

УДК 582.282.123.4 : 577.152.34

ASPERGILLUS TABACINUS – НОВЫЙ ПРОДУЦЕНТ ПРОТИВОТРОМБОТИЧЕСКИХ ПРОТЕАЗ

© 2024 г. В. Н. Лавренова^{1,*}, А. А. Осмоловский^{1,**}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119234 Москва, Россия

*e-mail: pkviktoria@mail.ru

**e-mail: aosmol@mail.ru

Поступила в редакцию 28.09.2023 г.

После доработки 27.10.2023 г.

Принята к публикации 28.12.2023 г.

Микромицеты рода *Aspergillus* — известные продуценты фибринолитических и активаторных к плазминогену протеаз. Однако для разработки новых противотромботических препаратов стоит использовать штаммы, секретируемые протеазы которых соответствуют следующим критериям: 1) проявляют одновременно антикоагулянтную, фибринолитическую и активаторную к плазминогену активности; 2) имеют узкую субстратную специфичность; 3) способны расщеплять субстраты двух последовательно идущих белковых компонентов системы гемостаза. Максимальная активность отобранного по данным критериям продуцента *Aspergillus tabacinus* при оптимальных условиях культивирования составила $87 \text{ Е} \times 10^{-3}$ по субстрату активированного протеина С S-2366 и $73 \text{ Е} \times 10^{-3}$ по субстрату тромбина Chromozym TH. Фибринолитическая активность полученного после высевания и диализа препарата составила 779.1 Е/мг белка.

Ключевые слова: антикоагулянты, протеазы, фибринолитики, *Aspergillus*.

DOI: 10.31857/S0026364824010022, **EDN:** mdcene

ВВЕДЕНИЕ

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

Лекарственными препаратами, предотвращающими формирование тромбов при различных заболеваниях, являются антикоагулянты, а вещества, которые помогают расщеплять уже существующие тромбы, называются фибринолитиками. Поскольку основной составляющей, поддерживающей структуру тромба, являются тяжи фибрина и фибриногена, фибринолитики по своей природе являются протеазами, способствующими расщеплению этих тяжей. Некоторые антикоагулянты также являются протеолитическими ферментами,

так как имитируют или активируют реакции, катализируемые белками собственной противосвертывающей системы организма, ряд компонентов которой является протеазами.

В настоящее время для терапии тромбозов используют несколько протеаз бактериального происхождения: стрептокиназу (Maksimenko, 2012), стафилокиназу (Vanrerschueren et al., 1997), септапептазу (Nair, 2022), наттокиназу (Kurosawa et al., 2015). Потенциал и разнообразие грибных протеаз вряд ли уступает бактериальным ферментам. В то время как бактерии специализируются на секретиции одного — трех специфических протеолитических ферментов, микроскопические грибы, как правило, выделяют целую смесь протеаз (до 12), действие которых дополняет друг друга (Wandersman, 1989; Pavlukova et al., 1998). Продуценты протеаз с антикоагулянтными и фибринолитическими свойствами известны среди представителей отделов *Mucoromycota*, *Ascomycota* и *Basidiomycota*, однако наибольшая доля исследованных на данный момент продуцентов противотромботических протеаз приходится на представителей рода *Aspergillus* семейства *Aspergillaceae* отдела *Ascomycota* (Osмоловский et al., 2021a, Sharma et al., 2021). Широкая

экологическая иррадиация данного рода, который включает более 800 видов, позволяет штаммам секретировать огромное разнообразие протеолитических ферментов, необходимых для адаптации к среде обитания. Несмотря на наличие более десятка известных продуцентов противотромботических протеаз среди микромицетов рода *Aspergillus*, поиск новых продуцентов является актуальной задачей, поскольку многие существующие антикоагулянты и фибринолитики имеют побочные эффекты. Кроме того, нахождение новых протеаз со своими уникальными физико-химическими свойствами может быть необходимо для разработки диагностических наборов, работающих в различных условиях.

