

УДК 632.4: 635.64

## ИССЛЕДОВАНИЕ ТРОМБОЛИТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ЭКЗОПРОТЕИНАЗ, ОБРАЗУЕМЫХ МИКРОМИЦЕТОМ *TOLYPOCLADIUM INFLATUM* 62A, ВЫДЕЛЕННЫМ ИЗ ГРУНТОВ БЕЛОГО МОРЯ

© 2023 г. Н. С. Фокичев<sup>1,\*</sup>, Е. И. Корниенко<sup>1,\*\*</sup>, В. Г. Крейер<sup>1,\*\*\*</sup>, А. А. Осмоловский<sup>1,\*\*\*\*</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

\*e-mail: fokichev.n@mail.ru

\*\*e-mail: aljnka-93@mail.ru

\*\*\*e-mail: vkreyer@yandex.ru

\*\*\*\*e-mail: aosmol@mail.ru

Поступила в редакцию 10.10.2022 г.

После доработки 15.12.2022 г.

Принята к публикации 22.12.2022 г.

Исследованы тромболитические свойства препарата экзопротеиназ микромицета *Tolypocladium inflatum* 62a, выделенного из грунтов Белого моря, а также отдельных его фракций, полученных после электрофокусирования, в сравнении с ближайшим аналогом-продуцентом тромболитических ферментов *T. inflatum* k1. Показаны выраженный тромболитический потенциал, наличие фибринолитической и активаторной к плазминогену активности, специфической протеолитической активности в отношении некоторых субстратов, а также пролонгированного тромболитического эффекта в отношении фибриновых сгустков. Эти свойства могут найти применение в разработке новых тромболитических препаратов для терапии тромботических состояний, создании противогематомных препаратов для наружного применения, а также диагностических наборов на патологии системы гемостаза человека.

**Ключевые слова:** внеклеточные протеиназы, микромицеты, система гемостаза, тромболизис, тромботерапия, фибринолитические ферменты

**DOI:** 10.31857/S0026364823020071, **EDN:** NIXIPI

### ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания и их осложнения занимают лидирующие позиции среди глобальных причин смертности. Так, например, в 2019 г. ишемическая болезнь сердца и инсульт по данным ВОЗ занимали лидирующие позиции по данному показателю (WHO, 2019). Кроме того, патологии сердечно-сосудистой системы и системы гемостаза часто могут быть связаны с возникновением и развитием тромботических осложнений, которые также могут быть потенциально летальными. Одним из наиболее эффективных подходов купирования и терапии тромботических осложнений являются препараты-активаторы плазминогена. Они способны оказывать стимулирующее действие на систему гемостаза больного, одновременно освобождая кровотоки от тромбов и в то же время, не вызывая серьезных осложнений, связанных с обильными кровотечениями или ретромбозами. Однако до сих пор применение таких препаратов, как стрептокиназа, урокиназа, альтеплаза и их современных аналогов является ограниченным в связи с их достаточно высокой стоимо-

стью и рисками непереносимости: кровопотери, возникновения различных реакций гиперчувствительности организма и обширных кровоизлияний в жизненно важных органах (Baker, 2002). Перспективным ответом на проблему терапии и диагностики лечения тромбозов может стать применение препаратов на основе протеолитических ферментов микроскопических грибов. Поиск современных, специфических и безопасных тромболитических веществ является важной задачей современной медицины и биотехнологии (Balami et al., 2013). Одним из перспективных направлений лечения таких заболеваний и расширения пула тромболитических препаратов является использование более специфичных и безопасных протеиназ, полученных из культуральной жидкости микромицетов (Hao et al., 2018). В данной работе изучено фибринолитическое действие протеиназ штамма микромицета рода *Tolypocladium*, выделенного из почв Белого моря, а также проведено сравнение некоторых биохимических свойств, определяющих тромболитический потенциал, с другим известным продуцентом ферментов, ак-

тивных в отношении системы гемостаза, *Toyopocladium inflatum* k1. Полученные данные могут стать основой для разработки тромботерапевтических средств на основе препаратов микромицетов данной группы, а также диагностических наборов (диагностикумов) для выявления некоторых патологических состояний системы гемостаза.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Продуцент и условия культивирования.** Объектом исследования служил штамм микромицета *T. inflatum* 62a, выделенный из донного грунта. Посевной материал получали 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 – 2.0, пептон – 0.1 (Batomunkueva, Egorov, 2001). После 2 сут культивирования часть биомассы переносили в ферментационную среду состава (%): глицерин – 7.0, глюкоза – 3.0, гидролизат рыбной муки – 3, NaNO<sub>3</sub> – 0.2, MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O – 0.1, KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> – 0.1. Культивирование микромицета осуществляли в условиях глубинного культивирования в качалочных колбах объемом 750 мл, содержащих 100 мл среды, на орбитальной качалке (200 об./мин) при 28°C.

