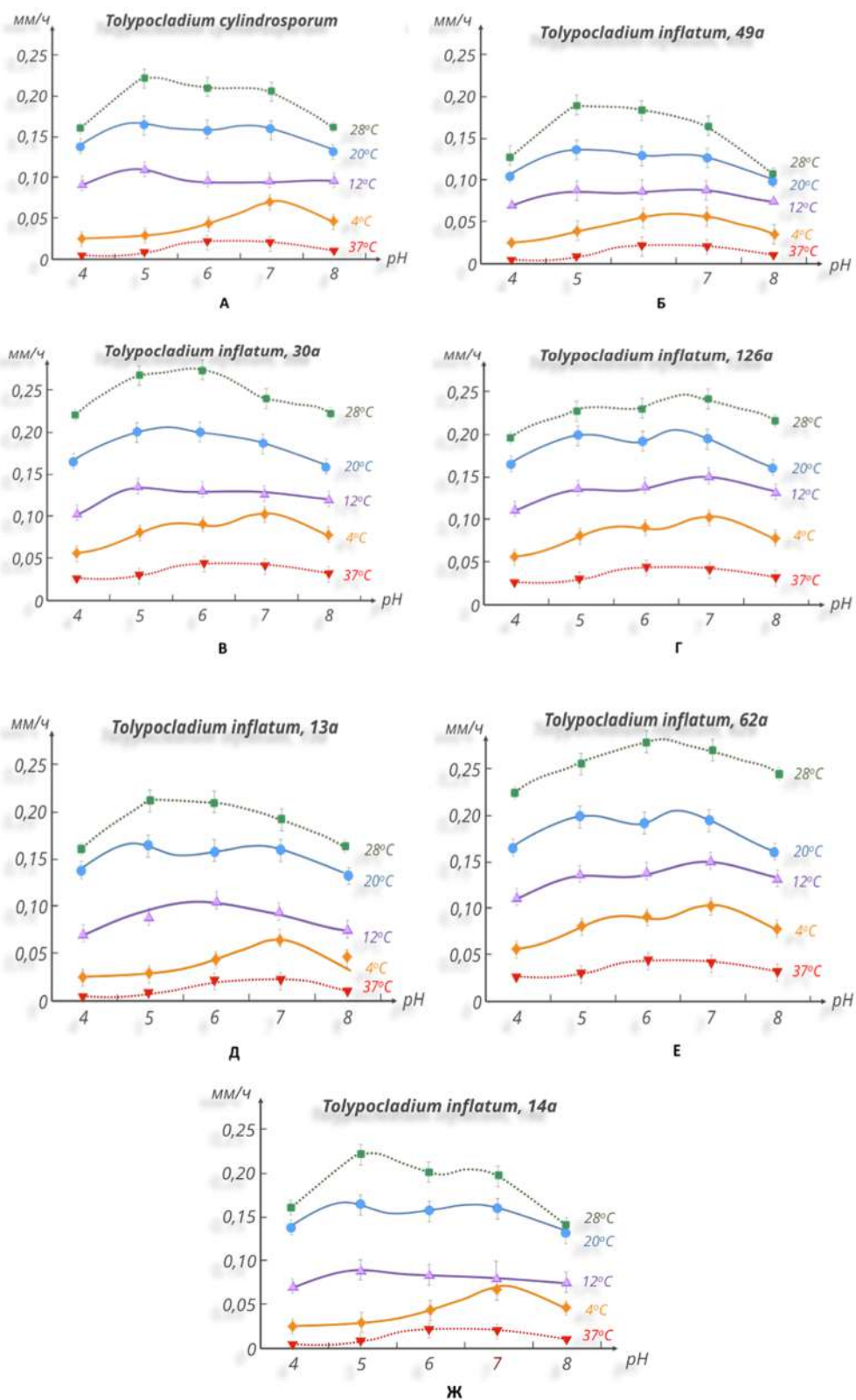


Рисунок 33. Влияние условий рН и температуры на радиальную скорость роста штаммов (а) – *T. cylindrosporium* 150а, (б) – *T. inflatum* 49а, (в) – *T. inflatum* 30а, (г) – *T. inflatum* 126а, (д) – *T. inflatum* 13а, (е) – *T. inflatum* 62а, (ж) – *T. inflatum* 14а

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

Максимальное возможное значение радиальной скорости – 0,27 мм/ч, среди всех штаммов при наблюдаемых оптимумах температуры 28°C и pH 6.5 зафиксировано для штамма *T. inflatum* 62a (рис. 33, рис. 34).

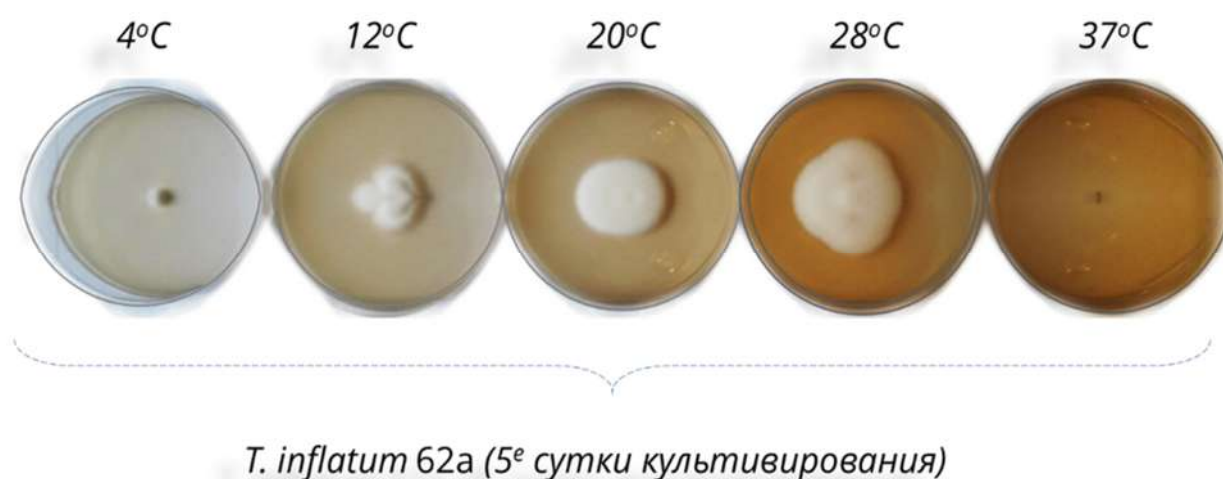


Рисунок 34. Рост штамма *Tolypocladium inflatum* 62a на пятые сутки на среде Чапека при разных температурах от 4 до 37°C и pH 6.5

В результате исследования влияния солености на рост штаммов-изолятов рода *Tolypocladium* показано, что при значениях солености среды до 10‰ и более 50‰ наблюдается минимальная скорость роста микромицетов. Результаты определения радиальной скорости роста представлены в табл. 5.

Таблица 5. Влияние солености среды на радиальную скорость роста штаммов

Tolypocladium

Скорость роста Штамм	10‰, мм/сут	26‰, мм/сут	31‰, мм/сут	50‰, мм/сут
<i>T. inflatum</i> 13a	2,85 ± 0,05	5,55 ± 0,05	4,1 ± 0,05	2,25 ± 0,05
<i>T. inflatum</i> 14a	3,65 ± 0,05	5,8 ± 0,05	4,75 ± 0,05	3,2 ± 0,05
<i>T. inflatum</i> 30a	3,75 ± 0,05	5,75 ± 0,05	5,05 ± 0,05	2,4 ± 0,05
<i>T. inflatum</i> 49a	3,8 ± 0,05	6,0 ± 0,05	5,4 ± 0,05	2,5 ± 0,05
<i>T. inflatum</i> 62a	3,95 ± 0,05	6,15 ± 0,05	5,35 ± 0,05	2,95 ± 0,05
<i>T. inflatum</i> 126a	2,9 ± 0,05	5,9 ± 0,05	5,15 ± 0,05	2,75 ± 0,05
<i>T. cylindrosporium</i> 150a	3,85 ± 0,05	5,85 ± 0,05	4,85 ± 0,05	3,15 ± 0,05

Полученные экспериментальные данные соотносятся с условиями, в которых изначально находились выделенные штаммы микромицетов рода *Tolypocladium*, а именно с условиями солености Белого моря в пределах Кандалакшского залива. Согласно данным литературы, в данном географическом ареале наблюдаемые значения солености морской воды находятся в интервале от 25 до 30‰ (рис. 35, 36). При этом высокая радиальная скорость роста для всех выделенных штаммов микромицетов рода *Tolypocladium* достигалась при значениях солености в пределах 26-31‰, а максимальная – при значении 26‰.

Наиболее высокая радиальная скорость роста была зафиксирована для штамма *T. inflatum* 62a, и она составила 6,15 мм/сут при солености среды в 26‰.



Рисунок 35. Карта солености Белого моря

Минимальная радиальная скорость роста при солености среды в 26‰ была зафиксирована для штамма *T. inflatum* 13а, и она составила 5,55 мм/сут (рис. 36).

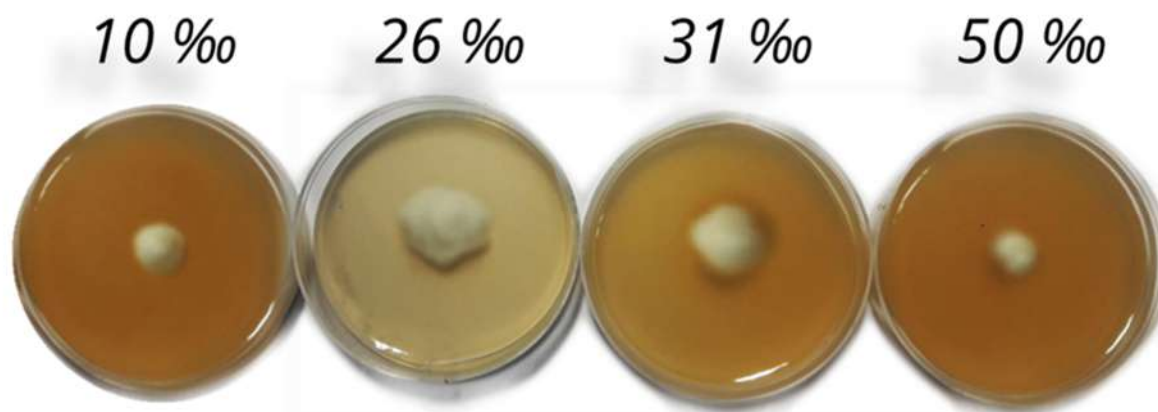


Рисунок 36. Влияние солености среды на рост штамма *Tolyprocladium inflatum* 13а

3.1.3. Выявление протеолитического потенциала штаммов (определение энзиматического индекса штаммов микромицетов)

В результате исследования по выявлению протеолитического потенциала штаммов микромицетов, полученных из грунтов Белого моря, в условиях поверхностного культивирования в чашках Петри на среде Чапека с добавлением разных субстратов (казеина, фибрина, фибриногена), были получены следующие результаты, представленные в табл. 6 и на рис. 37. Помимо оценки энзиматических индексов на средах с конкретными субстратами, оценивали также соотношения EI на среде с казеином к EI на среде с фибрином и к EI на среде с фибриногеном, что позволяло судить об эффективности воздействия протеиназ того или иного штамма микромицета в отношении глобулярных или фибриллярных белков, т.к. казеин относится к глобулярным белкам, а фибрин и фибриноген – к фибриллярным.

Таблица 6. Определение энзиматических индексов (EI) выделенных штаммов микромицетов на средах с фибрином, казеином и фибриногеном

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

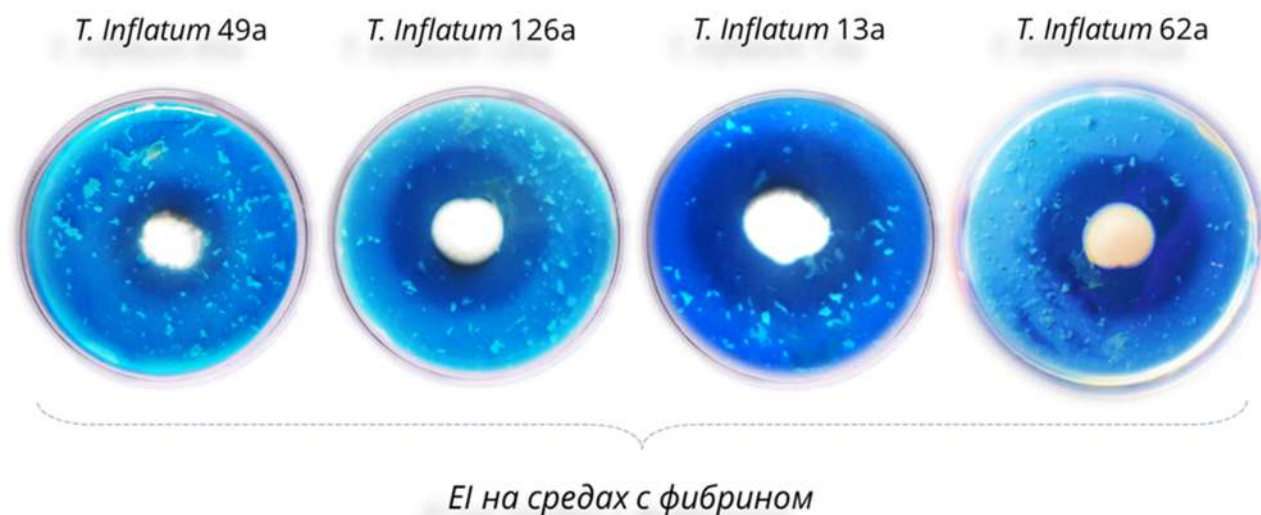


Рисунок 37. Определение энзиматического индекса (EI) на среде с фибрином для штаммов микромицетов *Tolypocladium inflatum* 49a, 126a, 13a, 62a

Для штаммов микромицетов *T. inflatum* 14a, *T. inflatum* 49a, *T. cylindrosporum* 150a значения энзиматического индекса на средах с фибрином, казеином и фибриногеном оказались сопоставимыми друг с другом. Можно предположить, что проявление протеолитической активности у данных продуцентов не связано со специфичностью образуемых ими протеиназ, они способны гидролизовать глобулярные и фибриллярные белки в равной степени.

Штамм *T. inflatum* 126a продемонстрировал большее сродство к глобулярным белкам, т.к. значения энзиматического индекса на среде с казеином превышали аналогичные значения для сред с фибрином и фибриногеном.

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

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

Дальнейшие эксперименты проводили с препаратами выбранных штаммов микромицетов.

3.1.4. Исследование препаратов, полученных из штаммов-изолятов

***Tolyprocladium* в экспериментах по тромболизису**

В результате исследования препаратов, полученных из штаммов-изолятов *Tolyprocladium*, в экспериментах по тромболизису, показана высокая тромболитическая активность в отношении фибриновых сгустков.

Согласно полученным экспериментальным данным среди препаратов микромицетов, выделенных в результате глубинного культивирования штаммов на ферментационной среде, содержащей в своем составе крахмал, наилучший тромболитический потенциал продемонстрировали препараты протеиназ, выделенные из культуральной жидкости штаммов *T. inflatum* 62а, *T. inflatum* 13а, *T. inflatum* 49а, а также референтного штамма *T. inflatum* k1 с итоговыми показателями степени тромболизиса – 78,9%, 76,6%, 74,8% и 80,9% соответственно. Наиболее низкое значение степени тромболизиса было зарегистрировано для штамма *T. inflatum* 126а, и оно составило 69,4% (рис. 38).

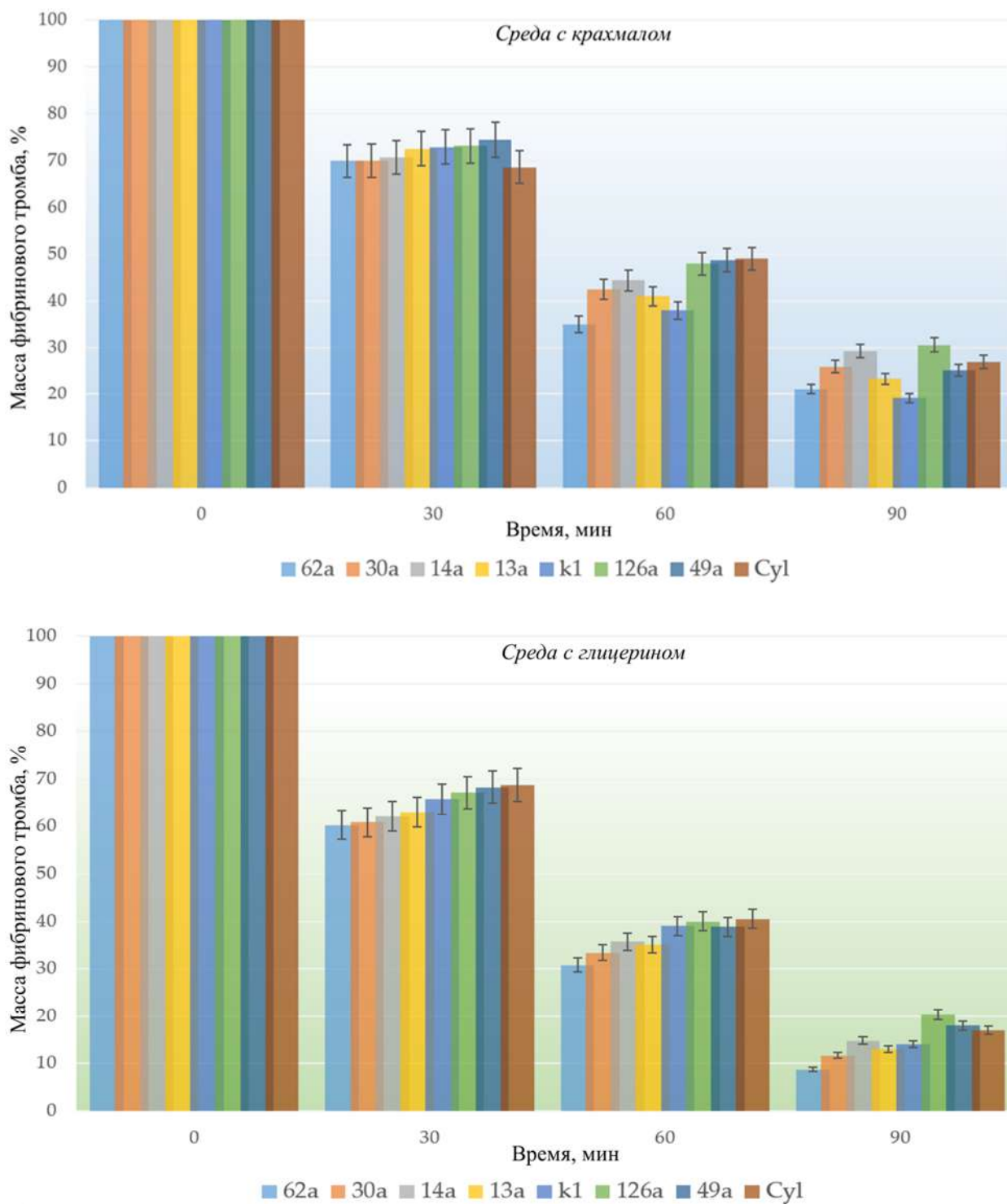


Рисунок 38. Определение степени тромболизиса препаратов-микровицетов на ферментационной среде с крахмалом и среде с глицерином

Препараты, полученные из штаммов-изолятов при культивировании на ферментационной среде, содержащей в своем составе глицерин, продемонстрировали более выраженный тромболитический эффект в

отношении фибриновых сгустков: в среднем степень тромболизиса данных препаратов была на 12,3% выше, чем препаратов, полученных в результате культивирования микромицетов на среде с крахмалом.

