

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 577.152.34:582.282.123.4

Сравнение антикоагулянтного действия *in vitro* протеаз, секретируемых микромицетом *Aspergillus ochraceus* и содержащихся в яде змей

А.А. Осмоловский^{1, *} , И. Домбек², С. Хауке³, А.В. Орехова^{1, 4}, В.Г. Крейер¹

¹Кафедра микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

²Faculty of Natural Sciences, University of Hohenheim, Germany, 70599, Stuttgart, Garbenstraße 13;

³School of Engineering and Design, Technical University of Munich, Germany, 85748, Garching, Boltzmann str. 15;

⁴ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины» Минздрава России, Россия, 101990, г. Москва, Петроверигский пер., д. 10.

*e-mail: aosmol@mail.ru

Изучено антикоагулянтное действия *in vitro* протеазы, секретируемой микромицетом *Aspergillus ochraceus* L-1, и содержащихся в яде змей (препараты Protac® и RVV-X®) протеаз. Показана выраженность действия протеазы микромицета по отношению к плазмам человека и теплокровных животных, а также плазмам человека, дефицитным по определенным факторам системы гемостаза в сопоставлении с протеазами змей в реакциях с хромогенными пептидными субстратами активированного протеина С и фактора X, а также с помощью теста на активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ). Были подобраны оптимальное время прединкубации протеазы микромицета *A. ochraceus* L-1 с плазмой крови человека (3 мин) и концентрация хромогенного пептидного субстрата активированного протеина С (от 0,1 до 0,5 мг/мл), необходимые для корректного определения протеина С.

Ключевые слова: протеазы яда змей, протеаза *Aspergillus ochraceus*, антикоагулянтные ферменты, активаторы белков гемостаза, хромогенные пептидные субстраты, тест АЧТВ

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-1-6

Протеолитические ферменты мицелиальных грибов из космополитного рода *Aspergillus* различаются по спектру воздействия на белки системы гемостаза человека и представляют значительный интерес и как факторы патогенности, и как потенциальные компоненты препаратов медицинского назначения [1–5]. Проявляя свойства прямых фибрино- и фибриногенолитиков или активаторов проферментов системы гемостаза, они все чаще рассматриваются в качестве активирующих реагентов в наборах для диагностики *in vitro* некоторых белков плазменного гемостаза, таких как протеин С и фактор X [3, 6]. В силу наследственных или приобретенных заболеваний недостаток этих белков ведет к риску развития тромбоэмболических осложнений, что требует выявления уровня их активности для проведения корректной терапии у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями [7]. Содержание данных белков в плазме определяется при помощи специальных диагностических наборов, содержащих в качестве активирующего протеин С реагента сериновую протеа-

зу из яда южно-американского щитомордника *Agkistrodon contortrix contortrix*, а в качестве активирующего фактор X реагента – сериновую протеазу из яда гадюки Рассела (*Daboia russellii*) [8]. Ввиду сложности получения рекомбинантных форм змеиных протеаз-активаторов, поиск альтернативных протеолитических ферментов со схожими свойствами представляется весьма актуальным [9]. Одним из таких ферментов является внеклеточная сериновая протеаза микромицета *Aspergillus ochraceus* L-1, которая представляет собой негликозилированный белок с молекулярной массой 35 кДа, способный активировать протеин С и фактор X плазмы крови человека аналогично змеиным активаторам и показавший возможность применения для определения этих белков плазменного гемостаза хромогенным методом [10–12]. Возможность выявления указанных проферментов системы гемостаза с помощью протеазы *A. ochraceus* L-1 клоттинговым методом, а также ее воздействие на белки плазмы других млекопитающих остались неизученными.

Целью настоящей работы было сравнительное изучение антикоагулянтного действия *in vitro* протеазы, секретируемой микромицетом *A. ochraceus* L-1, и содержащихся в яде змей протеаз, а также определение оптимальных параметров детекции протеина С в плазме с помощью протеазы *A. ochraceus* L-1.