**Получение препарата протеиназ из культуральной жидкости и их разделение.** После культивирования микромицета на ферментационной среде в течение 3 сут, культуральную жидкость отделяли от биомассы фильтрованием водоструйным насосом через фильтровальную бумагу (“ФС”, Россия). Внеклеточные белки из полученной культуральной жидкости осаждали сульфатом аммония при 80%-й 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 0.01 М Трис-НСl-буфера, рН 8.2, и диализовали в диализных мешках против того же буфера (12 ч, 4°C). Полученный р-р белков центрифугировали в аналогичных условиях для удаления осадка и затем лиофильно высушивали. Белки разделяли методом изоэлектрофокусирования на колонке объемом 110 мл (“ЛКВ”, Швеция) в градиенте плотности сахарозы 0–40% и рН 3–10, создаваемом амфолинами (“Pharmacia”, Швеция), при напряжении 800 В в течение 36 ч (Osmolovskiy et al., 2013). Во фракциях (объемом 1 мл) после элюции с колонки определяли рН, содержание белка по оптической плотности при 280 нм и общую протеолитическую активность.

**Определение общей протеолитической активности.** Общую протеолитическую активность определяли модифицированным методом Ансона–Хагхары по количеству тирозина в неосаждаемых трихлоруксусной кислотой продуктах протеолиза после 10-минутного гидролиза 1%-го раствора ка-

зеина в 0.1 М Трис-НСl буфере (рН 8.0–8.2, 37°C), как описано ранее (Osmolovskiy et al., 2016). Активность выражали в мкмоль тирозина в минуту (Е<sub>Тир</sub>).

**Определение содержания белка.** Содержание белка определяли спектрофотометрически в кювете с длиной пути в 1 см при 280 нм (Gertler, Trop, 1971).

**Определение рН и температурного оптимума активности и оптимума стабильности препарата.** рН-оптимум активности препарата определяли в 0.4 М 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 фермента 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 активности. Температурный оптимум для действия препарата определяли в 0.05 М Трис-НСl буфере, рН 8.2, по казеинолитической активности при 25, 30, 37, 45, 55 и 65°C. Термостабильность препарата изучали при инкубации фермента при заданных температурах в течение 2 ч и выражали в % от исходной активности фермента.

**Определение протеолитической активности в отношении отдельных белков системы гемостаза.** Активность препарата протеиназ, образуемых *T. inflatum* 62a, в отношении белков системы гемостаза определяли по расщеплению их специфических хромогенных пептидных субстратов: плазмина (H-D-Val-Leu-Lys-pNA и For-Ala-Phe-Lys-pNA), тромбина (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA и H-D-Phe-Pip-Arg-pNA), фактора Ха (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA), урокиназы (pGlu-Gly-Arg-pNA), тканевого активатора плазминогена (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA), субтилизина (Z-Ala-Ala-Leu-pNA), эластазы (Suc-Ala-Ala-pNA), трипсина (Bz-Arg-pNA). Измерение оптической плотности проводили при 405 нм на спектрофотометре Eppendorf kinetics (Германия). Реакции проводили путем добавления к препарату протеиназ 0.05%-го раствора соответствующего субстрата, приготовленного на 0.05 М Трис-НСl-буфере, рН 8.2 (Osmolovskiy et al., 2012). За единицу активности (Е) принимали количество мкмоль п-нитроанилина, отщепившегося от хромогенного субстрата за 1 мин при 37°C.

**Определение плазминоподобной и активаторной к плазминогену активности на фибриновых пластинах.** Плазминоподобную активность (на прогретых фибриновых пластинах) и активность активаторов плазминогена (на непрогретых фибриновых пластинах) штаммов определяли по модифицированному методу Аструпа–Мюллерца–Лассена и выражали в условных единицах на 1 мл культуральной жидкости (Landau et al., 2000). Для приготовления фибриновой пластины в чашке Петри

смешивали 9 мл 0.76%-го раствора фибриногена и 0.2 мл 0.4%-го раствора тромбина, приготовленных на смеси физиологического раствора и 0.05 М Трис-НСI буфера (рН 8.2) в соотношении 9 : 1. Инкубацию фибриновых пластин с нанесенными образцами фильтрата культуральной жидкости микромицетов (30 мкл) проводили в течение 6 ч при 37°C. За условную единицу активности принимали зону лизиса в 10 мм<sup>2</sup>, которая образуется за 3–4 ч инкубации фибриновых пластин при 37°C.

**Выявление коагулазной активности.** Наличие коагулазной активности препарата выявляли по визуализации фибринового волокна в экспериментах со свертыванием фибриногена человека (Sigma-Aldrich, США) и быка (H2B Medical, США). В пробирки типа “Эппендорф” добавляли 0.1 мл препарата протеиназ и 0.2 мл 0.4% раствора фибриногена и наблюдали визуализацию фибринового волокна или ее отсутствие. В качестве контроля использовали 0.1%-й р-р тромбина.

**Определение углеводного компонента.** Углеводный компонент в составе молекул протеиназ определяли с помощью периодной кислоты и реактива Шиффа (фуксинсернистой кислоты) методом дот-блоттинга на нитроцеллюлозных мембранах как описано ранее (Thronton et al., 1996; Averina, Snegireva, 1980). В качестве положительного контроля использовали раствор внеклеточной дрожжевой инвертазы (0.5 мг/мл), а в качестве отрицательного – 0.5 мг/мл БСА.