Наилучший тромболитический потенциал при культивировании микромицетов на среде с глицерином продемонстрировали препараты протеиназ, выделенные из культуральной жидкости штаммов *T. inflatium* 62a, *T. inflatium* 30a, *T. inflatium* 13a, а также референтного штамма *T. inflatium* k1 с итоговыми показателями степени тромболизиса – 91,3%, 88,3%, 87% и 86%, соответственно. Наиболее низкое значение степени тромболизиса было зарегистрировано также для штамма *T. inflatium* 126a, и оно составило 79,7%.

3.1.5. Изучение динамики накопления протеиназ, образуемых штаммами микромицетов

Динамику накопления протеиназ, образуемых изолятами рода *Tolypocladium* изучали на трех штаммах, препараты которых в ходе глубинного культивирования продемонстрировали наиболее высокие значения степени тромболизиса (рис. 39). Для экспериментов были отобраны штаммы – *T. inflatium* 13a, *T. inflatium* 30a и *T. inflatium* 62a. На рис. 39 представлены результаты эксперимента по определению фибринолитической и активаторной к плазминогену активности с нанесенными образцами культуральной жидкости исследуемых микромицетов, на вторые и пятые сутки культивирования. На рис. 40-42 представлены графики зависимости ключевых параметров культивирования, определяющих тромболитический потенциал протеиназ исследуемого штамма от времени (изменение содержания белка в культуральной жидкости, казеинолитическая активность, активность с хромогенным пептидным субстратом, фибринолитическая и активаторная к плазминогену активность).

Согласно полученным данным для штамма *T. inflatium* 62a максимумы фибринолитической и активаторной к плазминогену, а также максимум

протеолитических активностей совпадали по времени и приходились на пятые сутки, при этом не происходило значительного снижения концентрации белка, как у других микромицетов.

Штамм *T. inflatum* 30a продемонстрировал несколько большие значения фибринолитической, активаторной к плазминогену и протеолитической активности на шестые сутки, однако при этом наблюдался и значительный спад концентрации белка, фактически до аналогичных значений для первых суток культивирования, что значительно усложняет дальнейшие возможные исследования с данным штаммом и делает его менее перспективным для работы, поскольку гораздо сложнее нарабатывать необходимое количество препарата с высокими показателями тромболитической активности и на последующих стадиях работы с ним (на этапах выделения и очистки отдельных белковых фракций) неизбежны еще большие потери в концентрации белка.

Наименее подходящим штаммом из трех исследуемых для дальнейшей работы в контексте поиска наиболее оптимального продуцента тромболитических препаратов оказался штамм *T. inflatum* 13a. До третьих суток он фактически не проявлял тромболитических свойств. Помимо этого, не было отмечено наличие явных пиков фибринолитической, активаторной к плазминогену и протеолитической активности. Значения данных показателей уступали аналогичным значениям для *T. inflatum* 62a и *T. inflatum* 30a.

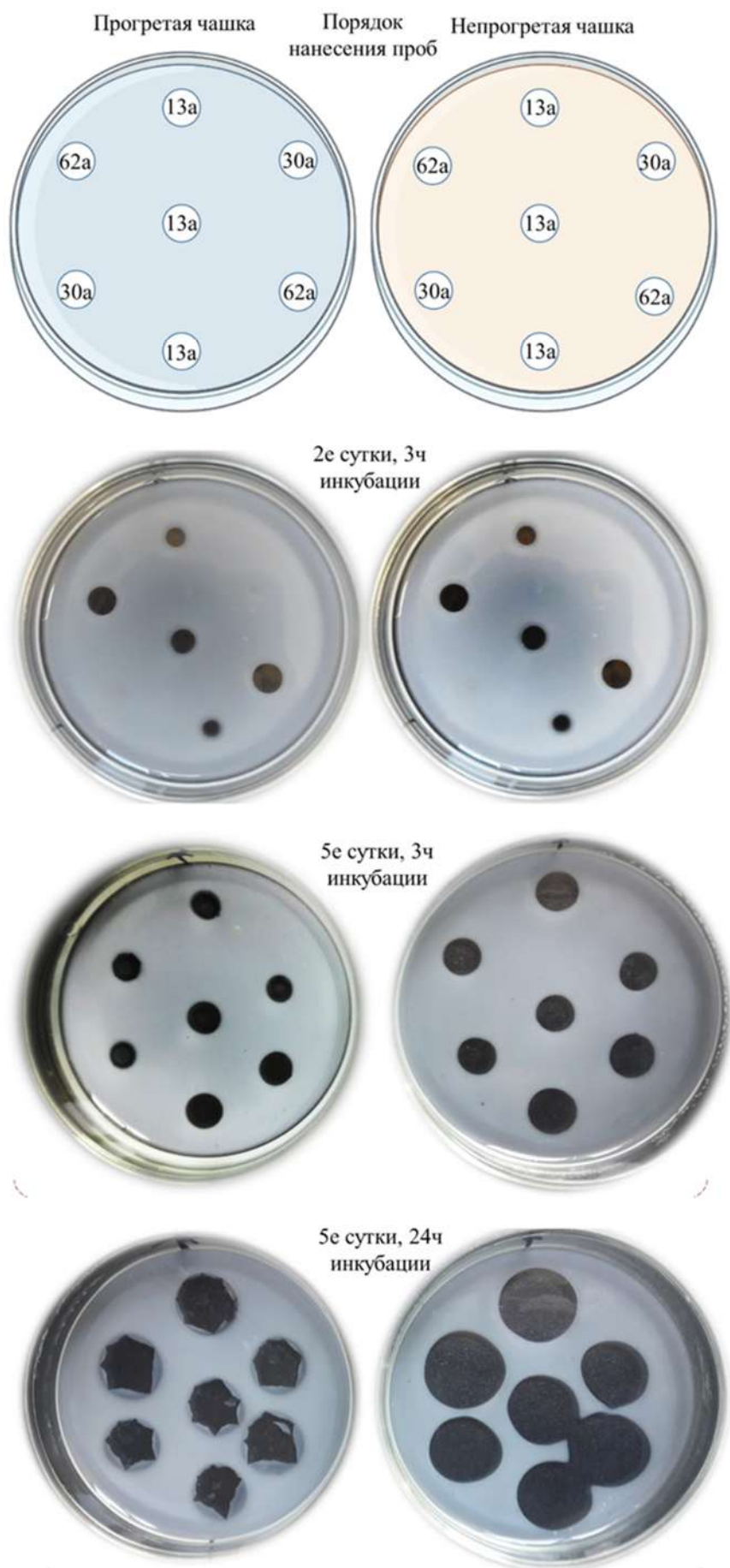


Рисунок 39. Исследование динамики накопления протеиназ штаммами-микровицетами

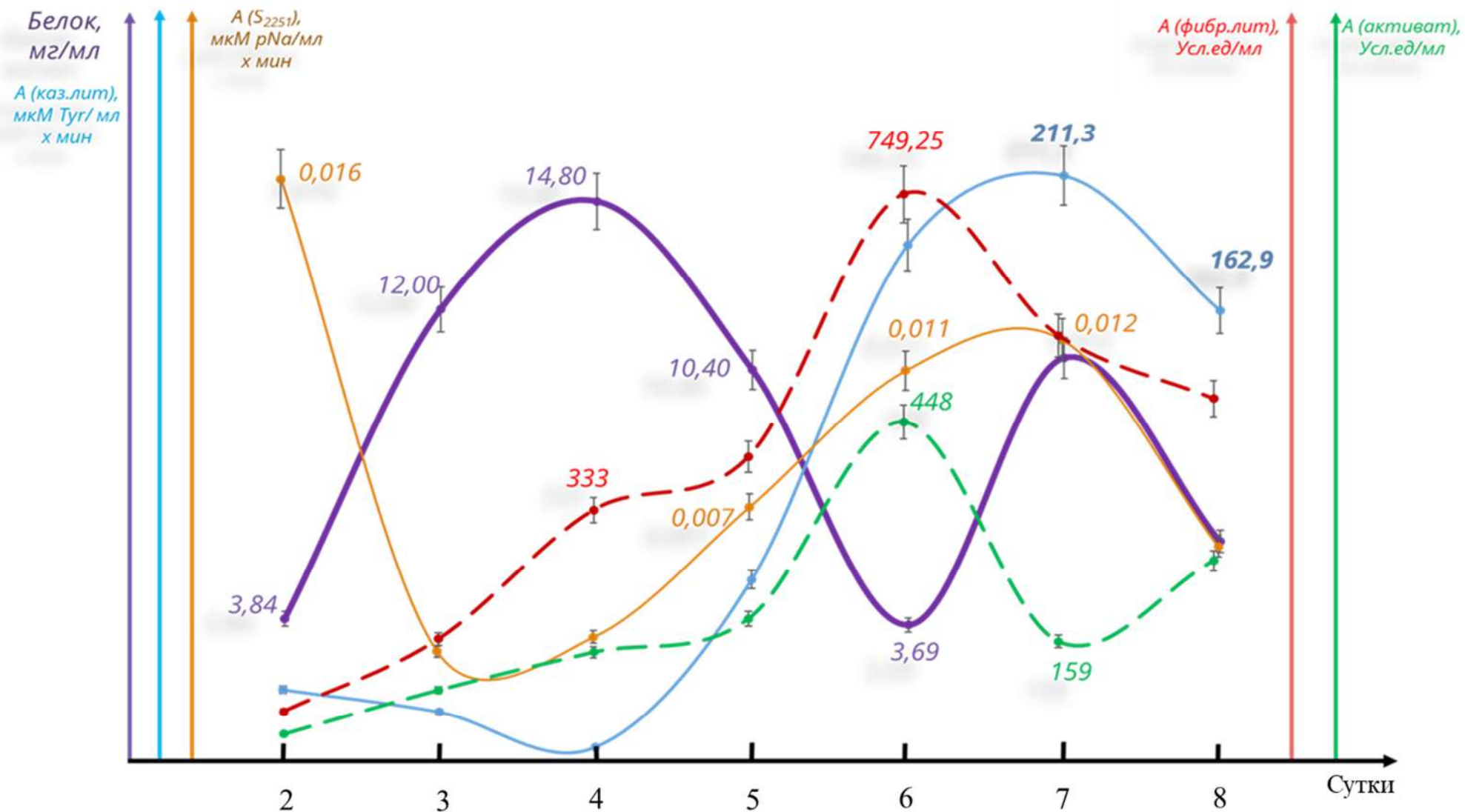


Рисунок 40. Исследование динамики накопления препаратов протеиназ у штамма *Tolypocladium inflatum* 30a

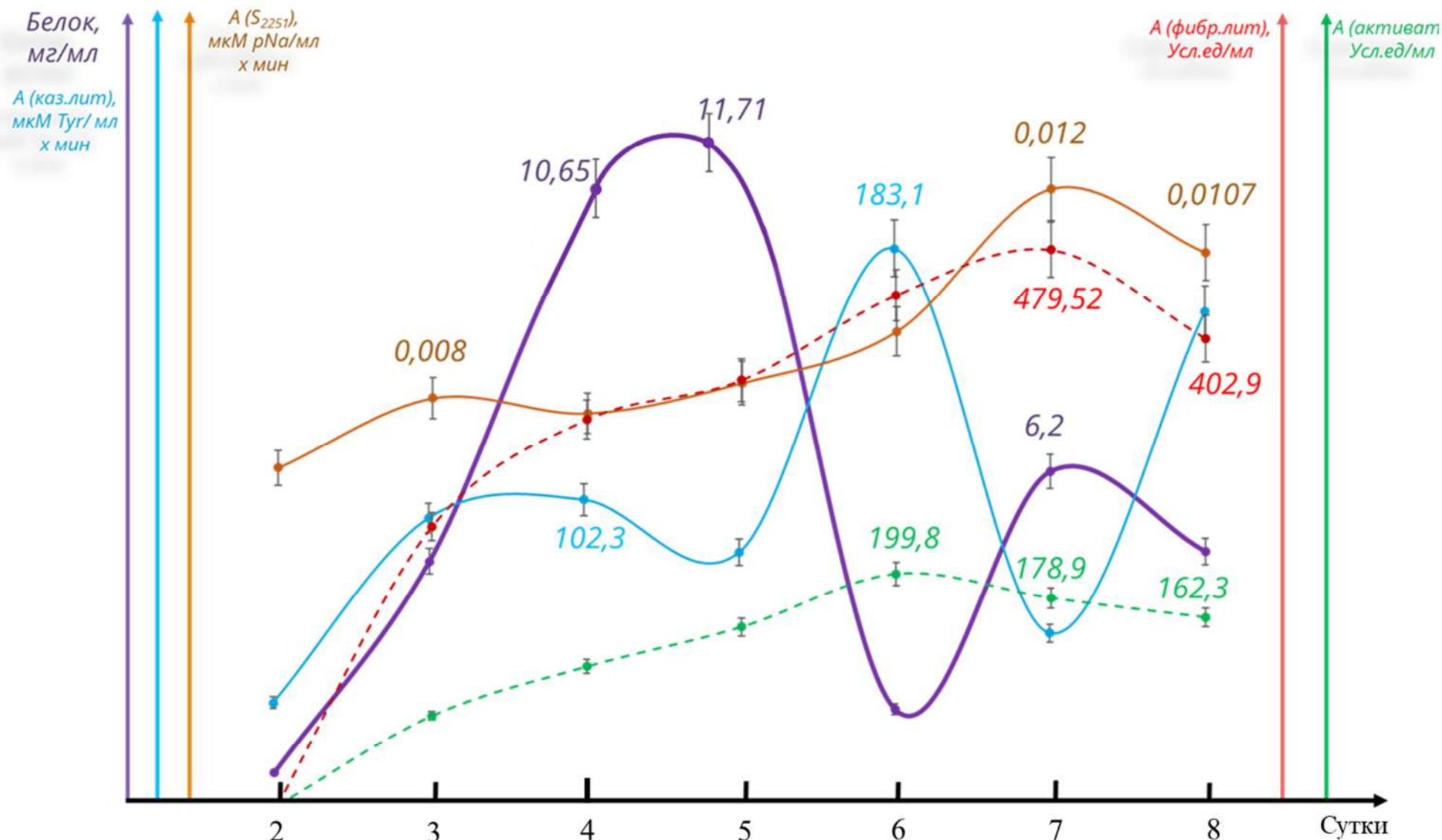


Рисунок 41. Исследование динамики накопления препаратов протеиназ у штамма *Tolypocladium inflatum* 13a

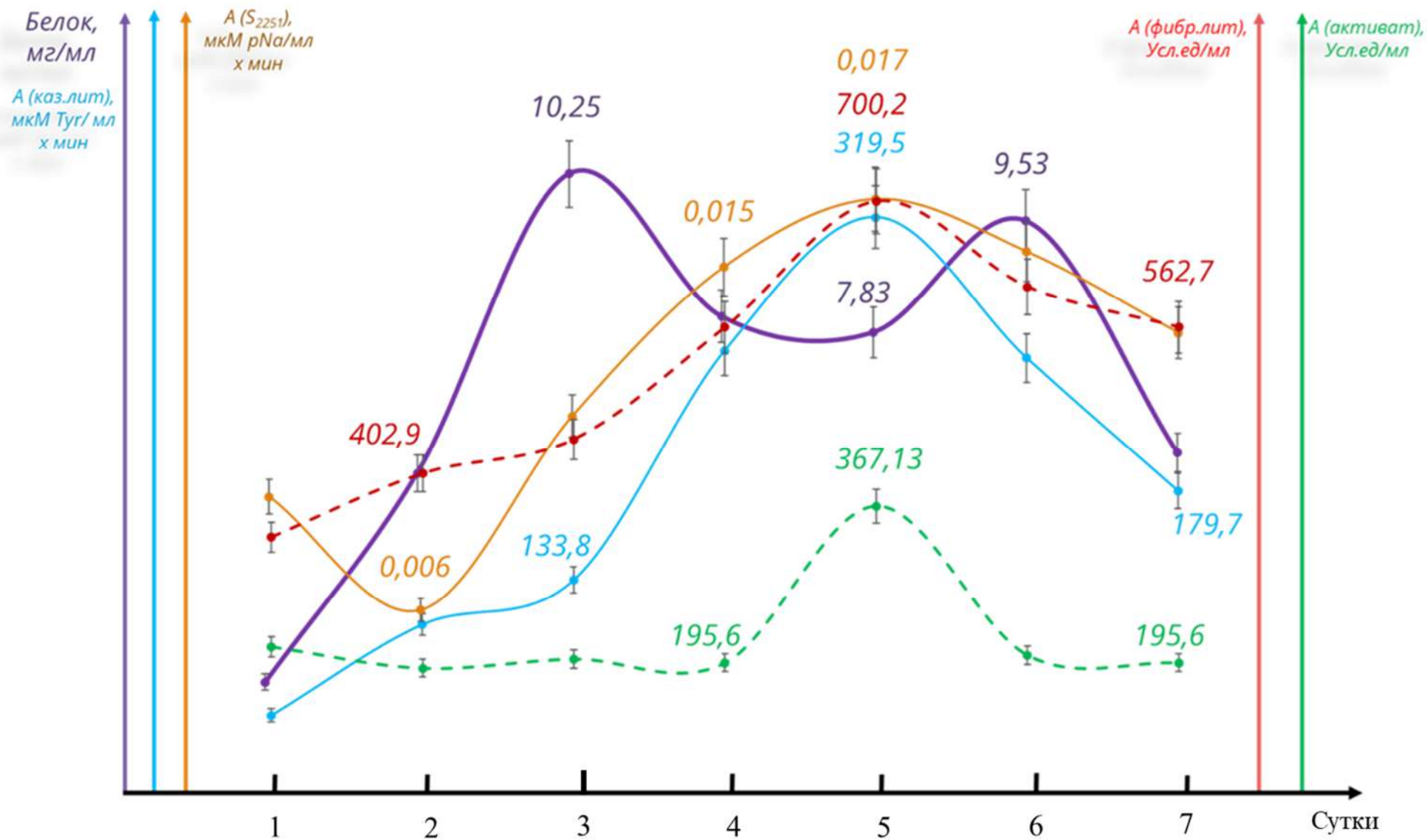


Рисунок 42. Исследование динамики накопления препаратов протеиназ у штамма *Tolyprocladium inflatum* 62a

При инкубации культуральной жидкости штаммов-изолятов на фибриновых чашках в течение более продолжительного промежутка времени (24 ч, а не 3 ч) наблюдали постепенное увеличение площади зоны лизиса в среднем в 3 и более раз, что приводило к практически полному лизису фибринового геля, как на непрогретых чашках, так и на прогретых и выражалось в т.н. «тромболитическом эффекте» протеиназ культуральной жидкости микромицетов. Наиболее выраженным данный эффект был для штамма микромицета *T. inflatum* 62a – площадь зоны лизиса через 24 ч увеличилась в 3,4 раза по сравнению с результатами измерения зоны лизиса через 3 ч.