Материалы и методы

Получение протеазы *A. ochraceus* L-1. Для получения внеклеточной протеазы продуцент — микромицет *A. ochraceus* L-1 — культивировали в глубинных условиях в две последовательные стадии, сначала на посевной среде (состав в %: сусло — 6,7, глюкоза — 1, пептон — 0,1; pH 5,5–6,0), а затем — на ферментационной среде (состав в %: глюкоза — 3,5, гидролизат рыбной муки — 1, NaCl — 0,2, крахмал — 0,125, пептон — 0,1, KH_2PO_4 — 0,05, MgSO_4 — 0,05; pH 5,5–6,0), как было предложено ранее [13, 14]. Из культуральной жидкости, предварительно отделенной от биомассы фильтрованием через бумажный фильтр, проводили осаждение белков сульфатом аммония (степень насыщения — 0,7) с последующим выделением протеазы в соответствии с разработанным ранее способом, включающим этапы гидрофобной (на фенил-сефарозе, GE Healthcare, США) ионообменной (на ДЭАЭ-сефарозе, GE Healthcare, США) и гель-проникающей (на Сефадексе G-50, Pharmacia, Швеция) хроматографии [15]. Сорбенты для хроматографии уравнивали 50 мМ Трис-НСI-буфером, pH 8,0. Для подтверждения гомогенности выделенной протеазы проводили денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле по методу Лэммли (концентрация акриламида в концентрирующем геле — 6%, в разделяющем — 12,5%).

Определение белка. Количественное определение белка в пробах проводили спектрофотометрически при 280 нм в кювете с длиной пути 1 см [16].

Определение активирующей проферменты системы гемостаза активности. Активирующее действие протеиназы *A. ochraceus* L-1 изучали с плазмой крови человека в реакциях с хромогенными пептидными субстратами активированного протеина С (Glp-Pro-Arg-pNA) и фактора X (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA) [3]. Для проведения реакции к 200 мкл раствора фермента (0,2 мг/мл) добавляли 50 мкл образца плазмы, разведенной в 2 раза 0,05 М Трис-НСI-буфером, pH 8,2, прединкубировали 5 мин при 37°C. Далее к инкубационной смеси добавляли к 100 мкл 0,05%-ного (0,05 М Трис-НСI-буфер, pH 8,2) раствор соответствующего субстрата и продолжали реакцию при тех же условиях, регистрируя ее кинетику в течение 5 мин. Реакцию останавливали 200 мкл 50%-ной уксусной кислоты [17]. За единицу активности (Е) принимали количество мкмоль п-нитроанилина, отщепившегося от хромогенного субстрата за 1 мин.

Реакции проводили перемешиванием при 37°C либо в термошейкере TS-100 (BioSan, Латвия), либо в термостатированном кюветном отделении спектрофотометра BioSpectrometer® kinetic (Erppendorf, Германия). Измерение оптической плотности растворов проводили на том же спектрофотометре.

Определение активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). АЧТВ определяли с помощью набора реактивов «АЧТВ-тест» НПО «Ренам» (Россия) в соответствии с инструкцией. К 100 мкл активирующего агента добавляли 100 мкл плазмы, выдерживали 3 мин при 37°C, после чего к смеси добавляли 100 мкл 0,025 М раствора CaCl_2 и засекали время образования сгустка плазмы (в секундах). Реакции проводили на коагулометре ЭМКО-02 (Россия). В качестве активирующих реагентов использовали АЧТВ-реагент (на основе соевых фосфолипидов и эллаговой кислоты) (Ренам, Россия), АЧТВ-реагент с активатором (Ренам, Россия), препараты Protac® и RVV-X® (DSM, Швейцария) и выделенную протеазу *A. ochraceus* L-1. Образцами плазмы служили лиофилизированные нормальная плазма человека, патологическая плазма (плазма со сниженным содержанием факторов системы гемостаза) человека, дефибрированная плазма, плазма со сниженным уровнем протеина С, плазмы, дефицитные по факторам II, X, XI, XII (Ренам, Россия), а также плазмы животных: кролика (Аллерген, Россия), крысы, кошки, быка и свиньи (Sigma-Aldrich, США). Перед проведением реакции к образцам плазмы добавляли по 1 мл 0,05 М Трис-НСI-буфера, pH 8,2 и выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин. АЧТВ рассчитывали по формуле: $(t_o - t_k)/t_k \times 100\%$, где t_o — время (с) свертывания плазмы в присутствии протеазы микромицета (опыт), t_k — время (с) свертывания плазмы с добавлением АЧТВ-реагента (контроль).