**Определение тромболитического эффекта препарата.** Формировали фибриновый сгусток в пробирках типа “Эппендорф” путем добавления в каждую пробирку 100 мкл человеческой плазмы и 20 мкл тромбина, фиксировали массу пробирки до, во время (после каждого этапа) и после эксперимента. Добавляли к каждому образцу фибринового сгустка препарат протеиназ *T. inflatum* 62a и фиксировали изменение массы через равные промежутки времени (30, 60 и 90 мин). По остаточной массе сгустка (выраженной в % от первоначальной массы сгустка) определяли степень протекания тромболитического процесса в образцах с течением времени (Kotb et al., 2015).

**Препаративный электрофорез белков.** Электрофоретическое разделение белков полученного препарата 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%. Гель прокрашивали 0.08%-м р-ром Кумасси бриллиантового голубого G-250 в 3.5%-й хлорной кислоте (Holbrook and Leaver, 1976).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Изолят штамма микромицета, выделенный из почв Белого моря, идентифицировали по морфологическим, культуральным и генетическим признакам (методом ПЦР и последующим секвени-

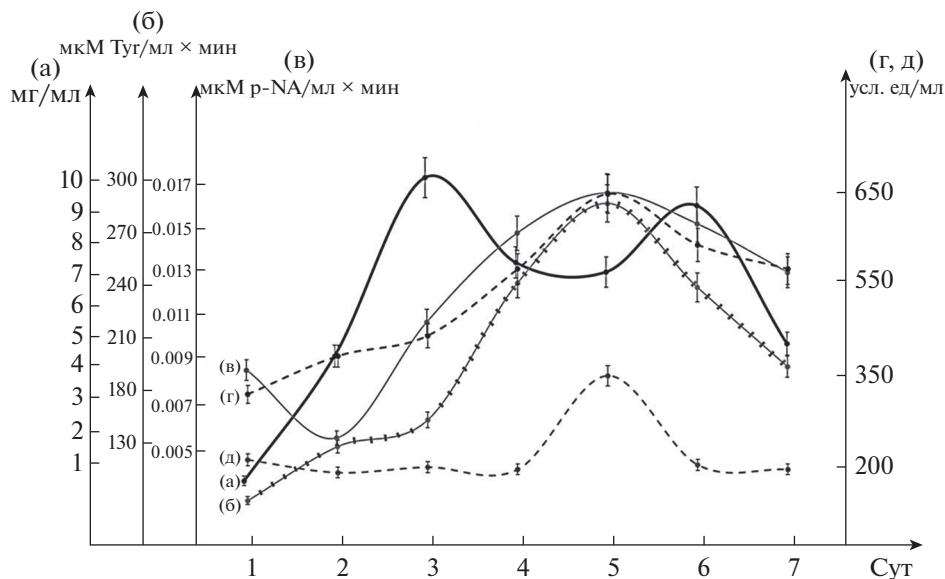
рованием участка ITS рДНК). В соответствии с результатом исследования последовательности 5.8S рРНК было установлено, что выделенный штамм был схож с другим ранее описанным штаммом *T. inflatum* (gene bank ID no: MH864514.1, идентичность – 99%; покрытие последовательности – 92%), однако по совокупности генетических и культуральных признаков было установлено, что выделенный из грунтов Белого моря штамм является уникальным и ему был присвоен номер 62a.

Динамику накопления протеиназ, образуемых штаммом микромицета *T. inflatum* 62a, изучали в течение 7 сут при глубинном культивировании на орбитальном шейкере при температуре 28°C, ежедневно определяя концентрацию белка, фибринолитическую, активаторную к плазминогену и общую протеолитическую активность. Как видно из рис. 1, максимальные значения концентрации белка достигались на третьи и шестые сут культивирования, а максимумальные значения фибринолитической (700.2 усл. ед/мл), активаторной к плазминогену (367.13 усл.ед/мл) и общей протеолитической активности (казеинолитической, 319.5 мкмоль Туг/мл × мин) для данного микромицета совпадали по времени и приходились на пятые сут. При этом на пятые сут культивирования не происходило значительного снижения концентрации белка (рис. 1). В связи с этим для дальнейших экспериментов получали препарат внеклеточных протеиназ микромицета при его культивировании в течение пяти сут.

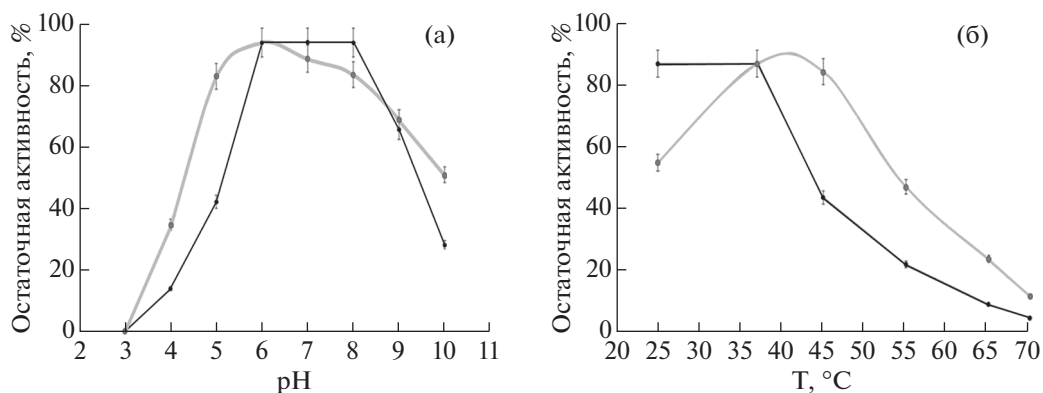
Определение температурного оптимума активности исследуемого препарата протеиназ *T. inflatum* 62a выявило его активность в интервале температур 25–55°C. Максимальную активность препарата наблюдали при 35–37°C. При температуре 65°C и более активность препарата практически отсутствовала. Изучение термостабильности исследуемого препарата показало, что препарат сохранял активность при температуре от 25 до 37°C в течение 2 ч. При температуре 45°C активность уже значительно снижалась (на 50%), и полностью отсутствовала при 65°C (снижение на 90%) (рис. 2a).