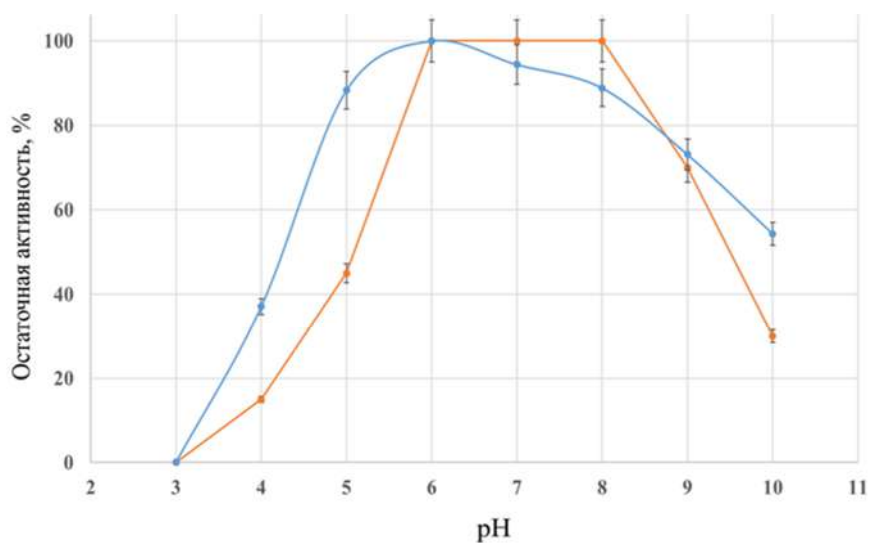
3.1.6. Определение температурного и рН-оптимумов, а также оптимумов термо- и рН-стабильности препарата протеиназ штамма *Tolypocladium inflatum* 62a

Определение температурного оптимума активности исследуемого препарата протеиназ *T. inflatum* 62a выявило, что препарат проявлял активность в интервале температур 25-55°C. Максимальную активность препарата наблюдали при 35-37°C, т.е. температуре, соответствующей физиологическим условиям в кровотоке человека. При температуре 65°C и более активность препарата практически отсутствовала.

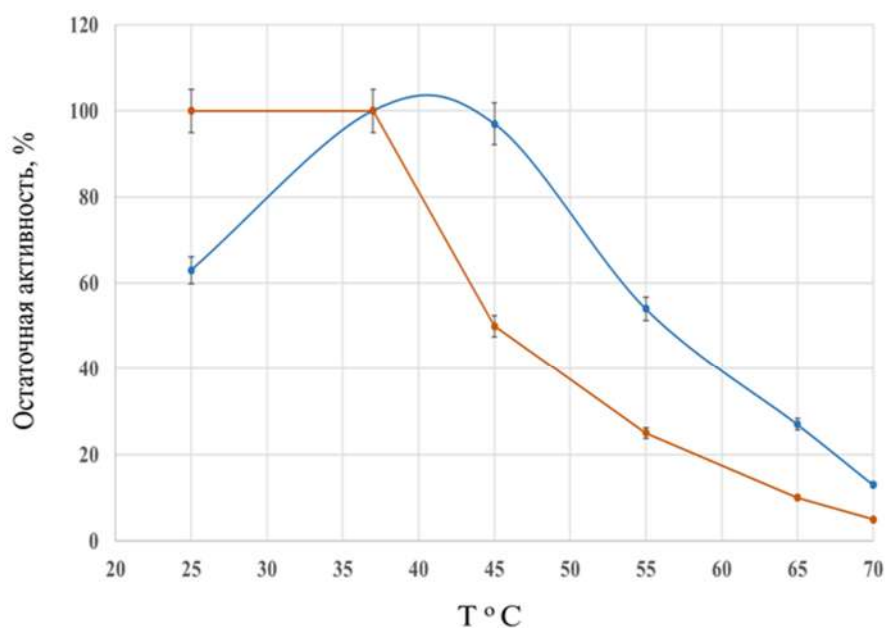
Изучение термостабильности исследуемого препарата показало, что он сохранял активность при температуре от 25 до 37°C в течение 2 ч. При температуре 45°C активность значительно снижалась (на 50%) и полностью отсутствовала при 65°C (снижение на 90%) (рис. 43).

Определение зависимости активности препарата протеиназ *T. inflatum* 62a от рН показало, что он проявляет активность в интервале рН от 4.0 до 8.5. При более низких значениях рН – 3.0 и ниже препарат был неактивен, в щелочных условиях при рН 11.0 – практически полностью инактивировался. Максимальное значение активности наблюдали при рН 6.0-7.0.

Препарат был стабилен в интервале рН 6.0-8.0 в течение 2 ч, сохраняя 100% активности фермента. При рН 9.0 за то же время активность сохранялась лишь на 45% (рис. 43).



А



Б

Рисунок 43. Влияние рН (А) и температуры (Б) на активность (синий график) и стабильность (оранжевый график) препарата протеиназ, образуемого микровицетом *Tolyposcladium inflatum* 62a

Таким образом, согласно полученным экспериментальным данным, оптимум действия протеиназ препарата *T. inflatum* 62a находится в пределах физиологических параметров крови человека ($T - 36,6^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} \sim 7,5$).

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

Для разделения комплексного препарата белков, образуемых микромицетом *T. inflatum* 62a, использовали метод изоэлектрофокусирования (ИЭФ) в интервале pH амфолинов 2,5-10,0. В результате ИЭФ препарата белков (удельная протеолитическая активность – $2,3 \text{ E/мл} \times 10^{-3}$), полученного после глубинного культивирования (рис.44), было обнаружено, что фракции, обладающие максимальными значениями искомых типов активности – фибринолитической, активаторной к плазминогену и казеинолитической сходили с колонки единым пиком и имели изоэлектрическую точку pI 5,65-5,85. Дальнейшие эксперименты проводили с фракцией препарата №13 ($\text{pI} - 5,75$), значения тромболитической активности которой были максимальны.

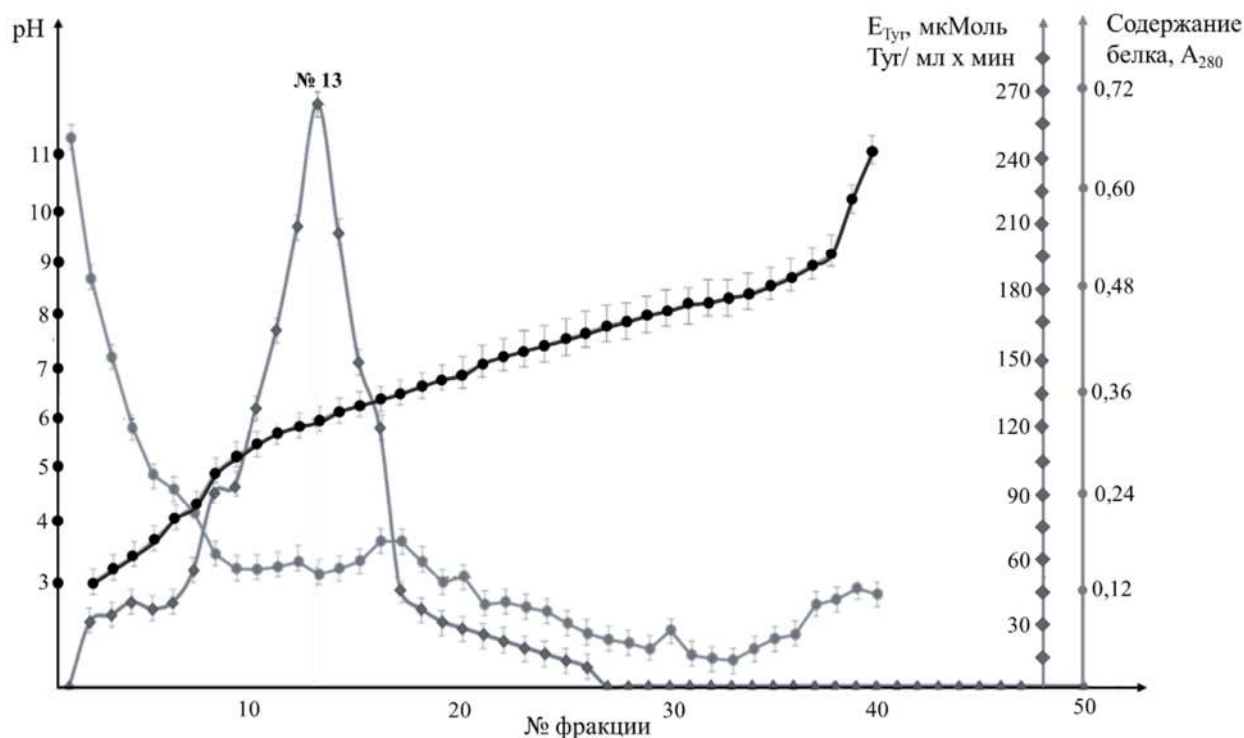


Рисунок 44. Изоэлектрофокусирование препарата *Tolypocladium inflatum* 62a

Для фракции №13 (рН – 5,74) удельная протеолитическая активность составила $0,78 \text{ Е/мл} \times 10^{-3}$. Фибринолитическая и активаторная к плазминогену активности, определенные для фракции №13, оказались выше, чем для аналогичных параметров препарата протеиназ и культуральной жидкости, и составили для данной фракции значения 597 усл. ед./мг и 413 усл. ед./мг белка соответственно.

Также специфическую протеолитическую активность фракции №13 исследовали в экспериментах с хромогенными субстратами. Результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7. Активность внеклеточных протеиназ *Tolypocladium inflatum* 62a по отношению к белкам системы гемостаза человека

Хромогенный субстрат:	Активность	Удельная активность, Е/мл $\times 10^{-3}$ *	
		Препарат	Фракция 13
pGlu-Gly-Pro-Arg-pNa	Урокиназная	1,7	0
Tos-Gly-Pro-Arg-pNa	Тромбиноподобная	2,42	-
dVal-Leu-Lys-pNa	Плазминоподобная	5,93	27,21
HD-Ile-Pro-Arg-pNa	Фактор Ха-подобная	1,07	0
Z-D-Arg-Gly-Arg-pNa	Сериновых протеаз	2,20	-
Z-Ala-Ala-Leu-pNa	Субтилизин-подобная	3,11	14,01
Suc-Ala-Ala-Ala-pNa	Эластазная	0,87	-
Bz-Arg-pNa	Трипсиноподобная	0,30	0
For-Ala-Phe-Lys-pNa	Плазминоподобная	3,34	8,8

* Знаком (-) отмечены случаи, когда активность не определялась

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

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

Определение углеводного компонента методом дот-блоттинга с помощью реакции на гликопротеины в изучаемой пиковой фракции после ИЭФ показало, что протеиназы, входящие в состав фракции №13, не гликозилированы (рис. 45). Отсутствие данной посттрансляционной модификации позволяет рассматривать потенциальную возможность клонирования и экспрессии гена, кодирующего образование протеиназы, в прокариотических клетках (Попова и др., 2015).

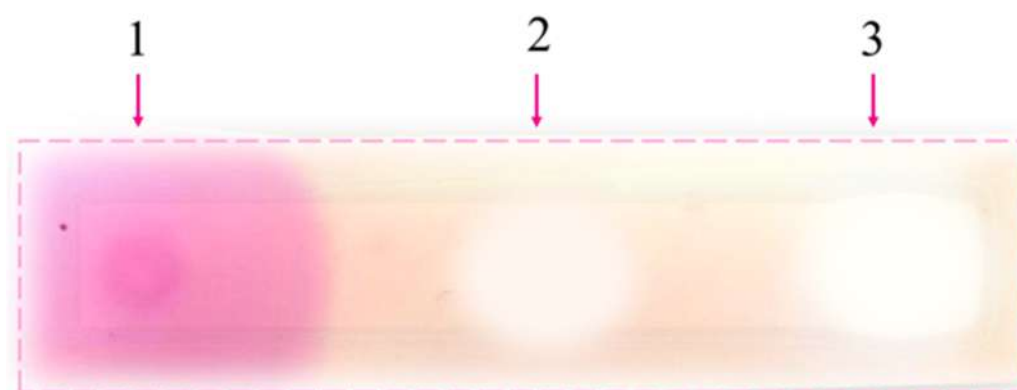


Рисунок 45. Качественная реакция на гликопротеины, стрелками обозначены:

1 – положительный контроль – инвертаза, 2 – фракция №13, 3 – отрицательный контроль – БСА

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

По результатам экспериментов по свертываемости фибриногена человека и быка, а также в аналогичных экспериментах с плазмой человека и плазмой кролика, в пиковой фракции после ИЭФ (№ 13) не наблюдали наличие фибринового волокна по сравнению с контролем (при добавлении тромбина). На основании этого можно заключить, что в пиковой фракции отсутствовала коагулазная активность, что является характерным для любых фибринолитических препаратов (табл. 8).

Таблица 8. Исследование коагулазной активности с фибриногеном и с плазмой

Проба	Реакция (фибриноген быка)	Реакция (фибриноген человека)	Плазма кролика	Плазма человека
Фракция № 13 после ИЭФ	–	–	–	–
Контроль (тромбин)	+	+	+	+

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

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

3.2.1. Культивирование штамма-ближайшего аналога *Tolyposcladium inflatum* k1, получение препарата протеиназ

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

3.2.2. Исследование препарата, полученного из культуральной жидкости штамма *Tolyposcladium inflatum* k1, в экспериментах по тромболизису

Тромболитический потенциал белкового препарата, полученного из культуральной жидкости микромицета *T. inflatum* k1, анализировали в экспериментах по определению степени тромболизиса. В результате эксперимента через 30 мин лизис фибринового сгустка (уменьшение его массы под действием препарата) составил 32,1%, через 60 мин – 68,6%, а через 90 мин – 91,3% (табл. 9). Данные показатели позволяют говорить в целом о высокой тромболитической активности препарата.

Таблица 9. Определение тромболитического потенциала препарата протеиназ *Tolypocladium inflatum* k1 в экспериментах с лизисом фибринового сгустка

Изначальная масса фибринового сгустка (М), гр:	М через 30 мин после добавления препарата, гр:	М через 60 мин после добавления препарата, гр:	М через 90 мин после добавления препарата, гр:	Степень тромболизиса, %:
0,113 ± 0,005	0,076 ± 0,005	-	-	32,1 ± 4,42
0,115 ± 0,003	-	0,036 ± 0,003	-	68,6 ± 2,60
0,117 ± 0,002	-	-	0,011 ± 0,002	91,3 ± 1,71

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

Определение температурного оптимума активности исследуемого препарата протеиназ *T. inflatum* k1 выявило, что препарат проявлял активность в интервале температур 20-65°C (рис. 46). Максимальную активность препарата наблюдали при 37°C, т.е. температуре, соответствующей физиологическим условиям в кровотоке человека. При температуре 65°C активность препарата практически отсутствовала.

Изучение термостабильности исследуемого препарата показало, что препарат сохранял активность при температуре от 25 до 37°C в течение 2 ч. При температуре 45°C активность значительно снижалась (на 55%) и полностью отсутствовала при 65°C.

Определение зависимости активности препарата протеиназ *T. inflatum* k1 от рН показало, что он проявляет активность в интервале рН от 3.5 до 10.5. При более низких значениях рН – 3.0 и ниже препарат не был активен, в щелочных условиях при рН 11.0 – практически полностью инактивировался. Максимальное значение активности наблюдали при рН 8.0 (рис. 46). Препарат

был стабилен в интервале рН 6.5-8.5 в течение 2 ч, сохраняя 100% активности фермента. При рН 9.0 за то же время активность сохранялась лишь на 45%.

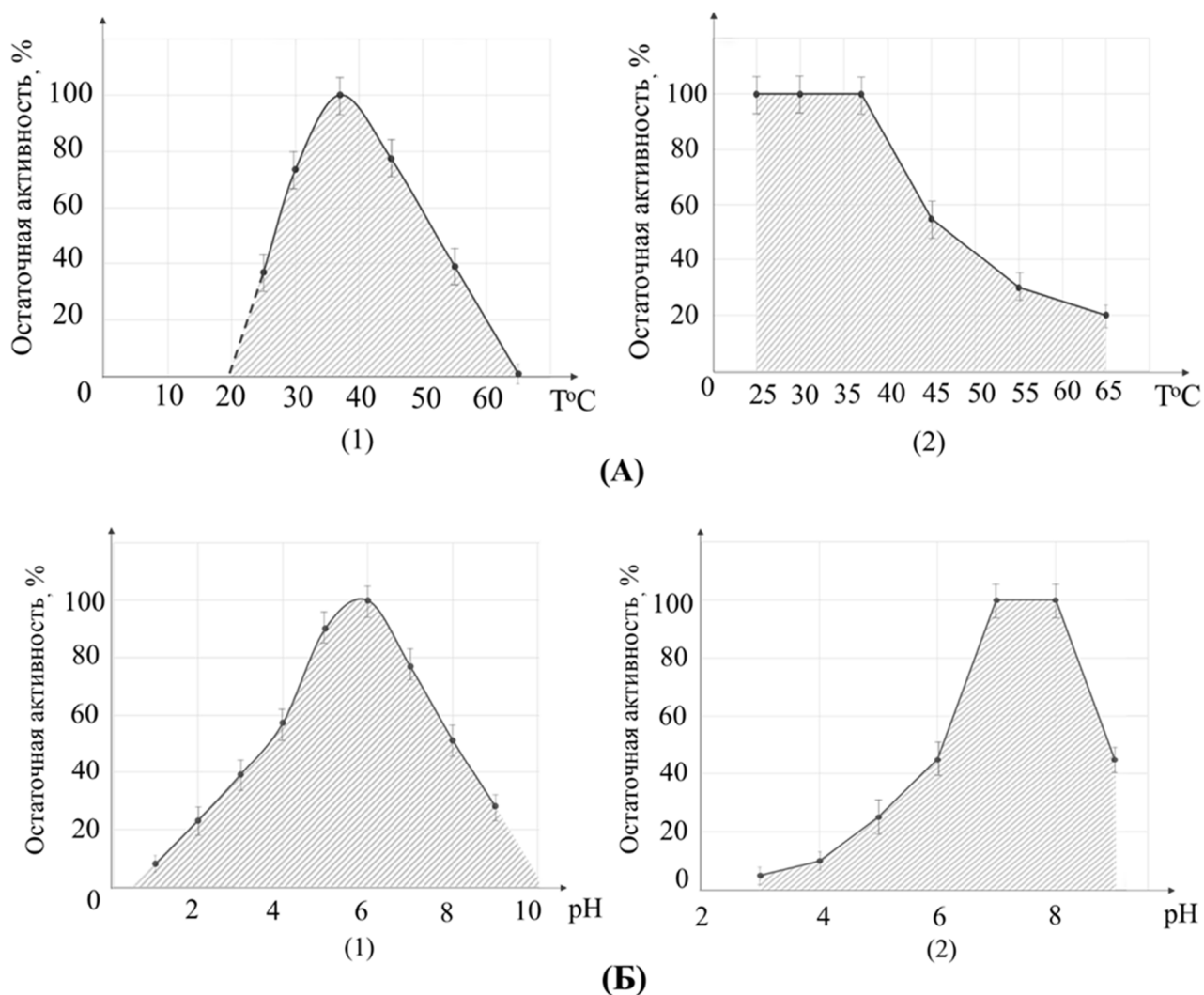


Рисунок 46. Влияние температуры (А) и рН (Б) на активность (1) и стабильность (2) препарата протеиназ, образуемого микромицетом

Tolypocladium inflatum k1

Таким образом, согласно полученным экспериментальным данным, оптимум действия протеиназ, входящих в состав препарата *T. inflatum* k1 находится в пределах физиологических параметров крови человека (Т – 36,6°C, рН ~ 7,5), что также характерно для препаратов внеклеточных протеиназ других микромицетов, например, для *Aspergillus terreus* (Звонарева и соавт., 2018) и *Sarocladium striatum* (Корниенко и соавт., 2020).