Целью данной работы является анализ противотромботической активности внеклеточных протеаз нескольких недавно изученных штаммов рода *Aspergillus* (Surkova et al., 2023), формулирование критериев отбора перспективного штамма-продуцента и подбор условий культивирования для максимального выхода ферментного препарата выбранного штамма.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Условия культивирования продуцента. Микромицет *Aspergillus tabacinus* BEOFB3260m был получен из коллекции биологического факультета Белградского университета. Поверхностное культивирование продуцента проводили в чашках Петри на агаризованной среде Чапека. Для поддержания культуры пересевы производили раз в семь дней. Для последующего перевода культуры в глубинное культивирование производили пересев на скошенную агаризованную среду Чапека и через семь дней пересевали в посевную среду.

Пересев в посевную среду производили путем смыва споровой суспензии со скошенного агара. Культивирование на посевной среде (в %: сусло — 6.7, глюкоза — 1.0, пептон — 0.1, pH 5.5–6.0) производили в течение 48 ч при 28°C и постоянном перемешивании со скоростью 200 об/мин в качалочных колбах объемом 750 мл. Объем среды в одной колбе составлял 100 мл. Для индукции образования внеклеточных ферментов 3% объема посевной среды переносили в соответствующий объем ферментационной среды 1 (в %: глицерин — 7.0, глюкоза — 3.0, гидролизат рыбной муки — 3.0, MgSO_4 — 0.1, KH_2PO_4 — 0.1, pH 7.0) или ферментационной среды 2 (в %: глюкоза — 3.5, крахмал — 1.0, гидролизат рыбной муки — 0.5, пептон — 0.5, NaCl — 0.2, KH_2PO_4 — 0.05, MgSO_4 — 0.05, pH 7.0) (Osmolovskiy et al., 2018). Культивирование производили при

28°C и постоянном перемешивании со скоростью 200 об/мин в качалочных колбах объемом 750 мл. Объем среды в одной колбе составлял 100 мл.

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

После выбора оптимальной среды и времени культивирования продуцент выращивали в данных условиях, но на средах с разными значениями pH (4.0, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 и 8.0). Значение pH в средах корректировали при помощи титрования 0.1-нормальными р-рами HCl и NaOH. После выбора оптимального pH культивировали микромицет на данной среде при разных температурах (26, 28, 30 и 32°C).

Определение азоказеинолитической активности. Протеолитическую активность культуральной жидкости по отношению к азоказеину определяли спектрофотометрически при 37°C, измеряя поглощение растворимых продуктов реакции при 340 нм. Использовали 0.2%-й р-р азоказеина в 0.05 М Трис-HCl буфере, pH 8.2. Реакцию инициировали добавлением 200 мкл раствора белка к 100 мкл пробы фермента. Инкубацию ферментной пробы с субстратом проводили в течение 30 мин, после чего реакцию останавливали добавлением 300 мкл 10%-й трихлоруксусной кислоты. В контрольной пробе реакцию останавливали без 30-минутной инкубации. Все пробы центрифугировали в течение 5 мин при 14 000 g и измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости. За единицу ферментативной активности принимали то количество фермента, которое вызывало изменение оптической плотности на 0.01 ед.

Определение амидолитической активности с хромогенными пептидными субстратами. Специфическую ферментативную активность в культуральной жидкости определяли спектрофотометрически при 37°C при длине волны 405 нм по накоплению пара-нитроанилина после гидролиза хромогенных пептидных субстратов тромбина Chromozym TH и активированного протеина C S-2236 (Zvonareva et al., 2018). Субстрат растворяли в 0.05-молярном Трис-HCl буфере, pH 8.2, до концентрации 0.5 мг/мл. Далее смешивали 100 мкл субстрата с 50

мкл такого же буфера. Реакцию инициировали добавлением 200 мкл культуральной жидкости. Спустя 5 мин реакцию останавливали добавлением 200 мкл 50%-й уксусной кислоты. В качестве контроля использовали пробу без пятиминутной инкубации. За единицу ферментативной активности принимали число мкмоль пара-нитроанилина, образовавшегося в 1 мл р-ра за 1 мин.

Измерение концентрации белка. Концентрацию белка в культуральной жидкости и в пробах ферментного препарата проводили по методу Брэдфорд (Bradford, 197). Оптическую плотность в образцах после добавления Кумасси G250 измеряли при 595 нм.