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 не был активен, в щелочных условиях практически полностью инактивировался при рН 11.0. 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. 2б).

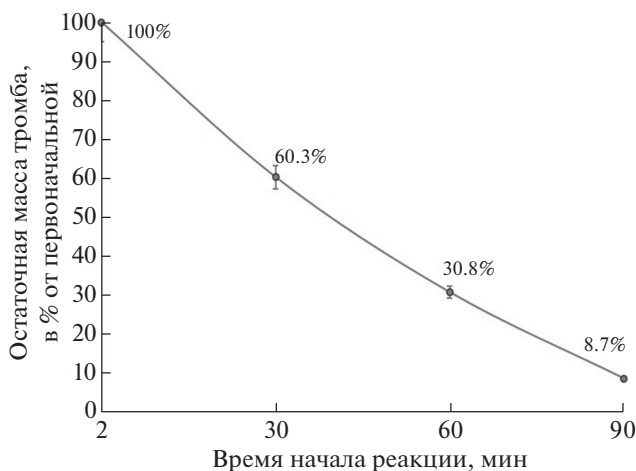
Таким образом, согласно полученным экспериментальным данным, оптимум действия протеиназ препарата *T. inflatum* 62a находится в пределах физиологических параметров крови человека (Т ~ 36.6°C, рН ~ 7.5).



**Рис. 1.** Динамика накопления препарата протеиназ штаммом *Tolypocladium inflatum* 62a: а – содержание белка, мг/мл; б – казеинолитическая активность, мкмоль Туг/мл × мин; в – активность с dVal-Leu-Lys-pNA, мкмоль рNA/мл × мин; г – фибринолитическая активность, усл.ед/мл; д – активаторная к плазминогену активность, усл.ед/мл.



**Рис. 2.** Влияние pH (а) и температуры (б) на активность (черный график) и стабильность (серый график) препарата внеклеточных протеиназ микромицета *Tolypocladium inflatum* 62a.



**Рис. 3.** Определение степени тромболиза во времени препарата протеиназ микромицета *Tolypocladium inflatum* 62a.

Тромболитический потенциал белкового препарата, полученного из культуральной жидкости микромицета *T. inflatum* 62a, определяли в экспериментах по изучению тромболиза в условиях *in vitro*. В результате эксперимента через 30 мин лизис фибринового сгустка составлял 39.7% (первоначальная масса фибринового сгустка под действием препарата уменьшилась на 39.7%); через 60 мин составлял 69.2%; а через 90 мин составил 91.3% (рис. 3). Данные показатели позволяют говорить в целом о высокой тромболитической активности полученного препарата.

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. 4),

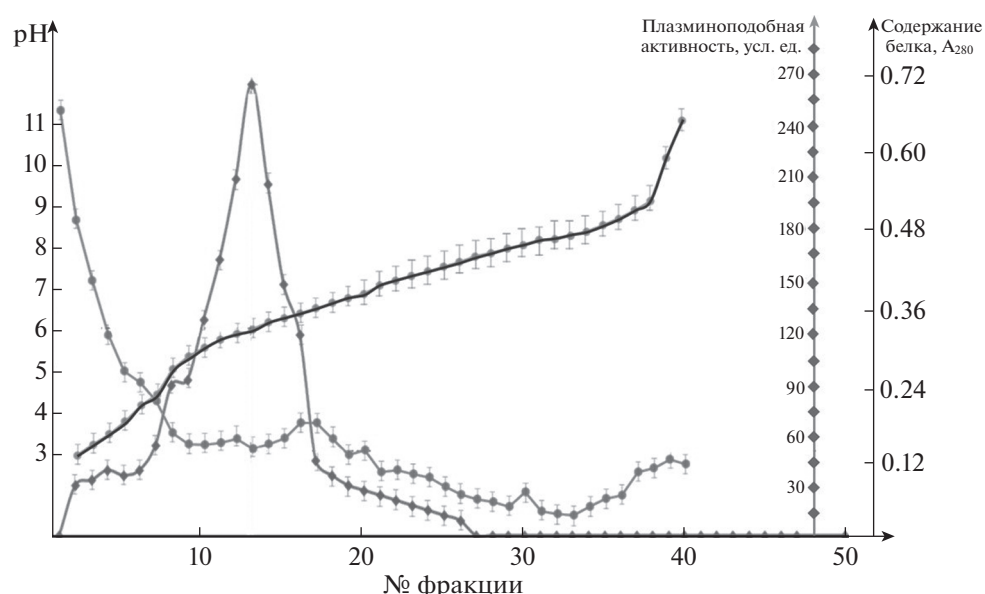


Рис. 4. Изоэлектрофокусирование препарата протеиназ *Tolypocladium inflatum* 62a.