3.2.4. Фракционирование препарата протеиназ культуральной жидкости штамма *Tolypocladium inflatum* k1 методом изоэлектрофокусирования

Протеиназы, активные в отношении белков системы гемостаза, были выделены из белкового препарата микромицета *T. inflatum* k1 по результатам проведения ИЭФ на колонке и соответствовали трем пиковым фракциям №24, 28, 53 (рис. 47). Для фракции №24 (pH – 5,9) удельная протеолитическая активность составила $0,2 \text{ Е/мл} \times 10^{-3}$, для фракции №28 (pH – 6,8) – $0,35 \text{ Е/мл} \times 10^{-3}$, а для фракции №53 (pH – 10,7) – $0,86 \text{ Е/мл} \times 10^{-3}$.

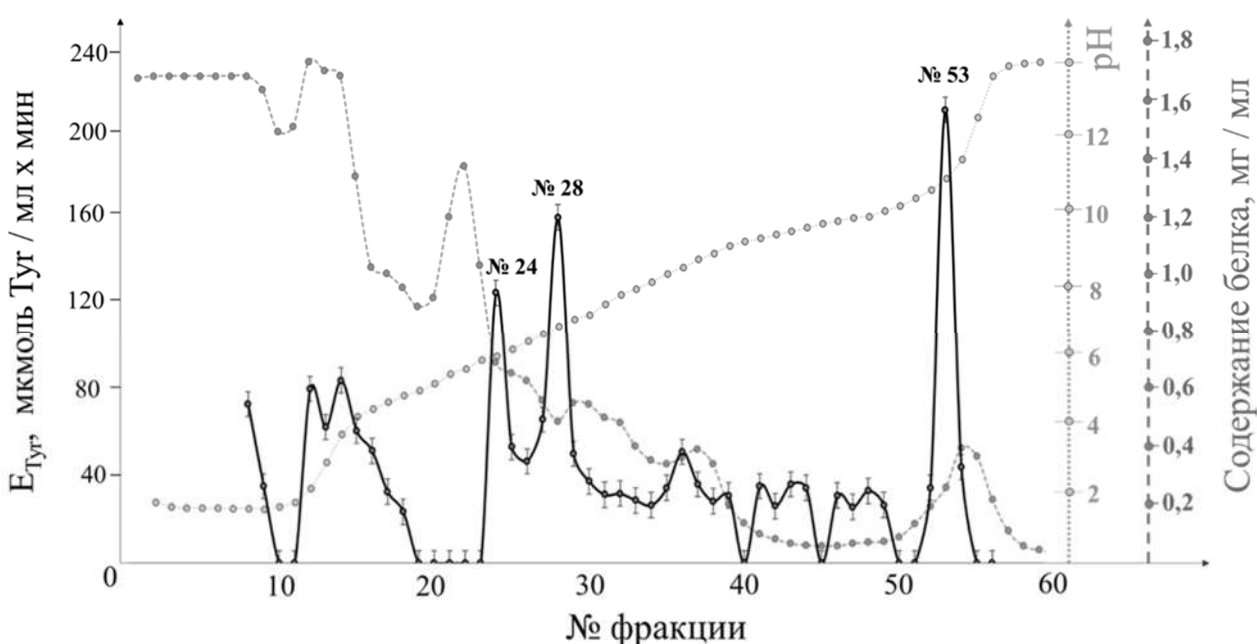


Рисунок 47. Изоэлектрофокусирование препарата *Tolypocladium inflatum* k1

Далее в культуральной жидкости микромицета на 5-ые сутки культивирования, а также в препарате протеиназ, и в отдельных фракциях препарата, полученных после ИЭФ (№24, 28, 53), определяли фибринолитическую и активаторную к плазминогену активность. Результаты представлены на рис. 48.

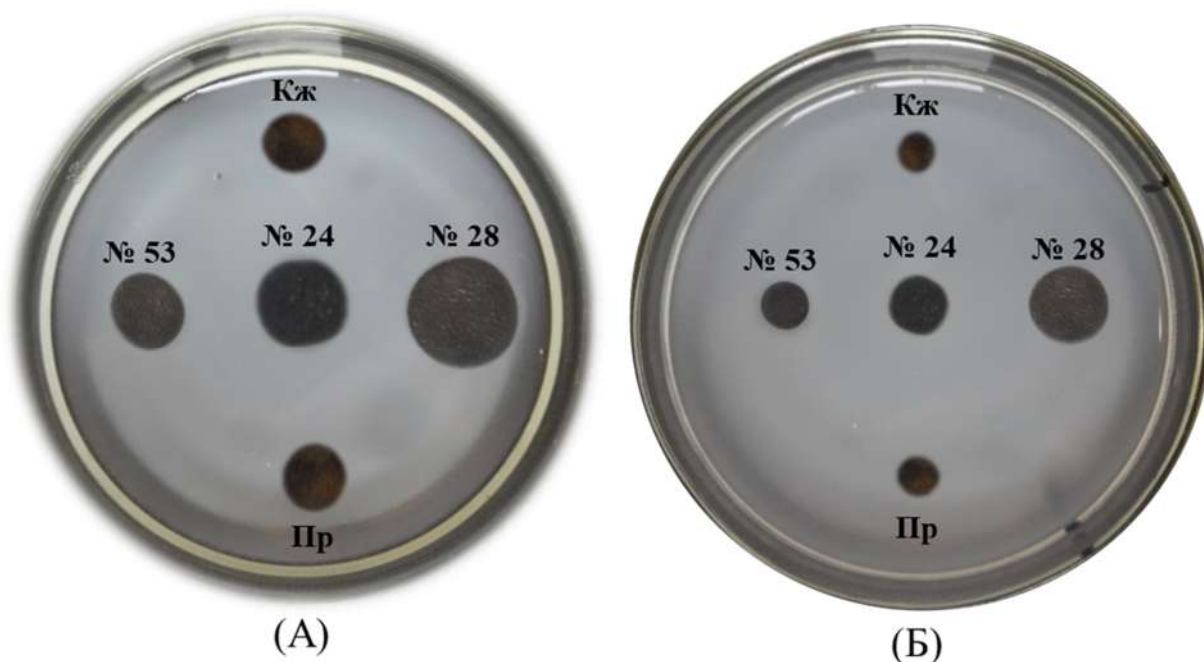


Рисунок 48. Фибринолитическая (А) и активаторная к плазминогену активность (Б) культуральной жидкости (Кж), а также препарата протеиназ, образуемого микромицетом *Tolyrocladium inflatum* k1 (Пр), а также отдельных фракций препарата, полученных после изоэлектрофокусирования (№ 24, 28, 53)

Белковый препарат обладал несколько более выраженной фибринолитической и активаторной к плазминогену активностью по сравнению с культуральной жидкостью, что согласуется с полученными ранее данными (Шаркова и др., 2016). В то же время во фракциях ИЭФ выявлена значительно более высокая фибринолитическая и активаторная к плазминогену активность. Максимальные значения наблюдались для фракций №28 (582 и 373 усл. ед./мг белка), №24 (481 и 180 усл. ед./мг белка) и №53 (255 и 91,5 усл. ед./мг белка), соответственно.

Способность к образованию микромицетом *T. inflatum* k1 внеклеточных протеолитических ферментов, обладающих активностью некоторых протеиназ системы гемостаза человека, была изучена по расщеплению

специфичных для протеиназ гемостаза хромогенных пептидных субстратов, как для препарата протеиназ, образуемого микромицетом, так и для отдельных пиковых фракций препарата, полученных после ИЭФ (№ 24, 28, 53). Результаты определения активности внеклеточных протеиназ исследованных микромицетов в отношении хромогенных пептидных субстратов протеиназ системы гемостаза приведены в таблице 10.

Таблица 10. Активность внеклеточных протеиназ *Tolyocladium inflatum* k1 по отношению к белкам системы гемостаза человека

Хромогенный субстрат:	Активность	Удельная активность, Е/мл $\times 10^{-3}$ *			
		Препарат	Фракция 53	Фракция 24	Фракция 28
pGlu-Gly-Pro-Arg-pNa	Урокиназная	3,1	-	-	-
Tos-Gly-Pro-Arg-pNa	Тромбиноподобная	3,36	1,6	6,11	6,43
dVal-Leu-Lys-pNa	Плазминоподобная	4,46	3,24	7,25	10,6
HD-Ile-Pro-Arg-pNa	Фактор Ха-подобная	1,2	-	-	-
Z-D-Arg-Gly-Arg-pNa	Сериновых протеаз	2,3	-	-	-
Z-Ala-Ala-Leu-pNa	Субтилизин-подобная	4,77	33,5	6,15	11,33
Suc-Ala-Ala-Ala-pNa	Эластазная	18,5	3,3	10,1	19,3
Bz-Arg-pNa	Трипсиноподобная	1,1	0	1,0	0
For-Ala-Phe-Lys-pNa	Плазминоподобная	5,5	-	-	-

* Знаком (-) отмечены случаи, когда активность не определялась

Показано, что и препарат, и отдельные фракции после ИЭФ обладают протеолитической активностью и способны расщеплять использованные субстраты. Так, белковый препарат обладает выраженной субстратной специфичностью и способен расщеплять широкий спектр хромогенных субстратов, однако при этом его удельная активность ниже по сравнению с удельной активностью пиковых фракций в отношении отдельных субстратов.

В случае фракции №53 наблюдается высокая субтилизин-подобная активность – порядка $33,5 \text{ Е/мл} \times 10^{-3}$ при расщеплении субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNa. Для фракции №24 аналогично характерна субтилизин-подобная активность, а также отмечена выраженная тромбиноподобная, плазминоподобная и эластазная активности. В случае же фракции №28 можно наблюдать схожее действие в отношении аналогичных субстратов, но с несколько более выраженным эффектом для тромбиноподобной, плазминоподобной и субтилизин-подобной активностей по сравнению с фракцией №24 и значительно большую эластазную активность в отношении субстрата Suc-Ala-Ala-Ala-pNa, которая превосходит аналогичную активность препарата и составляет $19,3 \text{ Е/мл} \times 10^{-3}$.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о широкой субстратной специфичности препарата протеиназ *T. inflatum* k1 и узкой, но более высокой специфичности отдельных фракций препарата после ИЭФ (№24, 28, 53), т.к. они способны гидролизовать конкретные хромогенные пептидные субстраты протеиназ системы гемостаза.

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

Определение углеводного компонента методом дот-блоттинга с помощью реакции на гликопротеины в изучаемых пиковых фракциях после ИЭФ показало, что протеиназы, входящие в состав фракций №24 и №28, гликозилированы, а в составе фракции №53 – не гликозилированы (рис. 49). Отсутствие данной посттрансляционной модификации позволяет рассматривать потенциальную возможность клонирования и экспрессии гена, кодирующего образование протеиназы, в прокариотических клетках (Попова и др., 2015).

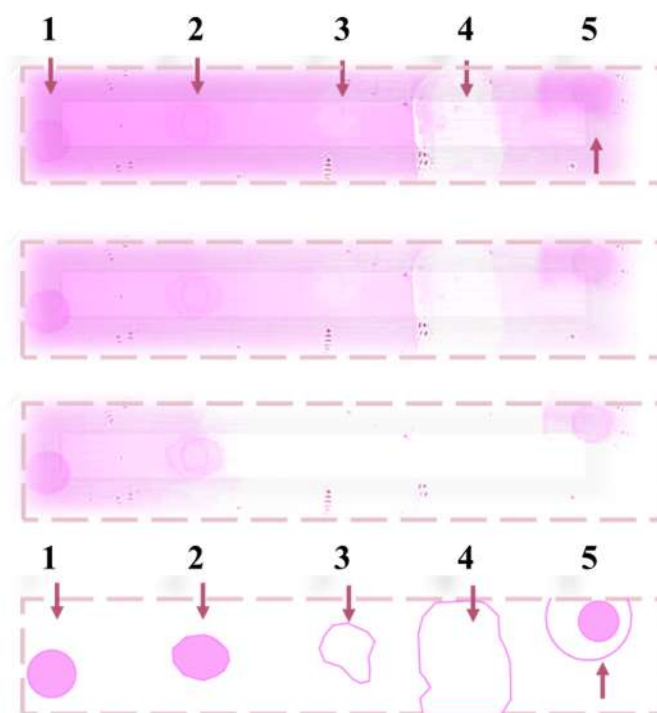


Рисунок 49. Качественная реакция на гликопротеины (показана одна и та же нитроцеллюлозная мембрана в разных контрастностях и схема расположения пятен (нижний ряд)), стрелками обозначены: 1 – фракция № 24; 2 – фракция № 28; 3 – фракция № 53; 4 – отрицательный контроль - БСА; 5 - положительный контроль – инвертаза

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

По результатам экспериментов по свертываемости фибриногена человека и быка – во всех пиковых фракциях после ИЭФ (№ 24, 28, 53) не наблюдали наличие фибринового волокна по сравнению с контролем (при добавлении тромбина). На основании этого можно заключить, что во всех пиковых фракциях коагулазная активность отсутствует, что является характерным для любых фибринолитических препаратов.

3.2.7. Электрофорез препаратов протеиназ, выделенных из культуральной жидкости штаммов-изолятов

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

На рис. 50 показано, что соотношение, количество и характер расположения полос у этих двух штаммов рода *Tolyposcladium* очень схожи, что, вероятно, может указывать также и на схожесть секретируемых в культуральную жидкость белков при глубинном культивировании, находящихся в составе полученных препаратов. Следует отметить, что профили полос на электрофореграмме в наибольшей степени совпадают с препаратом штамма *T. inflatum* 62a, полученным при глубинном культивировании микровицета на среде с глицерином.

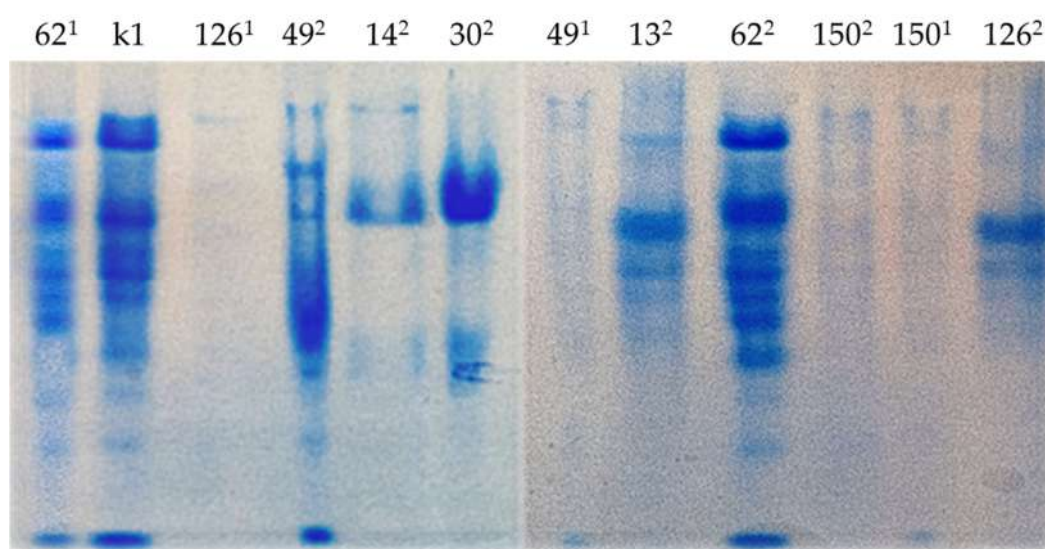


Рисунок 50. Электрофорез препаратов протеиназ штаммов рода *Tolyposcladium* по методу Дэвиса (1 – препарат получен на среде с крахмалом, 2 – с глицерином)

Кроме того, с препаратом протеиназ штамма *T. inflatum* 62a, полученном в результате культивирования на ферментационной среде с глицерином, также была получена зимограмма (рис. 51), на которой присутствует яркая полоса, подтверждающая наличие у препарата протеиназ выраженной энзиматической активности.

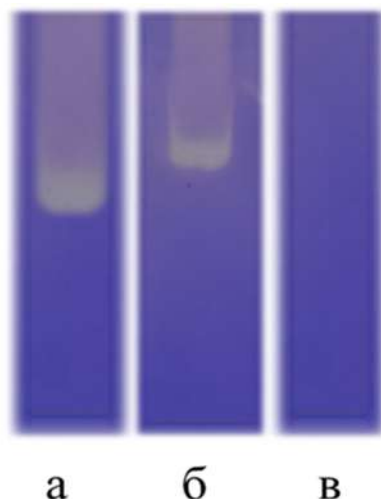


Рисунок 51. Наличие фибринолитической активности у препарата протеиназ штамма *Tolypocladium inflatum* 62a: на зимограмме: а – положительный контроль, б – фракция препарата *Tolypocladium inflatum* 62a, в – отрицательный контроль

3.3. Тромболитический потенциал микромицета *Tolypocladium inflatum* 62a для биотехнологического применения, терапии тромботических состояний и медицинской диагностики

Возможность применения препарата протеиназ микромицета *Tolypocladium inflatum* 62a или его отдельных фракций для терапии тромботических состояний и диагностики патологий системы гемостаза определялась по сопоставлению тромболитических свойств с ближайшим аналогом штаммом *Tolypocladium inflatum* k1, по оценке характера тромбодеструктивного эффекта в отношении фибринового геля, а также по

возможным путем вывода препарата на рынок и биоэкономических моделей коммерциализации полученного штамма.