Получение препарата секретируемых белков. Препарат секретируемых белков получали методом высаливания. К 2 л культуральной жидкости, полученной после культивирования микромицета в течение оптимального времени в ферментационной среде при подобранных значениях pH и температуры, добавляли сульфат аммония постепенно до степени насыщения 80%. Спустя 48 ч инкубации при 4°C отделяли белковый осадок центрифугированием при 15 000 g в течение 40 мин. Осадок ресуспендировали в 10 мл 0.005-молярного Трис-НСl буфера, pH 8.2, и помещали в диализный мешок, после чего проводили диализ против того же буфера. После диализа нерастворимые белки были отделены центрифугированием при описанных выше параметрах, а супернатант был лиофильно высушен и далее хранился при –20°C.

Определение фибринолитической активности. Протеолитическую активность р-ра ферментного препарата по отношению к фибриногену определяли спектрофотометрически при 37°C модифицированным методом Ансона-Хагихары (Anson, 1935; Hagihara et al., 1958), измеряя поглощение тирозина в растворимой фракции реакционной смеси при 275 нм. Реакцию инициировали добавлением 200 мкл 1%-го р-ра белка в 0.05-молярном Трис-НСl буфере, pH 8.2, к 100 мкл пробы фермента. Спустя 10 мин реакцию останавливали добавлением 300 мкл 10%-й трихлоруксусной кислоты. В контрольной пробе реакцию останавливали без 10-минутной инкубации. После пятиминутного центрифугирования проб при 14 000 g измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости. За единицу ферментативной активности принимали число мкмоль тирозина, образовавшегося в 1 мл р-ра за 1 мин.

Эксперименты выполнены в трех повторностях. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программ MS Excel 2013 и Statistica 7.0. Для сравнения данных

использовали U-критерий Манна-Уитни, различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Результаты представлены в виде среднего значения с ошибкой среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Среди представителей рода *Aspergillus* известно довольно много штаммов, продуцирующих фибринолитические (Shirasaka et al., 2012; Kotb et al., 2015; Chimbekujwo et al., 2020; Afini et al., 2016; Shilpa et al., 2019; Yadav, Siddalingeshwara, 2016; Galiakberova et al., 2016; Popova et al., 2021) и антикоагулянтные (Osmolovskiy et al., 2015) протеазы, однако, эти ферменты обладают только одной из упомянутых выше активностей. В то же время для разработки нового высокоэффективного противотромботического средства стоит использовать протеолитические препараты с несколькими активностями, поскольку в современной терапии, как правило, используют одновременно два или три лекарства со следующими свойствами: антикоагулянт, прямой фибринолитик, активатор плазминогена (собственного человеческого фермента, осуществляющего протеолитическое расщепление фибрина). Наличие всех трех описанных активностей было принято как основной критерий для анализа перспективности 15 недавно изученных штаммов рода *Aspergillus* в качестве продуцентов противотромботических протеаз (Surkova et al., 2023).

Свойства 15 анализируемых штаммов суммированы в табл. 1. Положительной антикоагулянтной активностью считалась обнаруженная после культивирования хотя бы на одной ферментационной среде высокая ($> 50 \text{ E} \times 10^{-3}$) амилолитическая активность в отношении хромогенного субстрата активированного протеина С (S-2366), так как система протеина С является одной из важнейших собственных антикоагулянтных систем человеческого организма. Положительной прямой фибринолитической активностью считалась детекция фибринолиза в результате воздействия на фибриновую пластину культуральной жидкости после роста штамма хотя бы на одной из двух ферментационных сред. Аналогичным образом по результатам метода фибриновых пластин определяли положительную активаторную к плазминогену активность.

Одновременно антикоагулянтную, фибринолитическую и активаторную к плазминогену активности проявляли секретируемые протеазы *Aspergillus aureolatus*, *A. creber*, *A. protuberus*, *A. tabacinus*, *A. tennesseensis*. Следующим критерием для отбора штамма-продуцента было предложено считать

субстратную специфичность секретируемых протеаз. Для культуральных жидкостей *A. aureolatus* и *A. tennesseensis* показана высокая протеолитическая активность в отношении нескольких хромогенных пептидных субстратов (Chromozym ТН, S-2251, S-2765, S-2444, S-2366), в то время как ферменты оставшихся трех штаммов более специфичны (*A. creber* и *A. protuberus* — в отношении S-2366, *A. tabacinus* — в отношении Chromozym ТН и S-2366) и более предпочтительны для дальнейшего анализа.