было обнаружено, что фракции, обладающие максимальными значениями искомых типов активности — фибринолитической, активаторной к плазминогену и казеинолитической — сходились к колонки единым пиком и имели изоэлектрическую точку (pI) 5.65–5.85. Дальнейшие эксперименты проводили с фракцией № 13 (pI — 5.75), значения тромболитической активности которой были наибольшими. Удельная протеолитическая активность протеиназы составила  $0.78 \text{ Е/мл} \times 10^{-3}$ . Фибринолитическая и активаторная к плазминогену активность, 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.

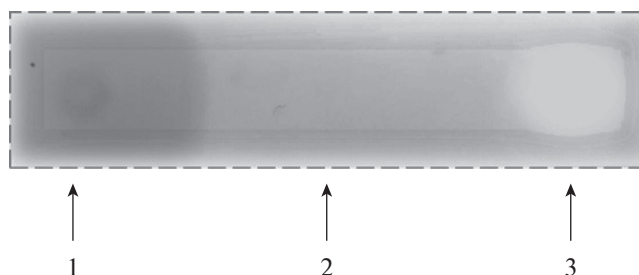
Также специфическую протеолитическую активность фракции № 13 исследовали с помощью специфических хромогенных субстратов — п-нитроанилидов. Полученные результаты представлены в табл. 1. Как видно из таблицы, выделенная протеиназа оказалась способна расщеплять молекулы субстратов по остаткам лизина и лейцина и практически неспособной расщеплять молекулы субстрата по остаткам аргинина.

Определение углеводного компонента методом дот-блотинга у изучаемой протеиназы с помощью реакции на гликопротеины показало, что она не гликозилирована (рис. 5). Отсутствие данной посттрансляционной модификации позволяет рассматривать потенциальную возможность клонирования и экспрессии гена, кодирующего образо-

Таблица 1. Активность внеклеточной протеиназы *Tolypocladium inflatum* 62a по отношению к белкам системы гемостаза человека

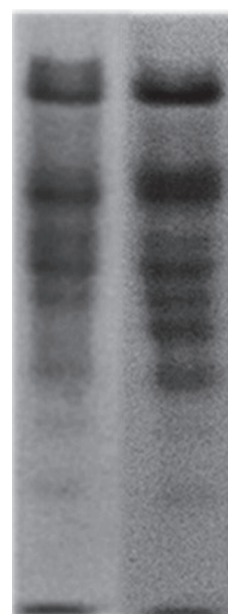
Тип активности	Хромогенный субстрат	Удельная активность, $\text{Е/мл} \times 10^{-3}$ *	
		препарат	выделенная протеиназа (фракция № 13)
Урокиназная	pGlu-Gly-Pro-Arg-pNA	1.70	0
Тромбиноподобная	Tos-Gly-Pro-Arg-pNA	2.42	—
Плазминоподобная	dVal-Leu-Lys-pNA	5.93	27.21
Фактор Ха-подобная	HD-Ile-Pro-Arg-pNA	1.07	0
Сериновых протеаз	Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA	2.20	—
Субтилизинподобная	Z-Ala-Ala-Leu-pNA	3.11	14.01
Эластазная	Suc-Ala-Ala-Ala-pNA	0.87	—
Трипсиноподобная	Bz-Arg-pNA	0.30	0
Плазминоподобная	For-Ala-Phe-Lys-pNA	3.34	8.80

Примечание. \*Знаком “—” отмечены случаи, когда активность не определялась.



**Рис. 5.** Качественная реакция на гликопротеины: 1 – положительный контроль (инвертаза); 2 – фракция № 13; 3 – отрицательный контроль (БСА).

k1 62a



**Рис. 6.** Электрофорез препаратов протеиназ штаммов *Tolypocladium inflatum* k1 (слева) и 62a (справа).

вание протеиназы, в прокариотических клетках (Porova et al., 2015).

По результатам экспериментов по свертываемости фибриногена человека и быка, а также в аналогичных экспериментах с плазмой человека и плазмой кролика под действием протеиназы *T. inflatum* 62a, в пробе не наблюдали наличие фибринового волокна (по сравнению с контрольным случаем при добавлении тромбина). На основании этого можно заключить, что у протеиназы отсутствовала коагулазная активность, что является характерным для любых фибринолитических субстанций (табл. 2).

Электрофоретическое исследование препаратов протеиназ, выделенных из культуральной жидкости исследуемого штамма микромицета *T. inflatum* 62a проводили в сравнении с препаратом протеиназ микромицета *T. inflatum* k1, для которого ранее было показано наличие тромболитической активности (Sharkova et al., 2016). Согласно полученным данным, электрофореграмма внеклеточных белков штамма *T. inflatum* 62a соотносится с электрофореграммой белков *T. inflatum* k1. На рис. 6 видно, что соотношение, количество и характер расположения белковых полос у препаратов этих двух штаммов рода *Tolypocladium* является схожим, что, вероятно, может указывать также и на схожесть секретируемых в культуральную жидкость белков при глубинном культивировании, находящихся в составе полученных препаратов, а также на характер их тромболитического эффекта.