3.3.1. Сопоставление свойств препаратов протеиназ и отдельных фракций микромицетов *Tolypocladium inflatum* 62a и *Tolypocladium inflatum* k1

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

Тромболитический потенциал препаратов

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

Физико-химические оптимумы препаратов

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

Фракции после ИЭФ, обладающие тромболитическим потенциалом и их свойства

После ИЭФ из препарата протеиназ *T. inflatum* 62 была выделена одна пиковая фракция, перспективная с точки зрения тромболитического потенциала, в случае *T. inflatum* k1 были выделены три соответствующих фракции.

Сравнение свойств фракций штаммов-продуцентов представлено в таблице 11. В качестве сравнения у *T. inflatum* k1 была выбрана фракция, соответствующая номеру №53, обладающая наибольшими значениями фибринолитической и активаторной к плазминогену активностями среди всех трех выделенных фракций.

Таблица 11. Сравнение фракций после изоэлектрофокусирования препаратов штаммов *Tolyrocladium inflatum* 62a и *Tolyrocladium inflatum* k1

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

Согласно полученным данным, фракция №13 препарата *T. inflatum* 62a демонстрирует большие значения фибринолитической и активаторной к плазминогену активности, чем фракция №53, для которой в случае препарата *T. inflatum* k1 отмечаются наиболее высокие показатели данных активностей среди ранее исследованных представителей рода *Tolyposcladium*. Изоэлектрическая точка фракции №13 находится по своему значению ближе к физиологическому значению рН крови, что позволяет предположить большую эффективность данной фракции для тромботерапии и большую перспективность применения именно этого штамма-продуцента для наработки тромболитических препаратов.

Для фракции №13 также отмечается высокая в сравнении с фракцией №53 плазминоподобная активность, помимо этого, она также, как и №53, обладает субтилизин-подобной активностью. В отличие от фракции №13 для фракции №53 отмечается наличие тромбиноподобной и выраженной эластазной активности.

Обе фракции не являются гликозилированными и для них также нехарактерна коагулазная активность, что является оптимальным для тромболитических препаратов.

3.3.2. Тромболитический потенциал препаратов, вырабатываемых микромицетом *Tolyposcladium inflatum* 62a

Согласно полученным данным штамм микромицета *T. inflatum* 62a может быть использован в качестве перспективного продуцента тромболитических препаратов для создания новых лекарств или диагностических наборов на их основе.

С молекулярно-генетической точки зрения микромицеты вида *Tolyposcladium inflatum* наиболее известны, как продуценты циклоспорина, однако в недавних исследованиях также было показано, что данный вид продуцирует и другие биоактивные вторичные метаболиты, включая

инсектицидные соединения, такие как эфрапептины и толипин, дикетопиперазины и карбоксистерин. антибиотик эргоконин-С и другие ранее не исследованные классы ферментов (Khalidi et al., 2010), к которым могут относиться и соединения, обладающие тромболитической активностью. *T. inflatum* имеет большой потенциал для продукции вторичных метаболитов. Всего для данного микромицета было идентифицировано 38 генных кластеров, ответственных за синтез вторичных метаболитов (Bushley et al., 2013).

С точки зрения тромболитического потенциала штамм *T. inflatum* 62a продемонстрировал способность синтезировать тромболитические препараты, активные в отношении белков системы гемостаза. Препарат, выделенный из культуральной жидкости микромицета, после культивирования на среде с глицерином демонстрировал высокую тромболитическую активность в отношении фибриновых сгустков, будучи стабильным в физиологических интервалах значений температуры и pH. Фракция препарата, полученная после ИЭФ, проявляла высокую фибринолитическую и активаторную к плазминогену активность, превосходящую по своим значениям ближайший штамм-аналог *T. inflatum* k1. Также по изоэлектрической точке данная фракция находилась ближе к естественному pH крови и обладала помимо выраженной плазминоподобной, также и эластазной активностью, что говорит о высоком потенциале для ее применения с целью купирования тромботических состояний.

Другой уникальной особенностью, как препарата, так и фракции, полученной после ИЭФ, являлся т.н. «продолженный тромболитический эффект». Особенностью данного эффекта являлось то, что в течение 24 ч после взаимодействия препарата с фибриновым гелем происходил постепенный стабильно возрастающий лизис фибрина, который достигал максимума через сутки после аппликации вплоть до полного разрушения фибриновой пластины. Данный эффект не был характерным для препарата протеиназ

Tolypocladium inflatum k1 (в его случае полная терминация лизиса фибринового геля происходила в течение 3-4 ч после аппликации) (рис. 52).

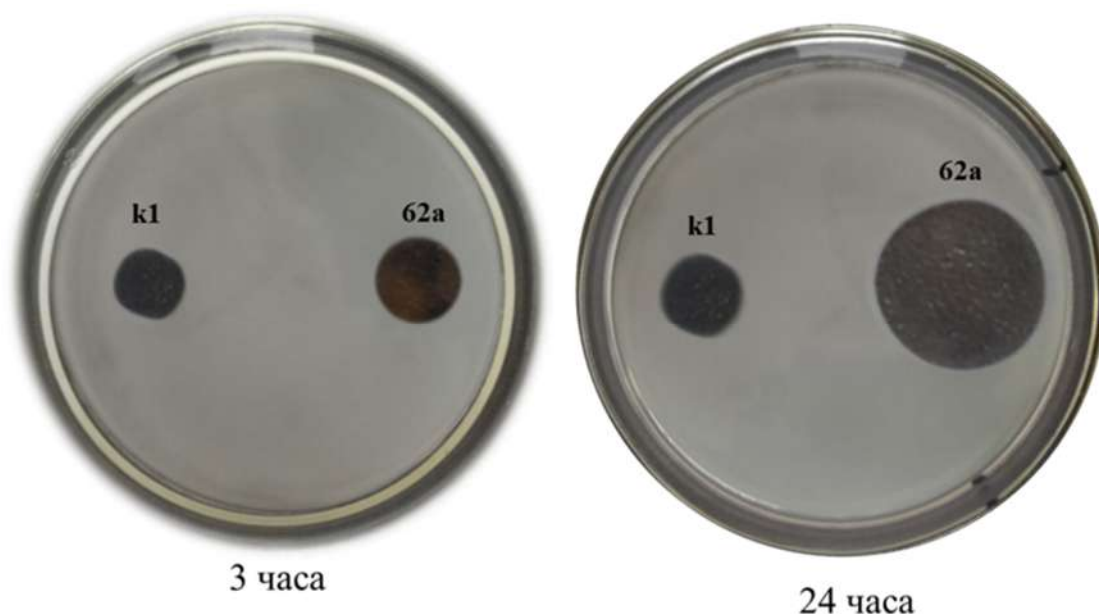


Рисунок 52. Тромболитический эффект препаратов микромицетов *Tolypocladium inflatum* k1 и *Tolypocladium inflatum* 62a через 3 и 24 ч после аппликации на фибриновый гель

Подобный эффект может найти применение в препаратах пролонгированного действия как при наружном использовании в составе гелей против гематом и раневых повязок, так и в случаях, требующих длительного применения тромболитического средства при профилактике тяжелых тромботических состояний в организме (ТЭЛА и инфаркта миокарда), позволяя значительно сократить количество вводимого препарата, тем самым уменьшая риск кровотечений при использовании.

Применение тромболитических препаратов для наружного применения возможно, например, в комбинации с гепарином для повышения стабильности препарата и увеличения тромболитического эффекта. Особенно актуальным это может быть в случае терапии тромбозов глубоких и поверхностных вен конечностей, флеботромбозов и тромбофлебитов. Так, например, подобный

подход применялся для препарата внеклеточных протеиназ микромицета *Arthrobotrys longa* – лонголитина. Опыты *in vitro* и *in vivo* показали, что гепарин в сочетании с лонголитином не только проявляет свойственную ему антикоагулянтную активность, но и ускоряет время тромболизиса. Сам лонголитин, кроме фибринолитического действия, обладает широким спектром антикоагулянтной активности, во-первых, снижая агрегацию тромбоцитов *in vitro* и *in vivo*, во-вторых, ингибируя гемостаз в плазме *in vivo* в присутствии гепарина (Шаркова, 2014). Механизм наружного применения основан на способности лонголитина проникать через эпидермис и подлежащие мягкие ткани в систему микроциркуляции и системный кровоток и вызывать адекватные физиологические и биохимические реакции (Подорольская, 2002).

Продемонстрированные препаратом штамма *T. inflatum* 62a фибринолитические и активаторные к плазминогену свойства могут найти применение для диагностики патологий системы гемостаза. Существующие на рынке диагностические наборы предполагают использование тромболитического агента в своем составе (например, «Ренам-плазминоген») и отличаются достаточно высокой стоимостью за одно исследование. Использование препарата *T. inflatum* 62a в качестве тромболитического агента может позволить снизить стоимость набора за счет более простого и менее затратного процесса наработки препарата.

3.3.3. Пути коммерциализации тромболитического препарата протеиназ *Tolypocladium inflatum* 62a

В концепции коммерциализации биотехнологических разработок, как правило, существует несколько возможных путей для выхода фармацевтической субстанции (препарата протеиназ *T. inflatum* 62a) на биомедицинский рынок. Одним из основополагающих критериев для этого является наличие защищенной интеллектуальной собственности. В случае

возможных путей для осуществления охраны полученных результатов интеллектуальной деятельности, включающие патентование штамма продуцента, субстанции (препарата тромболитического ферментного комплекса), способа получения субстанции, способов терапии и различные применения субстанции, фармацевтической композиции, включающей субстанцию, фармацевтических комбинаций с другими тромболитическими лекарственными препаратами (например, с лонголитином), а также диагностические наборы и способы диагностики патологических состояний системы гемостаза человека или других млекопитающих. На текущий момент получен патент в РФ на способ определения тромболитического потенциала микромицетов, в том числе подтверждающий высокий тромболитический потенциал штамма микромицета *Tolypocladium inflatum* 62a. Создание патентного ландшафта позволит реализовывать стратегию т.н. «зонтичного патентования» и коммерциализации, которая заключается в охране потенциально близких, сопряженных с главной разработкой результатов интеллектуальной деятельности (например, новых штаммов с разными биологическими свойствами одного и того же продуцента, фармацевтических композиций, сред для культивирования и др.) (Granstrand, 1999).

Что касается непосредственной биоэкономической реализации разработки, то существует два основных пути. Первый – создание полноценного коммерческого тромболитического препарата активатора плазминогена на основе протеиназ микромицета *T. inflatum* 62a. Второй – создание биомедицинской тест-системы, готового диагностического набора (диагностикума) на возможные патологии системы гемостаза (в частности, на патологии компонентов системы свертывания, противосвертывания и фибринолиза), которая могла бы помочь в процессе своевременной постановки диагноза и ускорить начало лечения.

Каждый из возможных вариантов подразделяется на отдельные стадии разработки, однако в случае создания диагностического набора на основе

исследуемого препарата, подобных стадий значительно меньше, т.к. в этом случае не происходит непосредственного воздействия препарата на организм человека и, следовательно, нет необходимости в проведении развернутых клинических испытаний.

Если рассматривать коммерциализацию препарата в качестве лекарственного средства, то можно прийти к следующим результатам (табл. 12, рис. 53):

Таблица 12. Оценка стоимости основных стадий реализации препарата протеиназ *Tolypocladium inflatum* 62a в качестве лекарственного средства

Параметр:		Затраченный объем инвестиций (млн. руб.)	Временные затраты (годы)	Стоимость разработки (млн. руб.)
Разработка и прототипирование		10	1	7
Доклинические исследования		30	1	14
Клинические исследования	I фаза	30	2	200
	II фаза	60	3	600
	III фаза	100	5	–
Регистрация препарата		15	5	–
Итоговые затраты		245	17	Более 800



Рисунок 53. Анализ теоретических затрат на каждую из стадий коммерциализации в случае реализации стратегии создания лекарственного средства (по данным коммерческих исследований, полученных от компаний Invitro, Гемакор и фонда Primer capital)

Данный вариант сопряжен с чрезвычайно высокими издержками с точки зрения больших финансовых затрат и значительных временных потерь на «прохождение» каждой стадии. Также стоит принимать во внимание, что проект, связанный с разработкой и продвижением лекарственного средства в инвестиционной среде будет иметь статус «венчурного», т.е. связанного с высокими финансовыми рисками. Тем не менее, стоит отметить, что согласно литературным данным у лекарства в области гематологии, по данным статистики, все же несколько больше шансов пройти клинические испытания, чем в любой другой области медицины.

При этом не маловажно, что показатель успешности возрастает очень значительно при переходе от первой фазы клинических испытаний ко второй

(с 26% до 57%), когда происходит проверка не только безопасности препарата на большем числе испытуемых, но и тестируется эффективность по отношению к заболеванию, на которое ориентировано лекарственное средство (рис. 54).

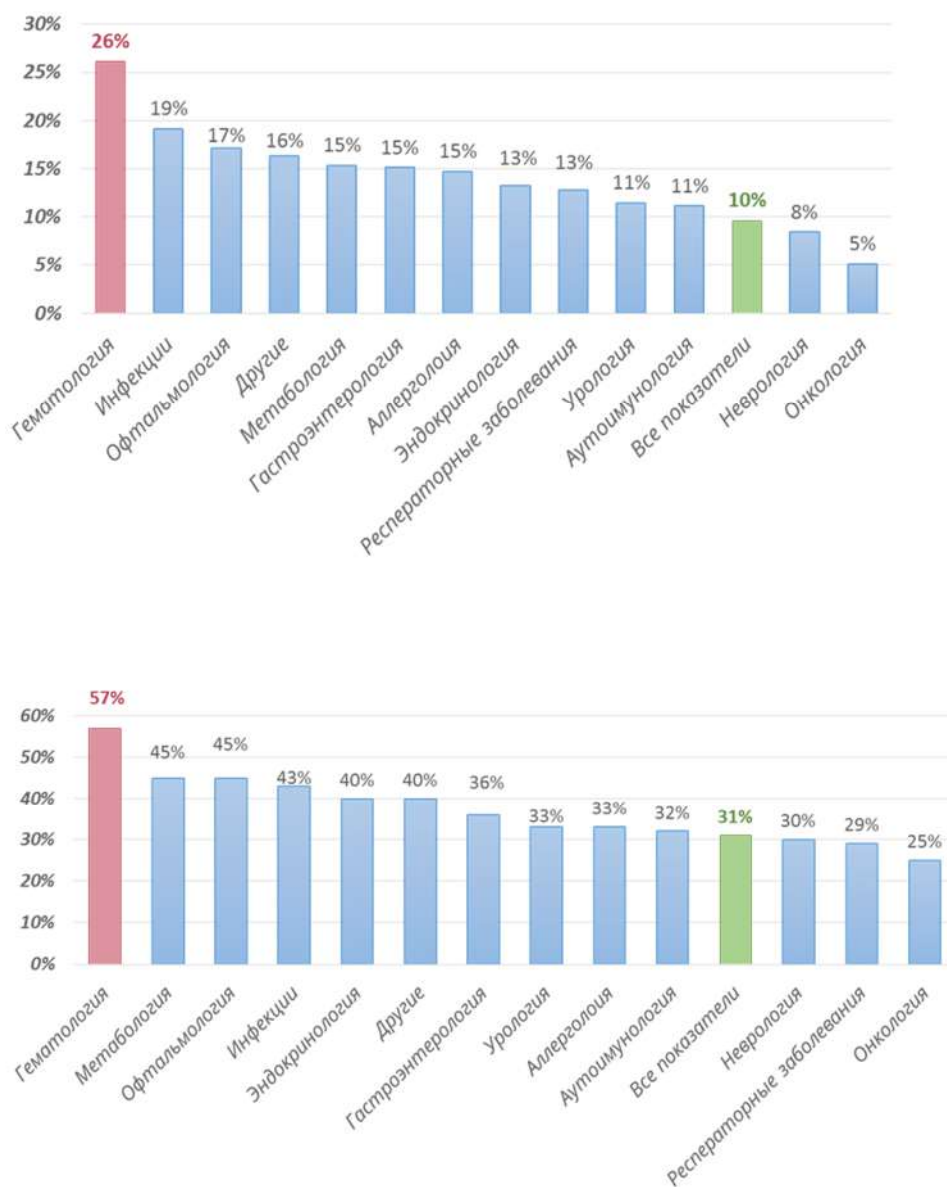


Рисунок 54. Сопоставление доли проектов, успешно прошедших первую и вторую фазы клинических испытаний в разных областях медицины (по данным Global Biotech Handbook 2022)

Таким образом, если рассматривать препарат протеиназ *Tolyrocladium inflatum* 62a как проект перспективного лекарственного средства, необходимо

грамотно учесть возможные затраты, источники финансирования, различные инвестиционные риски и максимальную выгоду, которую можно извлечь на том или ином этапе разработки.

При коммерциализации препаратов в ходе выведения лекарственных средств на биомедицинский рынок одним из наиболее популярных вариантов успешной финансовой стратегии является продажа прав на реализацию проекта стратегическому партнеру до начала третьей фазы клинических испытаний. В данном случае, оценивается привлекательность проекта до момента окончания патента. К тому же, поскольку речь идет именно о биотехнологической разработке, чрезвычайно высока сложность производства ее аналогов, особенно биоассимиляров, т.к. недостаточно иметь схожую молекулу, нужно обладать и исходным продуцентом, что дает оригинальному препарату дополнительные конкурентные преимущества.

Исходя из таблицы 9, для того, чтобы довести проект до второй стадии клинических испытаний необходимо порядка ~ 130 млн. рублей. В практике финансирования биомедицинских проектов широко распространенным подходом является содействие со стороны негосударственных и государственных фондов с целью дальнейшего продвижения. Принципиальное отличие между выходом из проекта после завершения первой и второй фаз клинических испытаний заключается в издержках и сроках выхода из проекта для потенциального инвестора, также в зависимости от срока выхода может меняться и доля инвестора в проекте.

При сопоставлении данных об инвестиционной привлекательности проекта после первой и второй фазы клинических испытаний использовались расчеты со ставкой дисконтирования, которая была получена, исходя из данных опубликованных пресс-службой Центрального банка России, составила 9,25%. Ожидается ежегодная динамика процентной ставки в пределах 5 pp. В зависимости от срока продажи прав на проект определяется точный период его окупаемости.

Безусловно, разные инвесторы имеют свои критерии отбора для каждого проекта. Например, различные фонды могут требовать соответствие проекта той или иной внутренней норме рентабельности, однако зачастую при непосредственном согласовании инвестирования этот критерий может оказаться не определяющим в виду специфики разработки. В таком случае инвестор может предложить содействие в случае увеличения его доли в проекте.