В качестве третьего критерия отбора штамма-продуцента было предложено использовать наличие активности по отношению к субстратам двух протеаз, следующих друг за другом в каскаде последовательно активирующихся белков гемостаза. Так, культуральная жидкость *A. tabacinus* активна в отношении субстратов тромбина и активированного протеина С, в то время как активация протеина С в кровотоке происходит именно под действием тромбина. Такая особенность может привести к гораздо большему уровню антикоагулянтной протеин С-подобной активности *in vivo*, чем в случае протеаз, не обладающих тромбиноподобной активностью, как протеазы *A. creber* и *A. protuberus*. По совокупности трех выдвинутых критериев для дальнейших экспериментов был выбран штамм *A. tabacinus* BEOFB3260m.

Для получения максимального выхода препарата протеолитических ферментов изучали динамику накопления протеаз в культуральной жидкости при росте *A. tabacinus* на разных ферментационных

средах. Начиная со вторых суток культивирования на двух средах с начальным pH 7.0 при 28°C, каждые 24 ч отбирали аликвоты культуральной жидкости и измеряли в них концентрацию белка как показатель роста культуры, азоказеинолитическую активность в качестве показателя общей активности протеаз и специфические активности по хромогенным пептидным субстратам, по отношению к которым культуральная жидкость была наиболее активна в предыдущих экспериментах: Chromozym ТН, S-2366 (Surkova et al., 2023).

При росте на ферментационной среде 1 (рис. 1) максимальная активность по S-2366 была на пятые сутки культивирования ($39 \text{ E} \times 10^{-3}$), по Chromozym ТН — на четвертые сутки ($22 \text{ E} \times 10^{-3}$), а азоказеинолитическая активность постепенно снижалась, начиная со вторых суток. При росте на ферментационной среде 2 (рис. 2) были достигнуты более высокие значения активностей: максимальная активность по S-2366 и по Chromozym ТН была на седьмые сутки культивирования ($87 \text{ E} \times 10^{-3}$ и $73 \text{ E} \times 10^{-3}$ соответственно), по азоказеинолитической активности было два локальных максимума — на шестые и десятые сутки. Следует отметить, что активности культуральной жидкости по пептидным субстратам, обнаруженные при культивировании на ферментационной среде 2, превысили уровни аналогичных протеолитических активностей для семи изученных ранее представителей рода *Aspergillus* (Osmolovskiy et al., 2021b).

Таблица 1. Свойства анализируемых штаммов по критериям выбора перспективного продуцента противотромботических протеаз (по: Surkova et al., 2023)

Штамм	Активность		
	антикоагулянтная	фибринолитическая	активаторная к плазминогену
<i>Aspergillus aureolatus</i> BEOFB3320m	+	+	+
<i>A. calidoustus</i> BEOFB3220m	—	—	+
<i>A. creber</i> BEOFB3250m	+	+	+
<i>A. europaeus</i> BEOFB382m	—	+	+
<i>A. jensenii</i> BEOFB3200m	+	—	—
<i>A. melleus</i> BEOFB3180m	—	+	+
<i>A. penicilloides</i> BEOFB3190m	—	—	+
<i>A. proliferans</i> BEOFB3280m	—	—	—
<i>A. protuberus</i> BEOFB3240m	+	+	+
<i>A. pseudoglaucus</i> BEOFB3170m	—	—	—
<i>A. domesticus</i> BEOFB3270m	—	—	—
<i>A. ruber</i> BEOFB3150m	+	—	+
<i>A. tabacinus</i> BEOFB3260m	+	+	+
<i>A. tennesseensis</i> BEOFB3310m	+	+	+
<i>A. tubingensis</i> BEOFB3300m	—	+	+