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

риментах по тромболитису препараты обоих штаммов микромицетов показали высокую эффективность при сходной удельной протеолитической активности.

Температурные оптимумы и рН оптимумы препаратов протеиназ *T. inflatum* 62a и *T. inflatum* k1 очень близки и находятся в пределах физиологических параметров крови человека, что делает их пригодными для использования в тромботерапии и диагностике патологий системы гемостаза и позволяет исключить инактивацию или недостаточную эффективность воздействия вследствие определенных свойств крови.

Сопоставление свойств протеиназ штаммов-продуцентов представлено в табл. 3. Как видно из таблицы, протеиназа *T. inflatum* 62a проявляет большие значения фибринолитической и активаторной к плазминогену активности, чем протеиназа *T. inflatum* k1.

Для протеиназы *T. inflatum* 62a также отмечалась высокая в сравнении с протеиназой *T. inflatum* k1 плазминоподобная активность, помимо этого, она, так же, как и протеиназа *T. inflatum* k1, хоть и в меньшей степени, обладала субтилизин-

**Таблица 2.** Свертывание фибриногена и плазмокоагулирующая активность протеиназы *Tolypocladium inflatum* 62a

Проба	Фибриноген быка	Фибриноген человека	Плазма кролика	Плазма человека
Протеиназа <i>T. inflatum</i> 62a	–	–	–	–
Контроль (тромбин)	+	+	+	+

**Таблица 3.** Сравнение протеиназ микромицетов *Tolyposcladium inflatum* 62a и *T. inflatum* k1

Параметр	Протеиназа <i>T. inflatum</i> 62a	Протеиназа <i>T. inflatum</i> k1 (Sharkova et al., 2016)
Фибринолитическая активность, усл.ед/мг белка	597.0	582.0
Активаторная к плазминогену активность, усл.ед/мг белка	413.0	373.0
Активность по отношению к белкам системы гемостаза (удельная активность, Е/мл × 10 <sup>-3</sup> )	Плазминоподобная (27.2), субтилизинподобная (14.0)	Тромбиноподобная (6.4), плазминоподобная (10.6), субтилизинподобная (11.3), эластазная (19.3)
pI фракции	5.7	10.7
Реакция на гликопротеины	Не гликозилирована	Не гликозилирована
Коагулазная активность	Отсутствует	Отсутствует

подобной активностью. В отличие от протеиназы *T. inflatum* 62a, для фракции протеиназы *T. inflatum* было отмечено наличие тромбиноподобной и выраженной эластазной активности.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно полученным данным, штамм микромицета *T. inflatum* 62a может быть использован в качестве перспективного продуцента тромболитических ферментов 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, к которым могут относиться и соединения, обладающие тромболитической активностью (Khalidi et al., 2010).

С точки зрения тромболитического потенциала, штамм *T. inflatum* 62a продемонстрировал способность синтезировать протеолитические ферменты, 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 рН. Протеиназа, полученная после изоэлектрофокусирования, проявляла высокую фибринолитическую и активаторную к плазминогену активность, превосходящую по своим значениям протеиназу ближайшего штамма-аналога *T. inflatum* k1. Также данная протеиназа была активна в диапазоне рН, близком к естественному рН крови, и обладала

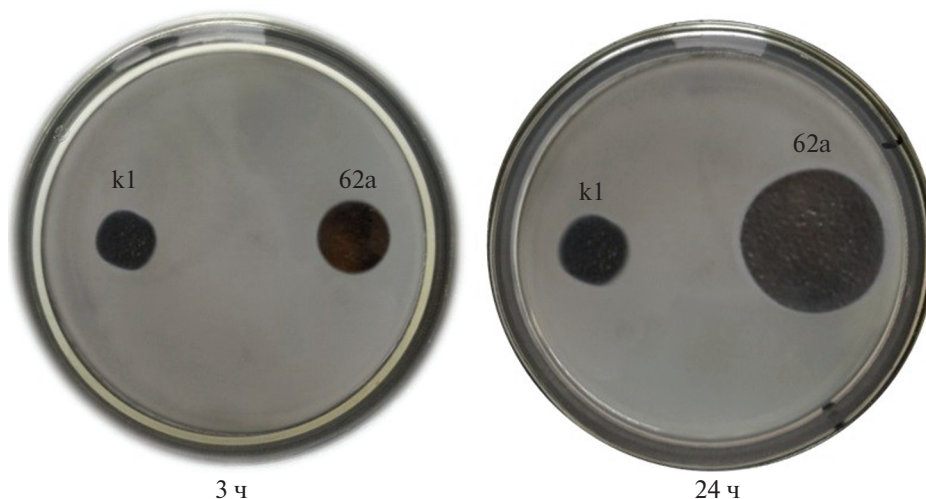
помимо выраженной плазминоподобной, также и эластазной активностью, что говорит о высоком потенциале для применения ее с целью купирования тромботических состояний.