Определение параметров детекции протеина С с помощью протеазы *A. ochraceus* L-1. Для практического использования протеазы микромицета *A. ochraceus* L-1 в лабораторной диагностике определяли оптимальное время прединкубации с плазмой человека (исследовали временные интервалы в 30, 60, 120, 180, 240, 300 и 600 с) и оптимальную для использования концентрацию субстрата Glp-Pro-Arg-pNA (исследовали концентрации 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 мг/мл).

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 их обсуждение

Возможность применения внеклеточной протеазы микромицета *A. ochraceus* для определения содержания протеина С и фактора Х плазмы крови, показанная ранее [11, 12], требует дополнительного изучения как выраженности ее действия, так и вызываемого антикоагулянтного эффекта в условиях *in vitro* в сравнении с имеющимися аналогами — препаратами Protac® (протеаза-активатор протеина С) и RVV-X® (протеаза-активатор фактора Х) для разработки полноценных диагностикумов на ее основе.

В качестве тестируемых образцов использовали плазмы человека и теплокровных животных, а также плазмы человека, дефицитные по определенным факторам системы гемостаза. Результаты сопоставления выраженности действия протеазы *A. ochraceus* L-1 с протеазами змей по отношению к различным плазмам представлены в табл. 1 и 2.

Как видно из табл. 1, протеаза *A. ochraceus* L-1 способна активировать как протеин С, так и фактор Х во всех использованных плазмах человека и теплокровных животных. В случае активации протеина С наибольшая выраженность действия протеазы микромицета была к плазме человека, в то время как протеаза южноамериканского щитомордника (препарат Protac®) оказалась наиболее активна в отношении плазмы быка, в реакции с которой протеаза микромицета была наименее активна. По отношению к другим плазмам обе

протеазы продемонстрировали различную выраженность действия. Интересно отметить, что протеаза Protac® не активировала протеин С плазмы крови крысы, в противоположность протеазе *A. ochraceus* L-1, активирующее действие которой было весьма значительным.

При изучении активирующей фактор Х активности в пробах с теми же плазмами сопоставление выраженности действия протеаз *A. ochraceus* L-1 и RVV-X® показало определенную схожесть: обе протеазы были наиболее активны по отношению к плазме быка, а наименее — к плазме крысы.

Возможно, такая избирательность в специфичности протеаз возникла по мере их эволюции в соответствии с занимаемыми продуцируемыми их организмами нишами: хорошо известно, что основными жертвами змей в природе являются прежде всего теплокровные животные, а аспергиллы служат причиной развития микозов у человека и других теплокровных млекопитающих, локально нарушая гемостаз в местах проникновения.

По отношению к плазмам человека, дефицитным по разным факторам системы гемостаза, исследуемые протеазы также проявили различную активность (табл. 2). Так, протеаза препарата Protac® активировала протеин С в большинстве образцов плазм (кроме плазмы со сниженным уровнем протеина С и плазмы, дефицитной по фактору II), а протеаза *A. ochraceus* L-1 также активировала этот белок, но с незначительно меньшим эффектом. Вероятно, снижение активности

Таблица 1
Выраженность действия протеаз *A. ochraceus* L-1 к плазмам человека и животных в сравнении с протеазами из яда змей