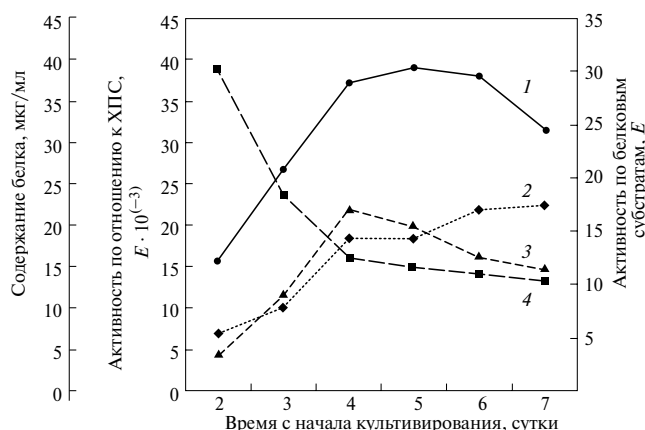


Рис. 1. Динамика накопления протеаз в культуральной жидкости при росте *Aspergillus tabacinus* на ферментационной среде 1: 1 – активность по субстрату S-2366; 2 – концентрация белка; 3 – активность по субстрату Chromozym ТН; 4 – азоказеинолитическая активность.

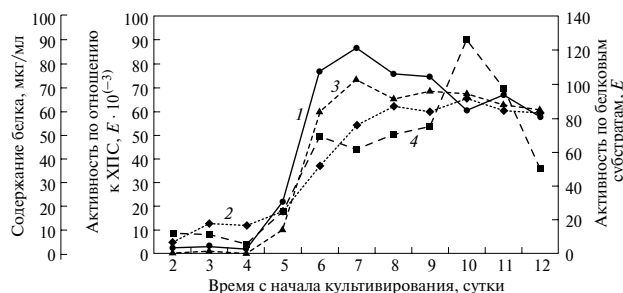


Рис. 2. Динамика накопления протеаз в культуральной жидкости при росте *Aspergillus tabacinus* на ферментационной среде 2: 1 – активность по субстрату S-2366; 2 – концентрация.

Исследование влияния pH и температуры на продукцию протеаз *A. tabacinus* проводили при культивировании на ферментационной среде 2 в течение семи суток. Было обнаружено, что оптимальным начальным значением pH среды культивирования является 7–8 (рис. 3). При увеличении начального pH среды от 4 до 8 наблюдается возрастание всех измеренных показателей: концентрации белка в семидневной культуральной жидкости, азоказеинолитической активности и активностей по отношению к Chromozym ТН и S-2236. Однако между показателями для pH 7 и для pH 8 нет достоверной разницы.

Влияние температуры на продукцию протеаз *A. tabacinus* исследовали с использованием ферментационной среды 2, начальное значение pH которой составляло 7. Спустя семь суток культивирования измеряли концентрацию белка в среде и активность по S-2366, далее рассчитывали удельную активность протеаз культуральной жидкости

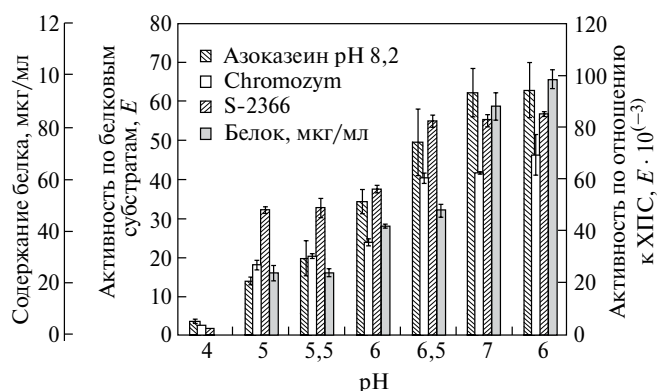


Рис. 3. Влияние pH ферментационной среды 2 на продукцию протеаз *Aspergillus tabacinus*.

по данному субстрату. Было обнаружено, что оптимальной температурой для продукции протеаз является 28°C (рис. 4).

После подбора оптимальных условий для культивирования методом высаливания с последующим диализом и лиофилизацией был получен частично очищенный препарат секретируемых протеаз *A. tabacinus*. Результаты измерения фибринолитической активности препарата, а также сравнение с известными фибринолитиками представлены в табл. 2, по которой можно сделать вывод, что фибринолитическая активность ферментного препарата *A. tabacinus* превышает подобную активность у других ранее изученных протеаз штаммов рода *Aspergillus* (Osmolovskiy et al., 2014; Osmolovskiy et al., 2021), а также известного продуцента фибрино- и фибринолитиков *Sarocladium strictum* (Korinenko et al., 2021).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Было показано, что *Aspergillus tabacinus* является продуцентом протеаз с прямой фибринолитической, активаторной к плазминогену, а также протеин С-подобной и тромбиноподобной активностями, что делает данный микромицет привлекательным для разработки фармакологического препарата, оказывающего воздействие на разные стадии процесса тромбообразования. Максимальный уровень секреции протеазы *A. tabacinus* наблюдался на седьмые сутки на ферментационной среде 2. Условия культивирования — 28°C, начальное pH среды 7–8. Фибринолитическая активность лиофилизированного ферментного препарата *A. tabacinus* после высаливания и последующего диализа превысила показатели для других перспективных продуцентов, что свидетельствует о возможном применении ферментного препарата *A. tabacinus* в качестве тромболитика