В целом, сопоставляя показатели инвестиционной привлекательности (период окупаемости, дисконтированный период окупаемости, чистый приведенный доход, индекс потенциальной прибыльности и внутренняя норма рентабельности) для продажи прав на проект после первой и второй фаз клинических испытаний соответственно можно получить следующие результаты примерной финансовой оценки (табл. 13):

Таблица 13. Сравнение показателей инвестиционной привлекательности проекта после 1 и 2 фаз клинических испытаний (по данным компаний Инвитро, Гемакор и фонда Primer capital, анализируемых в программном обеспечении Project expert 7.0)

Финансовый показатель:	Реализация проекта после I фазы клинических испытаний	Реализация проекта после II фазы клинических испытаний
Ставка дисконтирования, %	9,25	9,25
Период окупаемости (дисконтированный), лет	52	72
Чистый приведенный доход (NPV), млн. руб	29	270
Индекс прибыльности (PI)	1,29	2,34
Внутренняя норма доходности (IRR), %	21	40

Рассмотренные сценарии развития проекта основаны на готовности инвестора выкупить проект после прохождения того или иного этапа

клинических испытаниях. Однако для инвестора, безусловно важно и обоснование целесообразности проекта, перспективы выведения его на рынок.

Данные расчеты рассматриваются с точки зрения стратегического партнера, с учетом затрат на приобретение полных прав на разработку в размере 800 миллионов рублей. Объем рынка для данной разработки оценивается, исходя из того, что ежегодно в России регистрируется порядка 240 тысяч случаев паталогических состояний, сопряженных непосредственно с тромбозами. К тому же, около 235 тысяч людей погибают в целом от болезней сердечно-сосудистой системы, чаще всего связанных с ишемическими состояниями, так или иначе тесно связанными с тромботическими осложнениями. Таким образом, можно прогнозировать коммерческую привлекательность препарата на основании объема продаж в первый год после выпуска препарата на рынок в размере 10 тысяч единиц продукции. Ежегодный прирост продаж ожидается также в размере 10 тысяч доз препарата.

Если рассматривать коммерциализацию препарата с точки зрения продвижения в качестве диагностической тест системы или диагностического набора на патологии системы гемостаза, можно прийти к следующим результатам (рис.55):



Рисунок 55. Анализ теоретических затрат на каждую из стадий коммерциализации в случае реализации стратегии создания диагностикума

Для коммерциализации разработки с точки зрения создания диагностикума на патологии системы гемостаза, не требуются столь многочисленные инвестиции и временные затраты, как в случае коммерциализации по пути создания лекарственного препарата.

В этом случае не возникает критичной для продвижения на рынке лекарственных препаратов необходимости в обязательном сотрудничестве со стратегическим партнером, поскольку для реализации концепции диагностического набора достаточно инвестирования ~ 18 млн. рублей за срок ~ 3 лет. Этот вариант может быть реализован, например, за счет сотрудничества с одним или двумя инвесторами (венчурными инвесторами или фондами с целью грантового финансирования), которые могут обеспечить покрытие регистрационных издержек.

3.3.4. Пути масштабирования, производства и возможного применения препарата протеиназ *Tolypocladium inflatum* 62a

Основываясь на полученных результатах, можно констатировать потенциал препарата протеиназ *Tolypocladium inflatum* 62a к коммерциализации и выходу на биомедицинский рынок.

Для перехода от лабораторного уровня разработки к масштабированию возможно предложить, согласно нескольким возможным вариантам реализации. Технологическая схема основных этапов производства представлена на рис. Структурно ее возможно разделить на три основных блока: подготовка посевного материала, культивирование в биореакторе определенного объема или качалочных колбах, получение и очистка комплексного препарата и/или препаратов протеиназ отдельных фракций после ИЭФ. Рассмотрим более подробно каждый из блоков (рис. 56).

Подготовка посевного материала.

Данный этап может быть осуществлен согласно описанной методике в настоящей работе с учетом выявленных оптимальных условий культивирования штамма *Tolypocladium inflatum* 62a. Посевной материал получают смывом спор с поверхности культуры, выращенной в пробирках на скошенном сусло-агаре в течение 7 сут при 25°C в питательную среду состава (%): сусло – 6,7, глюкоза – 2, пептон – 0,1. После 2 суток культивирования в посевной среде, часть биомассы переносят в органоминеральную ферментационную среду состава (%): глицерин – 7, глюкоза – 3, гидролизат рыбной муки – 3, NaNO₃ – 0,2, MgSO₄ x 7H₂O – 0,1, KH₂PO₄ – 0,1. Культивирование микромицета осуществляют в колбах объемом 750 мл, содержащих 100 мл среды, на орбитальной качалке (200 об. /мин) при 28°C и pH ~ 6,5-7,0.

Культивирование в биореакторе определенного объема или качалочных колбах

Дальнейшее культивирование осуществляется в ферментационной среде - посевной материал в объеме 3 мл переносят в органоминеральную среду (в г/л: глюкоза – 30.0, глицерин – 70.0, гидролизат рыбной муки – 5.0, NaNO_3 – 2.0, KH_2PO_4 – 0.5, MgSO_4 – 0.5; среда № 2 (в г/л): глюкоза – 35.0, крахмал – 10.0, NH_4NO_3 – 5.0, NaCl – 2.0, KH_2PO_4 – 0.5, MgSO_4 – 0.5) и культивируют в течение 5 сут. При этом в качестве платформы для культивирования могут успешно выступать качалочные колбы (как описано в методике выше), либо биореакторы (ферментеры). Для масштабирования наработки культуральной жидкости в условиях ферментера могут подойти биореакторы разного объема в зависимости от решаемых задач и назначения использования полученной субстанции. Для наработки партий препарата для целей тромботерапии возможно проведение культивирования в ферментерах объемом от 5 до 100л. Культивирование микромицетов-тромболитиков в условиях биореактора, изучалось, например, для *Arthrobotrys longa* в процессе получения комплекса протеиназ «лонголитин», при этом показатели активности препарата не уступали аналогичным при культивировании в качалочных колбах. Визуальная структура и физико-химические параметры получаемой культуральной жидкости *Arthrobotrys longa* и *Tolyposcladium inflatum* при культивировании в ферментационной среде являются сходными, следовательно, возможно апробировать подобную методику глубинного культивирования для масштабирования получения препарата и в случае культуральной жидкости *Tolyposcladium inflatum*.

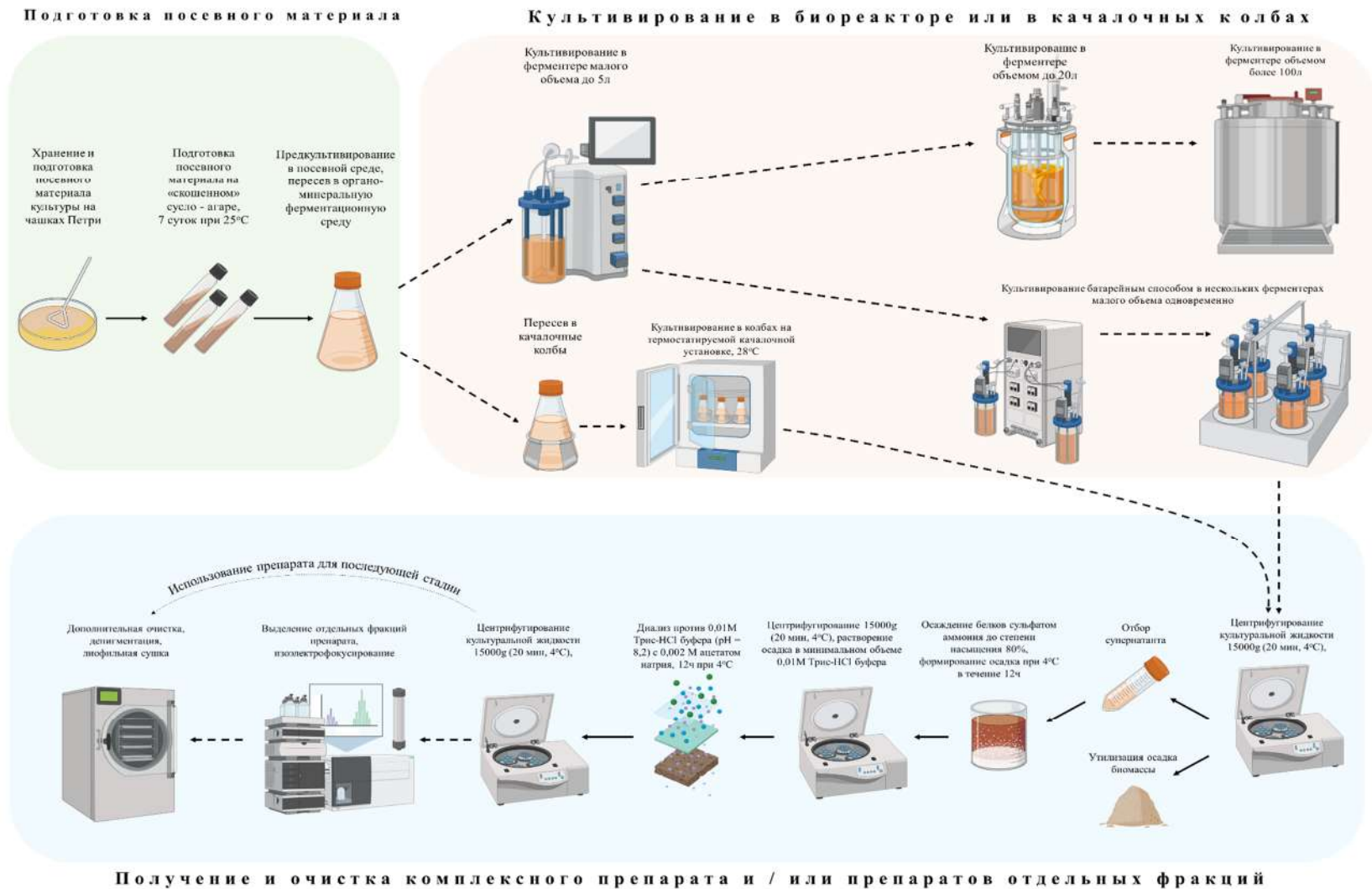


Рисунок 56. Возможные этапы масштабирования, получения и очистки препарата протеиназ *Tolypocladium inflatum* 62a

В качестве референтной методики могут быть использованы подход для глубинного культивирования, при котором перед приготовлением питательной среды ферментеры стерелизуются острым паром (~120 °С) в течение 1 часа. Среда стерелизуется глухим паром 15 минут (~75-80 °С), подачей пара в рубашку ферментера и затем острым паром (~120 °С) не менее 40 минут. Затем среду охлаждают до температуры 25 °С за счет подачи в рубашку воды, избыточное давление поддерживается подачей стерильного воздуха (0,1 мПа). Микробиологический контроль чистоты осуществляют микроскопически и высевом питательной среды на диагностические среды. При культивировании в условиях ферментера в среду также добавляется пеногаситель (например, лапрол). Культивирование в объемах, превышающих 100л представляется затруднительным в виду необходимости высоких затрат энергии, сложностью очистки оборудования от компонентов мицеллия и высокими рисками качества получаемого продукта. Возможен также вариант культивирования батарейным способом в условиях нескольких параллельно работающих ферментеров малого объема. Культура микромицета при визуальном осмотре должна представлять плотную бело-коричневую жидкость без резкого запаха.

Получение и очистка комплексного препарата и/или препаратов протеиназ отдельных фракций после изоэлектрофокусирования

На последующих стадиях культуральную жидкость отделяют от биомассы центрифугированием 15000 g (20 мин, 4°C). Внеклеточные белки из полученной культуральной жидкости осаждают сульфатом аммония при 80%-ной степени насыщения. Осадок белков формируют при 4°C в течение 12 ч. Затем его отделяли центрифугированием при 15000 g (20 мин, 4°C), растворяют в минимальном объеме 0.01 М трис-НСl-буфера, рН 8.2, содержащем 0.002 М ацетата кальция, и диализуют против того же буфера (12 ч, 4°C). Полученный раствор белков центрифугируют в аналогичных условиях

для удаления осадка и затем лиофильно высушивают. В случае необходимости получения отдельных фракций проводят ИЭФ на колонке в градиенте плотности сахарозы 0–40% и рН 3-10, создаваемом амфолинами при напряжении 700 в течение 36 ч. Во фракциях после элюции с колонки определяют рН, содержание белка, по оптической плотности при 280 нм и целевую активность.

Применение полученного препарата может быть разнообразным. Стоит отметить, что в отличие от других микромицетов штамм *Tolyposcladium inflatum* 62а демонстрирует высокую долю активаторной к плазминогену активности к фибринолитической активности. По данному показателю штамм также превосходит и тромболитические препараты, полученные из других организмов (табл. 14). Среди существующих препаратов, которые обладают более выраженным соотношением активаторной к плазминогену активности к фибринолитической активности выделяется рекомбинантный препарат тенектеплаза. Однако использование тенектеплазы ограничено ввиду крайне высокой стоимости (самая высокая среди тромболитических средств), а также сопряжено с высокими рисками побочных эффектов в виде обширных кровотечений. Таким образом, одним из перспективных направлений для последующей разработки препарата протеиназ может являться создание на основе его отдельных фракций препарата с выраженной активностью активатора плазминогена. В совокупности с пролонгированным тромболитическим эффектом, описанным в разделах выше, протеиназный комплекс может обладать медленным клиренсом из кровотока, позволяя минимизировать затраты на количество вводимой субстанции, тем самым снижая стоимость препарата и геморрагические риски для пациента.

Таблица 14. Продуценты тромболитических препаратов с фибринолитической и активаторной к плазминогену активностями

Продуцент	Доля активаторной активности от фибринолитической активности, %	Стадия разработки, особенности	Источник
<i>Tolypocladium inflatum 62a</i>	~70	<i>In vitro</i> -исследования	Фокичев и соавт., 2023
<i>Tolypocladium inflatum kl</i>	~50	<i>In vitro</i> -исследования	Шаркова и соавт., 2015
Микромицеты			
<i>Trichothecium roseum</i>	~25	Пройдены клинические испытания, есть рекомендация в качестве инъекционного препарата для лечения тромбозов глубоких вен и артерий	Пленина и соавт., 2006
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>tuberosus</i>	~20	<i>In vitro</i> -исследования	Zhang et al., 2015
<i>Neurospora sitophila</i>	~20	<i>In vitro</i> -исследования	Deng et al., 2018
<i>Sarocladium strictum</i>	~30	<i>In vitro</i> -исследования	Корниенко и др., 2020
Другие организмы			
<i>Streptococcus haemolyticus</i> (бактерии)	~30	Стрептокиназа – самый распространенный тромболитический препарат, однако его применение	Zia, 2020

		связано со значительными побочными эффектами в виде высокой частоты обширных кровотечений, быстрый клиренс из кровотока	
<i>Serratia marcescens</i> (бактерии)	~20	<i>In vitro</i> -исследования	Lakshmi et al., 2013
<i>Codium intricatum</i> (водоросли)	~20	<i>In vitro</i> -исследования, представляют собой сериновые протеазы и преимущественно гидролизуют цепь Аα фибриногена	Kiminori et al., 2002
<i>Wrightia tinctoria</i> (высшие растения)	~50	<i>In vitro</i> -исследования, препарат демонстрирует как антикоагулянтную, так и прокоагулянтную активность (сложно использовать в терапевтических целях)	Shivaprasad et al., 2009
<i>Calotropis gigantea</i> (высшие растения)	~15	<i>In vitro</i> -исследования	Rajesh et al., 2007
<i>Trimeresurus stejnegeri</i> (яд змей)	~20-30	Исследования для применения в диагностических наборах, и тромботерапии противогематомных субстанциях, очень	Zhang et al., 1995

		высокая себестоимость продукта	
Тенектеплаза (рекомбинантный активатор, клеточная линия СНО)	~80-90	Самая высокая стоимость среди тромболитиков, риски кровотечений, из-за высокой стоимости используется только в терапии для купирования тяжелых состояний	Guimaraes et al., 2006

Вторым вариантом медицинского применения может являться использование препарата в качестве компонента диагностического набора на патологии системы гемостаза. Референтным диагностикумом в данном случае может выступать, например, набор от компании Ренам «Реахром-Плазминоген», позволяющий определять плазминоген фотометрическим методом, предназначенный для количественного определения активности плазминогена в плазме крови хромогенным методом как вручную, так и на автоматических анализаторах. Метод определения активности плазминогена в образце плазмы основан на его способности образовывать комплекс со стрептокиназой, который гидролизует пептидный хромогенный субстрат. Количество высвобождаемого при этом пара-нитроанилина (pNA) прямо пропорционально активности плазминогена в образце плазмы. Процесс идет по следующей схеме:

Плазминоген + стрептокиназа (избыток) \Rightarrow Комплекс

Комплекс + Пептид-pNA \Rightarrow Пептид + pNA (желтый)

Для построения калибровочного графика используют плазму-калибратор с известной активностью плазминогена (А). На оси Y откладывают величины

оптической плотности, полученных для каждого разведения плазмы-калибратора, а на оси X по линейной шкале — активность плазминогена в %. Используя калибровочный график и значение оптической плотности исследуемого образца определяют активность плазминогена³. Препарат микроциста *Tolypocladium inflatum* 62a, обладая более выраженной активностью в данном случае может заменять компонент стрептокиназы, позволяя минимизировать себестоимость измерения (за счет простоты вывода диагностического компонента на рынок и относительно низкой себестоимости производства) и количество используемого компонента. Дополнительным преимуществом может являться стабильность препарата в течение долгого времени (аналогично стабильности ферментного комплекса микроциста *Arthrobotrys longa* «Лонголитин»), позволяющая использовать набор не только однократно в момент измерения, но и через определенный промежуток времени. Также препарат или его компоненты может являться частью комплексных диагностических наборов на патологии системы гемостаза человека, например, в комплексном исследовании резерва плазминогена и состояния фибринолитической системы⁴.

Еще одним вариантом терапевтического применения препарата протеиназ штамма *Tolypocladium inflatum* 62a может быть его использование в составе аппликационных средств – раневых повязок, противогематомных гелей и мазей, косметических средств.

³По данным компании Ренам в открытом доступе <http://www.renam.ru/sistema-fibrinoliza/reaxrom-plazminogen>

⁴По данным компании Invitro в открытом доступе <https://www.invitro.ru/analizes/for-doctors/171/6551>

Поскольку препарат демонстрирует не только активность активатора плазминогена и плазминоподобную активность, но и иные, – субтилизин-подобную и эластазную, то его применение может быть успешным для заживления гематом и ран благодаря разнообразным протеолитическим активностям в комбинации, например, с составами, содержащими гепарин и другие антикоагулянтные или антитромботические коомпоненты. Наличие пролонгированного тромболитического эффекта может позволить минимизировать расход компонента при сохранении терапевтической эффективности. Действие подобного состава можно дополнительно усилить за счет создания терапевтической комбинации, включающей не только фракции штамма *Tolypocladium inflatum* 62a, но и штамма *Tolypocladium inflatum* k1. Обладая разными оптимумами pH, а также (в щелочном и кислом диапазоне соответственно) при подборе оптимального носителя и вспомогательных компонентов, можно добиться высокой не только терапевтической эффективности, но и универсальности применения средства в широком диапазоне pH.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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

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

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

фибринолитическую и активаторную к плазминогену активность, и для него был характерен выраженный продолжительный тромболитический эффект.