Другой уникальной особенностью, как препарата, так и выделенной протеиназы, можно считать “продолжительный тромболитический эффект”. Особенностью данного эффекта являлось то, что в течение 24 ч после взаимодействия препарата с фибриновым гелем происходил постепенный стабильно возрастающий лизис фибрина, достигая максимума через сутки после аппликации вплоть до полного разрушения фибриновой пластины. Данный эффект не был характерным для препарата протеиназ *T. inflatum* k1 (в его случае полная терминация лизиса фибринового геля происходила в течение 3–4 ч после аппликации) (рис. 7).

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

Применение тромболитических субстанций для наружного применения возможно, например, в комбинации с гепарином для повышения стабильности субстанции и увеличения тромболитического эффекта. Особенно актуальным это могло бы быть в случае терапии тромбозов глубоких и поверхностных вен конечностей, флеботромбозов и тромбофлебитов, а также в случае профилактики тромбоэмболии легочной артерии и инфаркта миокарда. 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





**Рис. 7.** Тромболитический эффект препаратов микромицетов *Tolypocladium inflatum* k1 (слева на чашке) и *T. inflatum* 62a (справа на чашке) через 3 ч и через 24 ч после аппликации на фибриновый гель.

свойственную ему антикоагулянтную активность, но и ускоряет время тромболитизиса. А 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 (Sharkova, 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 (Podgolskaya, 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 и отличаются довольно 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 субстанции.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Averina A.V., Snegiryova A. Ya. Laboratory workshop on organic chemistry. Vysshaya shkola, Moscow, 1980 (in Russ.).
- Baker W.F. Jr. Thrombolytic therapy. Clin. Appl. Thromb. Hemost. 2002. V. 8 (4). P. 291–314. <https://doi.org/10.1177/107602960200800401>
- Balami J.S., Chen R., Sutherland B.A. et al. Thrombolytic agents for acute ischaemic stroke treatment: the past, present and future. CNS Neurol. Disord. Drug. Targets. 2013. V. 12 (2). P. 145–154. <https://doi.org/10.2174/18715273113129990057>
- Batomunkueva B.P., Egorov N.S. Isolation, purification and resolution of the extracellular proteinase complex of *Aspergillus ochraceus* 513 with fibrinolytic and anticoagulant activities. Microbiology. 2001. V. 70 (5). P. 519–522 (in Russ.).
- Bissett J. Notes on *Tolypocladium* and related genera. Can. J. Bot. 1983. V. 5. P. 1311–1329. <https://doi.org/10.1139/b83-139>
- Domsch K.H., Gams W., Anderson T.H. Compendium of soil fungi, 2nd ed. IHW-Verlag, Eching, 2007.
- Fokichev N.S., Kornienko E.I., Sharkova T.S. et al. Thrombolytic activity and properties of the proteinase produced by the micromycete *Tolypocladium inflatum* k1. Mikologiya i fitopatologiya. 2021. V. 55. № 6. P. 449–456. <https://doi.org/10.31857/S002636482106009X>
- Hao Q., Dong B.R., Yue J. et al. Thrombolytic therapy for pulmonary embolism. Cochrane Database Syst. Rev. 2018. V. 12. P. 1–105. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004437.pub5>
- Holbrook I.B., Leaver A.G. A procedure to increase the sensitivity of staining by Coomassie Brilliant Blue G-250 – perchloric acid solution. Anal. Biochem. 1976. V. 75 (2). P. 634–636.
- Khalidi N., Seifuddin F.T., Turner G. et al. SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. FG and B. 2010. V. 47. P. 736–741. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.06.003>
- Koib 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. V. 70 (12). P. 1565–1574. <https://doi.org/10.1515/biolog-2015-0192>
- Osmolovskiy A.A., Kreier V.G., Kurakov A.V. et al. *Aspergillus ochraceus* micromycetes – producers of extracellular proteinases – protein C activators of blood plasma. Appl. Biochem. Microbiol. 2012. V. 48 (5). P. 488–492.
- Osmolovskiy A.A., Kreier V.G., Baranova N.A. et al. Production of extracellular proteinases – protein C activators of blood plasma – by the micromycete *Aspergillus ochraceus* during submerged and solid-state fermentation. Appl. Biochem. Microbiol. 2013. V. 49 (6). P. 580–586.
- Osmolovskiy A.A., Popova E.A., Kreier V.G. et al. 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. Vol. 71 (1). P. 62–66.
- Podorolskaya L.V., Serebryakova T.N., Sharkova, T.S. Experimental thrombosis in rabbit marginal ear vein and evaluation of the thrombolytic action of longolytin. Bull. Exp. Biol. Med. 2007. V. 143. P. 577–580. <https://doi.org/10.1007/s10517-007-0184-x>
- Popova E.A., Osmolovskiy A.A., Kreier V.G. et al. Production by *Aspergillus ustus* strain of proteinases highly active against fibrillar proteins. Mikrobiologiya i fitopatologiya. 2019. V. 53 (4). P. 229–235. <https://doi.org/10.1134/S0026364819040111>
- Seifert K.A., Gams W. The genera of *Hyphomycetes*—2011 update. Persoonia. 2011. V. 27. P. 1–119. <https://doi.org/10.3767/003158511X617435>
- Sharkova T.S., Kornienko E.I., Osmolovskiy A.A. et al. Morphological and physiological properties of the micromycete *Arthrobotrys longa*, a producer of longolytin, a proteolytic complex with a thrombolytic effect. Microbiology. 2016a. V. 85 (2). P. 171–176.
- Sharkova T.S., Matveeva E.O., Kreier V.G. et al. Production of proteinase – plasminogen activators by micromycete *Tolypocladium inflatum* k1. Appl. Biochem. Microbiol. 2016b. V. 52 (1). P. 31–35.
- Thronton D.J., Carlstadt I., Sheehan J.K. Identification of glycoproteins on nitrocellulose membranes and gels. Mol. Biotechnol. 1996. V. 5 (2). P. 171–176.
- White T.J., Bruns T.D., Lee S.B. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA. In: Genes for phylogenetics PCR. Protocols and applications. A laboratory manual, 1st ed. Cambridge, Academic Press, 1990, pp. 315–322.
- World Health Organization. 2022. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates>. Accessed 12.09.2022.
- Аверина А.В., Снегирева А.Я. (Averina, Snegireva) Лабораторный практикум по органической химии. М.: Высшая школа, 1980. 184 с.
- Батомункуева Б.П., Егоров Н.С. (Batomunkueva, Egorov) Выделение, очистка и разделение комплекса внеклеточных протеиназ *Aspergillus ochraceus* 513 с фибринолитической и антикоагулянтной активностью // Микробиология. 2001. Т. 70. № 5. С. 519–522.
- Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Кураков А.В. и др. (Osmolovskiy et al.) Микромикеты *Aspergillus ochraceus* – продуценты внеклеточных протеиназ – активаторов протеина С плазмы крови // Прикл. биохим. микробиол. 2012. Т. 48. № 5. С. 488–492.
- Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А. и др. (Osmolovskiy et al.) Продукция внеклеточных протеиназ – активаторов протеина С плазмы крови – микромикетом *Aspergillus ochraceus* в ходе глубокой и твердофазной ферментации // Прикл. биохим. микробиол. 2013. Т. 49. № 6. С. 580–586.
- Поддорольская Л.В., Шаркова Т.С., Андреев Г.В. и др. (Podorolskaya et al.) Гемостаз и фибринолиз при наружном применении тромболитического препарата лонголитина // Вестник МГУ. Серия биология. 2002. № 2. С. 11–15.
- Попова Е.А., Осмоловский А.А., Крейер В.Г. и др. (Popova et al.) Продукция штаммом *Aspergillus ustus* протеиназ, активных в отношении фибриллярных белков // Микология и фитопатология. 2019. Т. 53. № 4. С. 229–235.
- Фокичев Н.С., Корниенко Е.И., Шаркова Т.С. и др. (Fokichev et al.) Тромболитическая активность и свойства препарата протеиназ, образуемых микромикетом *Tolypocladium inflatum* k1 // Микология и фитопатология. 2021. Т. 55. № 6. С. 449–456.
- Шаркова Т.С., Корниенко Е.И., Осмоловский А.А. и др. (Sharkova et al.) Морфофизиологические особенности микромикета *Arthrobotrys longa* – продуцента протеолитического комплекса тромболитического действия лонголитин // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 171–176.
- Шаркова Т.С., Матвеева Э.О., Крейер В.Г. и др. (Sharkova et al.) Образование протеиназ – активаторов плазминогена микроскопическим грибом *Tolypocladium inflatum* k1 // Прикладная биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. № 1. С. 31–35.