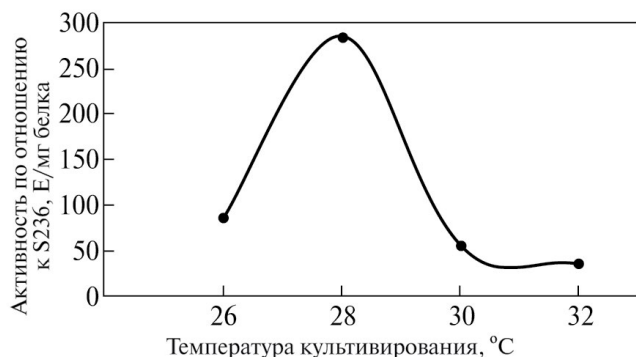


Рис. 4. Влияние температуры культивирования на ферментационной среде 2 на продукцию протеаз *Aspergillus tabacinus*.

и антиагреганта, так как расщепление фибриногена уничтожает одну из белковых платформ для агрегации тромбоцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Afini A.V.M., Sooraj S.N., Smitha K.V. et al. Production and partial characterization of fibrinolytic enzyme from a soil isolate *Aspergillus carbonarius* S-CSR-0007. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2016. V. 8. P. 142–148. <http://dx.doi.org/10.22159/ijpps.2016v8i12.15069>
- Anson M. Crystalline carboxypolypeptidase. *Science*. 1935. V. 81 (2106). P. 467–468.
- Bokarev I.N., Popova L.V. Modern problems of thrombosis of arteries and veins. *Prakticheskaya meditsina*. 2014. V. 6 (82). P. 13–17 (in Russ.).
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Chimbekujwo K.I., Ja'afaru M.I., Adeyemo O.M. Purification, characterization and optimization conditions of protease produced by *Aspergillus brasiliensis* strain BCW2. *Sci. Afr.* 2020. V. 8. P. e00398. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00398>
- Galiakberova A.A., Bednenko D.M., Kreyer V.G. et al. Formation and properties of the extracellular proteinase of *Aspergillus flavus* O-1 micromycete active against fibrillar proteins. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2021. V. 57 (5). P. 586–593. <http://dx.doi.org/10.1134/S0003683821050069>
- Hagihara B., Matsubara H., Nakai M. et al. Crystalline bacterial proteinase. *J. Biochem.* 1958. V. 45 (3). P. 185–194.
- Kornienko E.I., Osmolovskiy A.A., Kreier V.G. et al. Characteristics and properties of the complex of proteolytic enzymes of the thrombolytic action of the micromycete *Sarocladium strictum*. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2021. V. 57 (1). P. 57–64 (in Russ.). <http://dx.doi.org/10.1134/S0003683821010129>
- 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* AUMC9735. *Biologia*. 2015. V. 70. P. 1565–1574. <https://doi.org/10.1515/biolog-2015-0192>
- Kurosawa Y., Nirengi S., Homma T. et al. A single-dose of oral nattokinase potentiates thrombolysis and anti-coagulation profile. *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 11601–11607. <https://doi.org/10.1038/srep11601>
- Maksimenco A.V. Cardiac biopharmaceuticals in the concept of targeted drug transport: practical results and research prospects. *Acta Naturae*. 2012. T. 4 (3). P. 76–86 (in Russ.).
- Nair S.R., C S.D. Serratiopeptidase: an integrated view of multifaceted therapeutic enzyme. *Biomolecules*. 2022. V. 12 (10). P. 1468–1479. <https://doi.org/10.3390/biom12101468>