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

ВЫВОДЫ

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

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

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

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

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антонов В.К. Химия протеолиза // М.: «Наука». – 1991. – 505 с.
2. Батомункуева Б.П., Егоров Н.С. Выделение, очистка и разделение комплексного препарата внеклеточных протеиназ *Aspergillus ochryosporus* с фибринолитическими и антикоагулянтными свойствами // Микробиология. – 2001. – Т. 70. – № 5. – С. 602-606.
3. Беккер З.Э. Физиология и биохимия грибов // Изд. МГУ, – 1988. – 230 с.
4. Бубнова Е.Н. Грибы донных грунтов Кандалакшского залива Белого моря // Микол. И фитопатол. – 2009. – Т. 43. – № 4. – С. 284-290.
5. Бубнова Е.Н. Разнообразие микроскопических грибов в литоральных песках Белого моря // Вестник Московского университета. – 2017. – Т. 72. – № 3. – С. 142-148.
6. Бубнова Е.Н., Грум-Гржимайло О.А., Козловский В.В. Состав и структура сообществ мицелиальных грибов в донных грунтах Белого моря // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. – 2020. – Т. 75. № 3. С. 182-187.
7. Гарибова Л.В., Лекомцева С.Н. Основы микологии: Морфология и систематика грибов и грибоподобных организмов // М.: Товарищество научных изданий КМК. – 2005. – 221 с.
8. Егоров Н.С., Крейер В.Г., Осмоловский А.А., Баранова Н.А., Шаркова Т.С., Подорольская Л.В., Серебрякова Т.Н. Внеклеточные протеиназы микроскопических грибов с профибринолитическими и антикоагулянтными свойствами // Тезисы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Тромбозы, кровоточивость, ДВС-синдром. Современные подходы к диагностике». – 2009. – Москва.
9. Егоров Н.С., Ушакова В.И. Образование непатогенными плесневыми грибами рода *Aspergillus* коагулаз, свертывающих плазму и кровь человека // Микробиология. – 1973. – Т. 21. – № 1. – С. 221-223.

10. Звонарева Е.С., Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Котова И.Б., Егоров Н.С. // Прикл. биохимия и микробиология. – 2018. – Т. 54. – № 2. – С. 195-200.
11. Корниенко Е.И., Кокаева Л.Ю., Биланенко Е.Н., Мокеева В.Л., Шаркова Т.С., Осмоловский А.А. // Микология и фитопатология. – 2020. – Т. 54. – №3. – С. 206-213.
12. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Кураков А.В., Егоров Н.С. Образование микромицетом *Aspergillus ochraceus* внеклеточных протеиназ – активаторов протеина с плазмы крови при глубинном и твердофазном культивировании // Прикл. биохимия и микробиология. – 2013. – Т. 49. – № 6. – С. 580-586.
13. Павлюкова Е.Б., Белозерский М.А., Дунаевский Я.Е. Внеклеточные протеолитические ферменты мицелиальных грибов // Биохимия. – 1998. – Т. 63. № 8. – С. 1059-1089.
14. Паников Н.С. Кинетика роста микроорганизмов // М.: «Наука». – 1991. – 309 с.
15. Пленина Л.В., Гаврилов О.К., Кручинский Н.Г. Клинические испытания тромболитического препарата грибного происхождения – триаза // Усп. мед. микол. – 2006. – № 7. – С. 20-21.
16. Подорольская Л.В., Шаркова Т.С., Андреев Г.В., Серебрякова Т.Н. Гемостаз и фибринолиз при наружном применении тромболитического препарата лонголитина // Вестник МГУ. Серия биология. – 2002. – № 2. – С. 11-15.
17. Попова Е.А., Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Котова И.Б., Егоров Н.С. // Микология и фитопатология. – 2020. – Т. 53. – №4. – С.229-235.
18. Северин Е.С. Биохимия для медицинских вузов // М.: ГЭОТАР-МЕД. – 2014. – 768 с.
19. Степанов В.М. Молекулярная биология. Структура и функция белков // М.: Изд. МГУ. – 2005. – 336 с.

20. Струкова С.М. Современные представления о механизме свертывания крови // Тромбы, кровоточивость и болезни сосудов. – 2002. – Т. 2. – С. 21-26.
21. Фокичев Н.С., Корниенко Е.И., Крейер В.Г., Осмоловский А.А. Исследование тромболитического потенциала экзопротеиназ, образуемых микромицетом *Tohyocladium inflatum* 62а, выделенным из грунтов Белого моря // Микология и фитопатология. – 2023. – Т. 57. – № 1.
22. Хуснуллина А.И., Биланенко Е.Н., Кураков А.В. Микроскопические грибы донных грунтов Белого моря // Сибирский экологический журнал. – 2018. – Т. 11. – №5. – С. 584-598.
23. Шаркова Т.С., Кураков А.В., Осмоловский А.А., Матвеева Э.О., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // Микробиология. – 2015. – Т. 84. – № 3. – С. 316-322.
24. Шаркова Т.С., Матвеева Э.О., Крейер В.Г., Осмоловский А.А., Кураков А.В., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // Прикл. биохимия и микробиология. – 2016. – Т. 52. – № 1. – С. 38-43.
25. Шмидт Р., Тевс Г. Физиология человека // Изд. Мир. – 2005. – 415 с.
26. Abdel-Fattah A.F., Ismail A.M. Purification and some properties of pure *Cochliobolus lunatus* fibrinolytic Enzyme // Biotechnol Bioeng. 1984. 26(5):407-11. doi: 10.1002/bit.260260502.
27. Altaf F., Wu S., Kasim V. Role of Fibrinolytic Enzymes in Anti-Thrombosis Therapy // Front Mol Biosci. 2021. 8:680397. doi: 10.3389/fmolb.2021.680397.
28. Ali M.R., Salim Hossain M., Islam M.A., Saiful Islam Arman M., Sarwar Raju G., Dasgupta P., Noshin T.F. Aspect of thrombolytic therapy: a review // Scientific World Journal. 2014. 2014:586510. doi: 10.1155/2014/586510.
29. Ali M.A.M., Spinler S.A. COVID-19 and thrombosis: From bench to bedside // Trends Cardiovasc Med. 2021. 31(3):143-160. doi: 10.1016/j.tcm.2020.12.004.
30. Astrup T., Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity // Arch Biochem Biophys. 1952. 40(2):346-51. doi: 10.1016/0003-9861(52)90121-5.

31. Ansell J., Hirsh J., Hylek E., Jacobson A., Crowther M., Palareti G. Pharmacology and management of the vitamin K antagonists: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th edition) // *Chest*. 2008. 133:160S–198S.
32. Baker W.F. Thrombolytic therapy // *Clin Appl Thromb Hemost*. 2002. 8(4):291-314. doi: 10.1177/107602960200800401.
33. Baker S.K., Strickland S. A critical role for plasminogen in inflammation // *J. Exp. Med*. 2020. 217, e20191865.
34. Balami J.S., Chen R., Sutherland B.A., Buchan A.M. Thrombolytic agents for acute ischaemic stroke treatment: the past, present and future // *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2013. 12(2):145-54. doi: 10.2174/18715273113129990057.
35. Bandani A.R. The effects of entomopathogenic fungus, *Tolypocladium cylindrosporum* on cellular defence system of *Galleria mellonella* // *J. Agric. Sci. Technol*. 2008. 10: 135-146.
36. Bauer K.A. New anticoagulants // *Hematology*. 2006. 1:450–456.
37. Bissett J. Notes on *Tolypocladium* and related genera // *Can. J. Bot*. 1983. 61: 1311-1329.
38. Bohgaki M., Atsumi T., Yamashita Y., Yasuda S., Sakai Y., Furusaki A. The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway mediates induction of the tissue factor gene in monocytes stimulated with human monoclonal anti-beta2Glycoprotein I antibodies // *Int Immunol*. 2004. 16(11):1633–1641.
39. Blombäck B., Hessel B., Hogg D., Therkildsen L. A two-step fibrinogen--fibrin transition in blood coagulation // *Nature*. 1978. 275(5680):501-5. doi: 10.1038/275501a0.
40. Bushley K.E., Raja R., Jaiswal P., Cumbie J.S., Nonogaki M., Boyd A.E., Owensby C.A., Knaus B.J., Elser J., Miller D., Di Y., McPhail K.L., Spatafora J.W. The genome of *tolypocladium inflatum*: evolution, organization, and expression of the cyclosporin biosynthetic gene cluster // *PLoS Genet*. 2013. 9(6):e1003496. doi: 10.1371/journal.pgen.1003496.

41. Cannon C.P., McCabe C.H., Gibson C.M., Ghali M., Sequeira R.F., McKendall G.R., Breed J., Modi N.B., Fox N.L., Tracy R.P., Love T.W., Braunwald E. TNK-tissue plasminogen activator in acute myocardial infarction. Results of the Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) 10A dose-ranging trial // *Circulation*. 1997. 95(2):351-6. doi: 10.1161/01.cir.95.2.351.
42. Cardoso K.B.B., Nascimento M.C., Batista A.C., Oliveira V. de M., Nascimento T.P., Batista J.M. da S., Costa R.M.P.B., Pastrana L., Porto A.L.F. Systematic analysis on the obtaining of fibrinolytic fungi enzymes // *Research, Society and Development*. 2022. 11, 2, e13611225449. doi: 10.33448/rsd-v11i2.25449.
43. Chapin J.C., Hajjar K.A. Fibrinolysis and the control of blood coagulation // *Blood Rev*. 2015. 29(1):17-24. doi: 10.1016/j.blre.2014.09.003.
44. Chauvierre C., Aid-Launais R., Aerts J., Chaubet F., Maire M., Chollet L., Rolland L., Bonafé R., Rossi S., Bussi S., Cabella C., Dézsi L., Fülöp T., Szebeni J., Chahid Y., Zheng K.H., Stroes E.S.G., Le Guludec D., Rouzet F., Letourneur D. Pharmaceutical Development and Safety Evaluation of a GMP-Grade Fucoïdan for Molecular Diagnosis of Cardiovascular Diseases // *Mar Drugs*. 2019. 17(12):699. doi: 10.3390/md17120699.
45. Chen W., Huang X., Ma X.W., Mo W., Wang W.J., Song H.Y. Enzymatic vitreolysis with recombinant microplasminogen and tissue plasminogen activator // *Eye (Lond)*. 2008. 22(2):300-307. doi: 10.1038/sj.eye.6702931.
46. Choi H.S., Sa Y.S. Fibrinolytic and antithrombotic protease from *Ganoderma lucidum* // *Mycologia*. 2000. 92:545-552.
47. Cohen M. Heparin-induced thrombocytopenia and the clinical use of low molecular weight heparins in acute coronary syndromes // *Semin. Hematol*. 1999. 36:33-36.
48. Deitcher S.R., Funk W.D., Buchanan J., Liu S., Levy M.D., Toombs C.F. Alfimeprase: a novel recombinant direct-acting fibrinolytic // *Expert. Opin. Biol. Ther*. 2006. 6(12):1361-9. doi: 10.1517/14712598.6.12.1361.

49. Deng Y., Liu X., Katrolia P., Kopparapu N.K., Zheng X. 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.
50. Doolittle R.F. Fibrinogen and fibrin // *Annu. Rev. Biochem.* 1984. 53:195-229. doi: 10.1146/annurev.bi.53.070184.001211.
51. Dzhalilova D.Sh., Makarova O.V. Differences in Tolerance to Hypoxia: Physiological, Biochemical, and Molecular-Biological Characteristics // *Biomedicines.* 2020. 8(10):428. doi: 10.3390/biomedicines8100428.
52. El-Aassar S.A. Production and properties of fibrinolytic enzyme in solid state cultures of *Fusarium pallidoroseum* // *Biotechnol. Lett.* 1995. 17, 943-948. doi: 10.1007/BF00127431.
53. Emran T.B., Rahman M.A., Uddin M.M., Rahman M.M., Uddin M.Z., Dash R., Layzu C. Effects of organic extracts and their different fractions of five Bangladeshi plants on in vitro thrombolysis // *BMC Complement. Altern. Med.* 2015. 15:128. doi: 10.1186/s12906-015-0643-2.
54. Errasti M.E., Prospitti A., Viana C.A., Gonzalez M.M., Ramos M.V., Rotelli A.E., Caffini N.O. Effects on fibrinogen, fibrin, and blood coagulation of proteolytic extracts from fruits of *Pseudananas macrodentes*, *Bromelia balansae*, and *B. hieronymi* (Bromeliaceae) in comparison with bromelain // *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 2016. 27(4):441-449. doi: 10.1097/MBC.0000000000000531.
55. Flemmig M., Melzig M.F. Serine-proteases as plasminogen activators in terms of fibrinolysis // *J. Pharm. Pharmacol.* 2012. 64(8):1025-1039. doi: 10.1111/j.2042-7158.2012.01457. x.
56. Fu J., Ren J., Zou L., Bian G., Li R., Lu Q. The thrombolytic effect of miniplasmin in a canine model of femoral artery thrombosis // *Thromb. Res.* 2008. 122(5):683-690. doi: 10.1016/j.thromres.2008.01.007.
57. Furie B., Furie B.C. Mechanisms of thrombus formation // *N. Engl. J. Med.* 2008. 359:938-949.

58. Gralinski L.E., Bankhead A. 3rd, Jeng S. Mechanisms of severe acute respiratory syndrome coronavirus-induced acute lung injury // *mBio*. 2013. 4: e00271-13.
59. Granstrand O. Strategic Management of Intellectual Property // CIM Working Paper., 1999. 01.
60. Guimaraes A.H., Barrett-Bergshoeff M.M., Criscuoli M., Evangelista S., Rijken D.C. Fibrinolytic efficacy of Amediplase, Tenecteplase and scu-PA in different external plasma clot lysis models: sensitivity to the inhibitory action of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) // *Thromb. Haemost.* 2006. 96(3):325-30; PMID:16953274
61. Gupta N., Zhao Y.Y., Evans C.E. The stimulation of thrombosis by hypoxia // *Thromb. Res.* 2019. 181:77-83. doi: 10.1016/j.thromres.2019.07.013.
62. Hacke W., Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Machnig T, Schneider D, von Kummer R, Wahlgren N, Toni D; ECASS Investigators. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke // *N Engl J Med.* 2008 Sep 25;359(13):1317-29. doi: 10.1056/NEJMoa0804656.
63. Hamer J., Malone P., Silver I. The PO₂ in venous valve pockets: Its possible bearing on thrombogenesis // *British Journal of Surgery.* 1981. 68, 166-170. doi.org/10.1002/bjs.1800680308
64. Hao Q, Dong BR, Yue J, Wu T, Liu G.J. Thrombolytic therapy for pulmonary embolism // *Cochrane Database Syst Rev.* 2018. 12(12):CD004437. doi: 10.1002/14651858.CD004437.pub5.
65. Hermans J., McDonagh J. Fibrin: structure and interactions // *Semin. Thromb. Hemost.* 1982. 8(1):11-24. doi: 10.1055/s-2007-1005039.
66. Henkin J., Marcotte P., Yang H.C. The plasminogen-plasmin system // *Prog Cardiovasc Dis.* 1991. 34(2):135-64. doi: 10.1016/0033-0620(91)90010-j.

67. Hirsh J., Anand S.S., Halperin J.L., Fuster V. Guide to anticoagulant therapy: heparin: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association // *Circulation*. 2001. 103:2994-3018.
68. Hodge K.T., Humber R.A., Wozniak C.A. *Cordyceps variabilis* and the genus *Syngliocladium* // *Mycologia*. 1998. 90: 743-753.
69. Hodge K.T., Krasnoff S.B., Humber R.A. *Tolypocladium inflatum* is the anamorph of *Cordyceps subsessilis* // *Mycologia*. 1996. 88, 715–719.
70. Holbrook IB, Leaver AG. A procedure to increase the sensitivity of staining by Coomassie brilliant blue G250-perchloric acid solution // *Anal Biochem*. 1976. 75(2):634-636. doi: 10.1016/0003-2697(76)90118-4.
71. Hoppensteadt DA, Jeske W, Walenga J, Fareed J. The future of anticoagulation // *Semin Respir Crit Care Med*. 2008. 29:90-99.
72. Howard N, Abell C, Blakemore W, Chessari G, Congreve M, Howard S, Jhoti H, Murray CW, Seavers LC, van Montfort RL. Application of fragment screening and fragment linking to the discovery of novel thrombin inhibitors // *J. Med. Chem*. 2006. 49 (4):1346-1355.
73. Hunt JA, Petteway SR Jr, Scuderi P, Novokhatny V. Simplified recombinant plasmin: production and functional comparison of a novel thrombolytic molecule with plasma-derived plasmin // *Thromb. Haemost.* 2008. 100(3):413-419.
74. Humber, R.A. & K.S. Hansen. 2006. ARSEF, USDA-ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Culture.
75. Kasai S, Arimura H, Nishida M, Suyama T. Primary structure of single-chain pro-urokinase // *J. Biol. Chem*. 1985. 260(22):12382-12389.
76. Kaur J., Zhao Z., Klein G.M., Lo E.H., Buchan A.M. The neurotoxicity of tissue plasminogen activator? // *J. Cereb. Blood Flow. Metab*. 2004. 24(9):945-63. doi: 10.1097/01.WCB.0000137868. 50767.E8.
77. Kalbfleisch J., Thadani U., LittleJohn J.K., Brown G., Magorien R., Kutcher M., Taylor G., Maddox W.T., Campbell W.B., Perry J. Evaluation of a prolonged infusion of recombinant tissue-type plasminogen activator (Duteplase) in preventing

- reocclusion following successful thrombolysis in acute myocardial infarction // *Am. J. Cardiol.* 1992. 69(14):1120-1127. doi: 10.1016/0002-9149(92)90923-m.
78. Kawai C., Yui Y., Hosoda S., Nobuyoshi M., Suzuki S., Sato H., Takatsu F., Motomiya T., Kanmatsuse K., Kodama K., Yabe Y., Minamino T., Kimata S., Nakashima M. A prospective, randomized, double-blind multicenter trial of a single bolus injection of the novel modified t-PA E6010 in the treatment of acute myocardial infarction: comparison with native t-PA. E6010 Study Group // *J. Am. Coll. Cardiol.* 1997. 29(7):1447-1453. doi: 10.1016/s0735-1097(97)00074-0.
79. Khaldi N., Seifuddin F.T., Turner G., Haft D., Nierman W.C., Wolfe K.H., Fedorova N.D. SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters // *Fungal. Genet. Biol.* 2010. 47(9):736-741. doi: 10.1016/j.fgb.2010.06.003.
80. Kim J.S., Kim J.E., Choi B.S., Park S.E., Sapkota K., Kim S., Lee H.H., Kim C.S., Park Y., Kim M.K., Kim Y.S., Kim S.J. Purification and characterization of fibrinolytic metalloprotease from *Perenniporia fraxinea* mycelia // *Mycol. Res.* 2008. 112:990-998.
81. Kim H.C., Choi B.S., Sapkota K., Kim S., Lee H.J., Yoo J.C., Kim S.J. Purification and characterization of a novel, highly potent fibrinolytic enzyme from *Paecilomyces tenuipes* // *Process Biochem.* 2011. 46:1545-1553.
82. Kiminori M., Yasushi M., Hiroyuki S., Kanji H., Keisuke M. A fibrinolytic enzyme from the green alga *Codium latum* activates plasminogen // *Fisheries science.* 2002. 68(2):455-457.
83. Kohnert U., Rudolph R., Verheijen J.H., Weening-Verhoeff E.J., Stern A., Opitz U., Martin U., Lill H., Prinz H., Lechner M. Biochemical properties of the kringle 2 and protease domains are maintained in the refolded t-PA deletion variant BM 06.022 // *Protein Eng.* 1992. 5(1):93-100. doi: 10.1093/protein/5.1.93.
84. Koka V., Huang X.R., Chung A.C., Wang W., Truong L.D., Lan H.Y. Angiotensin II up-regulates angiotensin I-converting enzyme (ACE), but down-regulates ACE2 via the AT1-ERK/p38 MAP kinase pathway // *Am. J. Pathol.* 2008. 172(5):1174-1183. doi: 10.2353/ajpath.2008.070762.