## Investigation of the Thrombolytic Potential of Exoproteinases Produced by the Micromycete *Tolypocladium inflatum* 62A Isolated from the Soils of the White Sea

N. S. Fokichev<sup>a, #</sup>, E. I. Kornienko<sup>a, ##</sup>, V. G. Kreier<sup>a, ###</sup>, and A. A. Osmolovskiy<sup>a, ####</sup>

<sup>a</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>#</sup>e-mail: fokichev.n@mail.ru

<sup>##</sup>e-mail: aljnka-93@mail.ru

<sup>###</sup>e-mail: vkreyer@yandex.ru

<sup>####</sup>e-mail: aosmol@mail.ru

Thrombolytic properties of the micromycete *Tolypocladium inflatum* 62a isolated from the White Sea soils exoproteinases preparation, as well as its individual fractions, obtained after isoelectric focusing, were studied in comparison to the closest analogue, the producer of thrombolytic enzymes *T. inflatum* k1. A pronounced thrombolytic potential, the presence of fibrinolytic and plasminogen activator activity, specific proteolytic activity with respect to certain substrates (plasmin-like and subtilisin-like) as well as a prolonged thrombolytic effect in connection to fibrin clots were demonstrated, which can be used in the development of new drugs for the thrombotic conditions treatment, the development of anti-hematoma drugs for external use as well as diagnostic kits for the pathology of the human hemostasis system.

**Keywords:** extracellular proteinases, fibrinolytic enzymes, hemostasis system, micromycetes, thrombolysis, thrombotherapy