- Osmolovskiy A.A., Zvonareva E.S., Kreier V.G. et al. The effects of micromycete extracellular proteases of the *Aspergillus* genus on the proteins of the haemostatic system. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2014. V. 40 (6). P. 634–639. <http://dx.doi.org/10.1134/S1068162014060120>
- Osmolovskiy A.A., Kreier V.G., Baranova N.A. et al. Properties of extracellular proteinase — an activator of protein C in blood plasma formed by *Aspergillus ochraceus*. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2015. V. 51 (1). P. 95–101. <http://dx.doi.org/10.1134/S0003683815010123>
- Osmolovskiy A.A., Lukianova A.A., Zvonareva E.S. et al. Combined microbiological approach to screening of producers of proteases with hemostasis system proteins activity among micromycetes. *Biotech. Rep.* 2018. V. 19. P. e00265. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00265>
- Osmolovskiy A.A., Schmidt L., Orekhova A.V. et al. Effect of proteinase from *Aspergillus fumigatus* on blood plasma proteins. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Biol.* 2021. V. 76. P. 71–76 (in Russ.).
- Pavlyukova E.B., Belozersky M.A., Dunaevskiy Yu.E. Extracellular proteolytic enzymes of filamentous fungi. *Biokhimiya*. 1998. V. 63 (8). P. 899–928 (in Russ.).
- Popova E.A., Kreyer V.G., Komarevsev S.K. et al. Properties of extracellular proteinase of the micromycete *Aspergillus ustus* 1 and its high activity during fibrillary-proteins hydrolysis. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2021. V. 57 (2). P. 200–205 (in Russ.). <http://dx.doi.org/10.1134/S0003683821020125>
- Sharma C., Osmolovskiy A., Singh R. Microbial fibrinolytic enzymes as anti-thrombotics: production, characterization and prodigious biopharmaceutical applications. *Pharmaceutics*. 2021. V. 13 (11). P. 1880–1911. <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics13111880>
- Shilpa H.K., Ambekar J.G., Dongre N.N. et al. Application of fibrinolytic enzyme from *Aspergillus tamarii* — in vitro studies. *Eur. J. Pharm. Med. Res.* 2019. V. 6. P. 560–562. <http://dx.doi.org/10.18231/2394-6377.2018.0092>
- Shirasaka N., Naitou M., Okamura K. et al. Purification and characterization of a fibrinolytic protease from *Aspergillus oryzae* KSK-3. *Mycoscience*. 2012. V. 53. P. 354–364. <https://doi.org/10.1007/S10267-011-0179-3>
- Surkova D., Lavrenova V., Klyagin S. et al. Screening of proteases produced by *Aspergillus* micromycetes active against proteins of the hemostasis system. *Curr. Med. Mycol.* 2023. V. 9 (1). P. 8–13. <https://doi.org/10.22034/cmm.2023.150674>