85. Koren G., Weiss A.T., Hasin Y., Appelbaum D., Welber S., Rozenman Y., Lotan C., Mosseri M., Sapoznikov D., Luria M.H. Prevention of myocardial damage in acute myocardial ischemia by early treatment with intravenous streptokinase // *N. Engl. J. Med.* 1985. 313(22):1384-1389. doi: 10.1056/NEJM198511283132204.
86. Krishnaswamy A., Lincoff A.M., Cannon C.P. The use and limitations of unfractionated heparin // *Crit. Pathw. Cardiol.* 2010. 9(1):35-40.
87. Kotb E. The biotechnological potential of fibrinolytic enzymes in the dissolution of endogenous blood thrombi // *Biotechnol. Prog.* 2014. 30(3):656-672. doi: 10.1002/btpr.1918.
88. 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(12):1565-1574.
89. Koupenova M, Kehrel BE, Corkrey HA, Freedman JE. Thrombosis and platelets: an update // *Eur. Heart J.* 2017. 38(11):785-791. doi: 10.1093/eurheartj/ehw550.
90. Kumar D.R., Hanlin E., Glurich I., Mazza J.J., Yale S.H. Virchow's contribution to the understanding of thrombosis and cellular biology // *Clin Med Res.* 2010. 8(3-4):168-72. doi: 10.3121/cmr.2009.866.
91. Kumar S.S., Sabu A. Fibrinolytic Enzymes for Thrombolytic Therapy // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019. 1148:345-381. doi: 10.1007/978-981-13-7709-9_15.
92. Lakshmi Bhargavi P., Prakasham R.S. A fibrinolytic, alkaline and thermostable metalloprotease from the newly isolated *Serratia* sp RSPB11 // *Int. J. Biol. Macromol.* 2013. 61:479-486.
93. Lee C.J., Ansell J.E. Direct thrombin inhibitors // *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2011. 72:581-592.
94. Lee C.K., Shin J.S., Kim B.S., Cho I.H., Kim Y.S., Lee E.B. Antithrombotic effects by oral administration of novel proteinase fraction from earthworm *Eisenia andrei* on venous thrombosis model in rats // *Arch. Pharm. Res.* 2007. 30(4):475-480. doi: 10.1007/BF02980222.

95. Lin H., Xu L., Yu S., Hong W., Huang M., Xu P. Therapeutics targeting the fibrinolytic system // *Exp. Mol. Med.* 2020. 52:367-379.
96. Lodigiani C., Iapichino G., Carenzo L., Cecconi M., Ferrazzi P., Sebastian T., Kucher N., Studt J.D., Sacco C., Bertuzzi A., Sandri M.T., Barco S. Humanitas COVID-19 Task Force. Venous and arterial thromboembolic complications in COVID-19 patients admitted to an academic hospital in Milan, Italy // *Thromb. Res.* 2020. 191:9-14. doi: 10.1016/j.thromres.2020.04.024.
97. Lorand L., Credo R.B. Thrombin and fibrin stabilization in: *Chemistry and Biology of Thrombin* (L. Lundblad, J. W. Fenton, II, and K. G. Mann, eds.), Arm Arbor Science, Ann Arbor. – 1977. – pp. 311-323.
98. Mackman N. New insights into the mechanisms of venous thrombosis // *J. Clin. Invest.* 2012. 122:2331-2336.
99. Malcolm A.D., Keltai M., Walsh M.J. ESPRIT: a European study of the prevention of reocclusion after initial thrombolysis with alteplase in acute myocardial infarction // *Eur. Heart J.* 1996. 17(10):1522-1531. doi: 10.1093/oxfordjournals.eurheartj.a014716.
100. 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. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04370. x.
101. Meenu M., Santhosh D., Kamia C., Randhir S. Industrial strain improvement: mutagenesis // *Ind. J. Microbiol.* 2000. 40, 25.
102. Matsubara K, Hori K, Matsuura Y, Miyazawa K. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme and identification of fibrinogen clotting enzyme in a marine green alga, *Codium divaricatum* // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2000. 125(1):137-143. doi: 10.1016/s0305-0491(99)00161-3.
103. Moussa M., Ibrahim M., El Ghazaly M., Rohde J., Gnoth S., Anton A., Kensy F., Mueller F. Expression of recombinant staphylokinase in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // *BMC Biotechnol.* 2012. 12:96. doi: 10.1186/1472-6750-12-96.

104. Mukherjee A.K., Rai S.K., Thakur R., Chattopadhyay P., Kar S.K. Bafibrinase: A non-toxic, non-hemorrhagic, direct-acting fibrinolytic serine protease from *Bacillus* sp. strain AS-S20-I exhibits in vivo anticoagulant activity and thrombolytic potency // *Biochimie*. 2012. 94(6):1300-1308. doi: 10.1016/j.biochi.2012.02.027.
105. Napolitano F., Di Spigna G., Vargas M., Iacovazzo C., Pinchera B., Spalletti Cernia D., Ricciardone M., Covelli B., Servillo G., Gentile I., Postiglione L., Montuori N. Soluble Urokinase Receptor as a Promising Marker for Early Prediction of Outcome in COVID-19 Hospitalized Patients // *J. Clin. Med.* 2021. 10(21):4914. doi: 10.3390/jcm10214914.
106. Napolitano F., Montuori N. Role of Plasminogen Activation System in Platelet Pathophysiology: Emerging Concepts for Translational Applications // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. 23(11):6065. doi: 10.3390/ijms23116065.
107. Omura K., Hitosugi M., Kaketani K., Zhu X., Maeda H., Tokudome S. Fibrinolytic and anti-thrombotic effect of NKCP, the protein layer from *Bacillus subtilis* (natto) // *Biofactors*. 2004. 22(1-4):185-187. doi: 10.1002/biof.5520220138.
108. Osmolovskiy A.A., Kreier V.G., Kurakov A.V., Baranova N.A., Egorov N.S. *Aspergillus ochraceus* micromycetes – producers of extracellular proteinases – protein C activators of blood plasma // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2012. 48(5):488-492.
109. Osmolovskiy A.A., Popova E.A., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Fibrinolytic and collagenolytic activity of extracellular proteinases of the strains of micromycetes *Aspergillus ochraceus* L-1 and *Aspergillus ustus* 1 // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. 71(1):62-66.
110. Oxley T.J., Mocco J., Majidi S., Kellner C.P., Shoirah H., Singh I.P., De Leacy R.A., Shigematsu T., Ladner T.R., Yaeger K.A., Skliut M., Weinberger J., Dangayach N.S., Bederson J.B., Tuhim S., Fifi J.T. Large-Vessel Stroke as a Presenting Feature of Covid-19 in the Young // *N. Engl. J. Med.* 2020. 382(20):e60. doi: 10.1056/NEJMc2009787.

111. Proctor P., Leesar M.A., Chatterjee A. Thrombolytic Therapy in the Current ERA: Myocardial Infarction and Beyond // *Curr Pharm Des.* 2018. 24(4):414-426. doi: 10.2174/1381612824666171227211623.
112. Pelizza S.A., López Lastra C.C., Becnel J.J., Bisaro V., Garcia J.J. Effect of temperature, pH, and salinity on the infection of *Leptolegnia chapmanii* Seymour (Peronosporomycetes) in mosquito larvae // *J. Invertebr. Pathol.* 2007. 96:133-137.
113. Rao M.B., Tanksali A.M., Ghatge M. S., Deshpande V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998. 62(3):597-635.
114. Rajesh R., Shivaprasad H.V., Gowda C.D., Nataraju A., Dhananjaya B.L., Vishwanath B.S. Comparative study on plant latex proteases and their involvement in hemostasis: a special emphasis on clot inducing and dissolving properties // *Planta Med.* 2007. 73(10):1061-1067.
115. Redinbaugh M.C., Turtley R.B. *Anal. Biochem.* 1986. 153, 267-271.
116. Smith P K., Rrohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. *Anal. Biochem.* 1985. 150:76-85.
117. Rijken D.C., Wijngaards G., Zaal-de Jong M., Welbergen J. Purification and partial characterization of plasminogen activator from human uterine tissue // *Biochim. Biophys. Acta.* 1979. 580:140-153.
118. Rinde L.B., Lind C., Smabrekke B., Njolstad I., Mathiesen E.B., Wilsgaard T., Lochen M.L., Hald E.M., Vik A., Braekkan S.K., Hansen J.B. Impact of incident myocardial infarction on risk of venous thromboembolism: the tromso study // *J. Thromb. Haemost.* 2016. 14:1183-1191.
119. Scorsetti A., Eliádes L., Stenglein S., Cabello M., Pelizza S., Saparrat M. Pathogenic and enzyme activities of the entomopathogenic fungus *Tolyposcladium cylindrosporum* (Ascomycota: Hypocreales) from Tierra del Fuego, Argentina // *Revista de biología tropical.* 2012. 60:833-841.

120. Shivaprasad H.V., Riyaz M., Venkatesh K.R., Dharmappa K.K., Tarannum S., Siddesha J.M., Rajesh R., Vishwanath B.S. Cysteine proteases from the Asclepiadaceae plants latex exhibited thrombin and plasmin like activities // J. Thromb. Thrombolysis. 2009. 28(3):304-308.
121. 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. doi: 10.1016/0304-4165(91)90156-b.
122. Sharkova T., Matveeva E., Kreier V., Osmolovskiy A., Kurakov A., Baranova N., Egorov N. Production of Proteinase-Plasminogen Activators by Micromycete *Tolypocladium inflatum* k1 // Applied Biochemistry and Microbiology. 2016. 52:31-35. 10.1134/S0003683816010129.
123. Shibata K., Hashimoto T., Miyazaki T., Miyazaki A., Nobe K. Thrombolytic Therapy for Acute Ischemic Stroke: Past and Future // Curr. Pharm. Des. 2019;25(3):242-250. doi: 10.2174/1381612825666190319115018.
124. Shirasaka, N., Naitou, M., Okamura, K., Kusuda, M., Fukuta, Y. and Terashita, T. Purification and Characterization of a Fibrinolytic Protease from *Aspergillus oryzae* KSK-3 // Mycoscience. 2012. 53:354-364. doi.org/10.1007/S10267-011-0179-3.
125. Shivaprasad H.V., Riyaz M., Venkatesh K.R., Dharmappa K.K., Tarannum S., Siddesha J.M., Rajesh R., Vishwanath B.S. Cysteine proteases from the Asclepiadaceae plants latex exhibited thrombin and plasmin like activities // J. Thromb. Thrombolysis. 2009. 28(3):304-308. doi: 10.1007/s11239-008-0290-2.
126. Simkhada J.R., Mander P., Cho S.S., Yoo J.C. A Novel Fibrinolytic Protease from *Streptomyces* sp. CS684 // Process Biochemistry. 2010. 45:88-93. doi.org/10.1016/j.procbio.2009.08.010.
127. Sebag S.C., Bastarache J.A., Ware L.B. Therapeutic modulation of coagulation and fibrinolysis in acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome // Curr. Pharm. Biotechnol. 2011. 12:1481-1496.

128. Seeger W., Stohr G., Wolf H.R., Neuhof H. Alteration of surfactant function due to protein leakage: special interaction with fibrin monomer // *J. Appl. Physiol.* 1985. 58:326-338.
129. Smalling R.W. Molecular biology of plasminogen activators: what are the clinical implications of drug design? // *Am. J. Cardiol.* 1996. 78(12A):2-7. doi: 10.1016/s0002-9149(96)00736-9.
130. 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(10):1110-1111. doi: 10.1007/BF01956052.
131. Survase S.A., Shaligram N.S., Pansuriya R.C., Annapure U.S., Singhal R.S. A novel medium for the enhanced production of cyclosporin A by *Tolypocladium inflatum* MTCC 557 using solid state fermentation // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2009. 19(5):462-467. doi: 10.4014/jmb.0805.324.
132. Suzuki Y., Sano H., Mochizuki L., Honkura N., Urano T. Activated platelet-based inhibition of fibrinolysis via thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor activation system // *Blood Adv.* 2020. 4:5501-5511.
133. Sonneveld M.A., de Maat M.P., Portegies M.L., Kavousi M., Hofman A., Turecek P.L., Rottensteiner H., Scheiflinger F., Koudstaal P.J., Ikram M.A., Leebeek F.W. Low ADAMTS13 activity is associated with an increased risk of ischemic stroke // *Blood.* 2015. 126:2739-2746.
134. Stefanini M., Adamis D.M. Purification of Aspergillin O // *Lancet.* 1959. 11:443-444.
135. Stimberg N., Walz M., Schorgendorfer K., Kuck U. Electrophoretic karyotyping from *Tolypocladium-inflatum* and 6 related strains allows differentiation of morphologically similar species // *Applied Microbiology and Biotechnology.* 1992. 37:485-489.
136. Tao S., Li P., Liu B., Liu D., Li Z. Successive cultivation of *Fusarium oxysporum* on rice chaff for economic production of fibrinolytic enzyme.

- Loughborough University // Journal contribution. 1998.
<https://hdl.handle.net/2134/25003>.
137. Thornton D.J., Carlstedt I., Sheehan J.K. Identification of glycoproteins on nitrocellulose membranes and gels // *Mol Biotechnol.* 1996. 5(2):171-176. doi: 10.1007/BF02789065.
138. Tirado I., Mateo J., Soria J.M., Oliver A., Martinez-Sanchez E., Vallve C., Borrell M., Urrutia T., Fontcuberta J. The ABO blood group genotype and factor VIII levels as independent risk factors for venous thromboembolism // *Thromb. Haemost.* 2005. 93:468-474.
139. Toshio S., Teruhiko B., Kei A. Purification and Properties of Blood-coagulating Protease from *Cephalosporium* sp. // *Agric. Biol. Chem.* 1977. 41(2):293-298.
140. Ueda M., Kubo T., Miyatake K., Nakamura T. Purification and characterization of fibrinolytic alkaline protease from *Fusarium* sp. BLB // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007. 74(2):331-338. doi: 10.1007/s00253-006-0621-1.
141. Uesugi Y., Usuki H., Iwabuchi M., Hatanaka T. Highly potent fibrinolytic serine protease from *Streptomyces* // *Enzyme Microb. Technol.* 2011. 48(1):7-12. doi: 10.1016/j.enzmictec.2010.08.003.
142. Verdecchia P., Cavallini C., Spanevello A., Angeli F. The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-CoV-2 infection // *Eur. J. Intern. Med.* 2020. 76:14-20. doi: 10.1016/j.ejim.2020.04.037.
143. Verstraete M. Third-generation thrombolytic drugs // *Am. J. Med.* 2000. 109(1):52-58. doi: 10.1016/s0002-9343(00)00380-6.
144. Wang J., Li J., Liu Q. Association between platelet activation and fibrinolysis in acute stroke patients // *Neurosci Lett.* 2005. 384(3):305-309.
145. Wang F., Wang C., Li M., Gui L., Zhang J., Chang W. Purification, characterization and crystallization of a group of earthworm fibrinolytic enzymes from *Eisenia fetida* // *Biotechnol. Lett.* 2003. 25(13):1105-1109. doi: 10.1023/a:1024196232252.

146. Whyte C.S., Morrow G.B., Mitchell J.L., Chowdary P., Mutch N.J. Fibrinolytic abnormalities in acute respiratory distress syndrome (ARDS) and versatility of thrombolytic drugs to treat COVID-19 // *J. Thromb. Haemost.* 2020. 18(7):1548-1555. doi: 10.1111/jth.14872.
147. Williams M.S., Cushman M., Ouyang P., Heckbert S.R., Kalyani R.R., Vaidya D. Association of serum sex hormones with hemostatic factors in women on and off hormone therapy: the multiethnic study of atherosclerosis // *J. Womens Health (Larchmt)*. 2016. 25:166-172.
148. 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(3):451-459. doi: 10.1007/s10295-008-0516-5.
149. 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.
150. Yan X.M., Kim C.H., Lee C.K., Shin J.S., Cho I.H., Sohn U.D. Intestinal Absorption of Fibrinolytic and Proteolytic Lumbrokinase Extracted from Earthworm, *Eisenia Andrei* // *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 2010. 14(2):71-75. doi: 10.4196/kjpp.2010.14.2.71.
151. Yang J., Tian B., Liang L., Zhang K.Q. Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007. 75:21-31.
152. Zeymer U., Neuhaus K.L. Clinical trials in acute myocardial infarction // *Curr. Opin. Cardiol.* 1999. 14:392-402.
153. Zenych A., Fournier L., Chauvierre C. Nanomedicine progress in thrombolytic therapy // *Biomaterials.* 2020. 258:120297. doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.120297.
154. Zhang S., Wang Y., Zhang N. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Rhizopus microsporus* var. *tuberosus* // *Food. Technol. Biotechnol.* 2015. 53(2):243-248.

155. Zhang Y., Wisner A., Xiong Y., Bon C. A novel plasminogen activator from snake venom. Purification, characterization, and molecular cloning // J. Biol. Chem. 1995. 270(17):10246-10255.
156. Zia M.A. Streptokinase: An Efficient Enzyme in Cardiac Medicine // Protein Pept. Lett. 2020. 27(2):111-119.