- Vanderschueren S., Dens J., Kerdsinchai P. et al. Randomized coronary patency trial of double-bolus recombinant staphylokinase versus front-loaded alteplase in acute myocardial infarction. *Am. Heart J.* 1997. V. 134 (2, pt 1). P. 213–219.
[https://doi.org/10.1016/s0002-8703\(97\)70127-3](https://doi.org/10.1016/s0002-8703(97)70127-3)
- Wandersman C. Secretion, processing and activation of bacterial extracellular proteases. *Mol. Microbiol.* 1989. V. 3 (12). P. 1825–1831.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1989.tb00169.x>
- Yadav S., Siddalingeshwara K.G. Biosynthesis of clot busting fibrinolytic enzyme from *Aspergillus japonicum* by supplementing carbon sources. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 2016. V. 5 (3). P. 860–864.
<http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.503.099>
- Zvonareva E.S., Osmolovskiy A.A., Kreier V.G. et al. Production of proteinase with plasmin-like and prekallikrein activating activity by the micromycete *Aspergillus terreus*. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2018. V. 54 (2). P. 206–210 (in Russ.).
<http://dx.doi.org/10.1134/S0003683818020151>
- Бокарев И.Н., Попова Л.В. (Bokarev, Popova) Современные проблемы тромбозов артерий и вен // *Практ. мед.* 2014. Т. 6. № 82. С. 13–17.
- Галиакберова А.А., Бедненко Д.М., Крейер В.Г. и др. (Galiakberova et al.) Образование и свойства внеклеточной протеиназы микромицета *Aspergillus flavus* O-1, активной по отношению к фибриллярным белкам // *Прикл. биохим. микробиол.* 2021. Т. 57. № 5. С. 458–466.
- Звонарева Е.С., Осмоловский А.А., Крейер В.Г. и др. (Zvonareva et al.) Продукция протеиназ с плазминоподобной и активирующей прекалликреин активностью микромицетом *Aspergillus terreus* // *Прикл. Биохим. микробиол.* 2018. Т. 54. № 2. С. 195–200.
- Корниенко Е.И., Осмоловский А.А., Крейер В.Г. и др. (Kornienko et al.) Характеристика и свойства комплекса протеолитических ферментов тромболитического действия микромицета *Sarocladium strictum* // *Прикл. биохим. микробиол.* 2021. Т. 57. № 1. С. 46–53.
- Максименко А.В. (Maksimenko) Кардиологические биофармацевтики в концепции направленного транспорта лекарств: практические результаты и исследовательские перспективы // *Acta Naturae*. 2012. Т. 4. № 3. С. 76–86.
- Осмоловский А.А., Звонарева Е.С., Крейер В.Г. и др. (Osmolovskiy et al.) Воздействие внеклеточных протеаз микромицетов рода *Aspergillus* на белки системы гемостаза // *Биоорг. химия*. 2014. Т. 40. № 6. С. 688–694.
- Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А. и др. (Osmolovskiy et al.) Свойства внеклеточной протеиназы — активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *Aspergillus ochraceus* // *Прикл. биохим. микробиол.* 2015. Т. 51. № 1. С. 86–92.
- Осмоловский А.А., Звонарева Е.С., Крейер В.Г. и др. (Osmolovskiy et al.) Тромболитический потенциал внеклеточной протеиназы микромицета *Aspergillus terreus* 2 // *Микология и фитопатология*. 2021. Т. 55. № 3. С. 225–228.
- Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А. и др. (Osmolovskiy et al.) Протеолитические ферменты мицелиальных грибов с плазминоподобной и активаторной к плазминогену активностью // *Усп. совр. биол.* 2021. Т. 141. № 5. С. 467–482.
- Осмоловский А.А., Шмидт Л., Орехова А.В. и др. (Osmolovskiy et al.) Влияние протеиназы *Aspergillus fumigatus* на белки плазмы крови // *Вестник Московского университета. Биол.* 2021. Т. 76. С. 71–76.
- Павлюкова Е.Б., Белозерский М.А., Дунаевский Я.Е. (Pavlyukova et al.) Внеклеточные протеолитические ферменты мицелиальных грибов // *Биохимия*. 1998. Т. 63. № 8. С. 1059–1089.
- Попова Е.А., Крейер В.Г., Комаревцев С.К. и др. (Popova et al.) Свойства высокоактивной в отношении фибриллярных белков внеклеточной протеиназы, образуемой микромицетом *Aspergillus ustus* 1 // *Прикл. биохим. микробиол.* 2021. Т. 57. № 2. С. 138–144.

Aspergillus tabacinus* as a producer of antithrombotic proteases*V.N. Lavrenova^{a,#} and A.A. Osmolovskiy^{a,##}**^a*M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*[#]*e-mail: pkviktoria@mail.ru*^{##}*e-mail: aosmol@mail.ru*

Microfungi of the genus *Aspergillus* are well-known as producers of fibrinolytic and plasminogen activating proteases. But for development of new antithrombotics we should use strains which extracellular proteases correspond to these criteria: 1) demonstrate anticoagulant, fibrinolytic and plasminogen activating activities at the same time; 2) have narrow substrate specificity; 3) are able to hydrolase substrates of two following each other proteins of hemostasis system. According to these criteria *Aspergillus tabacinus* was chosen. Maximal activities of culture liquid of this strain grown in optimal conditions were $87 \text{ E} \times 10^{-3}$ with activated protein C substrate S-2366 and $73 \text{ E} \times 10^{-3}$ with thrombin substrate Chromozym TH. Fibrinogenolytic activity of lyophilized enzyme preparation after ammonium sulfate precipitation and dialysis was 779.1 E/mg of protein.

Keywords: *Aspergillus*, anticoagulants, fibrinolytics, proteases.