Плазма	Активаторная к протеину С активность, %		Активаторная к Х фактору активность, %	
	Протеаза <i>A. ochraceus</i>	Protac®	Протеаза <i>A. ochraceus</i>	RVV-X®
Нормальная человека	100,0	59,4 ± 1,0	59,5 ± 1,0	30,0 ± 1,0
Кролика	18,1 ± 1,0	45,3 ± 1,0	52,6 ± 1,0	61,5 ± 1,0
Свиньи	44,8 ± 1,0	35,6 ± 1,0	34,5 ± 1,0	26,3 ± 1,0
Кошки	17,0 ± 1,0	86,7 ± 1,0	41,1 ± 1,0	36,1 ± 1,0
Крысы	92,6 ± 1,0	0,0	14,1 ± 1,0	16,5 ± 1,0
Быка	21,2 ± 1,0	100,0	100,0	100,0

Таблица 2
Выраженность действия протеаз *A. ochraceus* L-1 к плазмам, дефицитным по определенным факторам системы гемостаза, в сравнении с протеазами из яда змей

Плазма	Активаторная к протеину С активность, %		Активаторная к Х фактору активность, %	
	Протеаза <i>A. ochraceus</i>	Protac®	Протеаза <i>A. ochraceus</i>	RVV-X®
Нормальная человека	100,0	100,0	100,0	100,0
Дефибринированная	89,3 ± 1,0	100	44,2 ± 1,0	21,4 ± 1,0
Дефицитная по фактору II	73,0 ± 1,0	84,1 ± 1,0	14,2 ± 1,0	61,2 ± 1,0
Со сниженным уровнем протеина С	53,2 ± 1,0	54,4 ± 1,0	83,4 ± 1,0	89,8 ± 1,0
Дефицитная по фактору X	85,5 ± 1,0	100	0,0	0,0
Дефицитная по фактору XI	74,4 ± 1,0	100	18,7 ± 1,0	0,0
Дефицитная по фактору XII	28,8 ± 1,0	100	12,2 ± 1,0	0,0

протеазы микромицета могут вызывать различные ингибиторы плазмы. Наименьшую активаторную к протеину С активность, как и активаторную к фактору Х активность протеаза *A. ochraceus* L-1 проявила с плазмой, дефицитной по фактору XII. Препарат RVV-X® оказался неактивен в плазмах, дефицитных по факторам XI и XII, тогда как протеаза микромицета активность с ними проявляла. Можно предположить, что обе протеазы не были активны в образце плазмы, дефицитной по фактору Х.

Действие протеолитических ферментов различных организмов как экзогенных активаторов белков системы гемостаза требует более детального изучения как отдельных мишеней, так и общего влияния на каскад свертывания крови. Одним из таких показателей *in vitro* является антикоагулянтная активность протеаз, измеряемая по удлинению времени свертывания образца плазмы — АЧТВ-тест, напрямую зависящего от уровня содержания протеина С в образце плазмы. Как показано на рис. 1А, АЧТВ при использовании протеаз *A. ochraceus* L-1 и Protac® оказалось сходно при их инкубации с нормальной плазмой, патологической плазмой и плазмой со сниженным уровнем протеина С. Протеаза RVV-X® в АЧТВ-тесте оказалась неактивна. Результаты теста АЧТВ подтверждают полученные ранее данные по определению содержания с их помощью протеина С в различных образцах плазмы [11] и позволяют рассматривать протеазу *A. ochraceus* L-1 для определения уровня содержания протеина С при помощи как хромогенного, так и коагулянтного методов.

Изучение АЧТВ с помощью протеазы *A. ochraceus* L-1 с образцами плазм других млекопитающих подтвердило выраженность действия этого фермента (рис. 1Б). Так, по сравнению с контрольными образцами (без протеазы), АЧТВ значительно удлинялось под действием протеазы микромицета в плазмах свиньи и крысы, незначи-

тельно — в плазме кролика, а в плазмах кошки и быка подобного эффекта выявлено не было. Вероятно, в плазмах этих животных протеаза микромицета *A. ochraceus* L-1 в большей степени выступает как активатор фактора Х, о чем дополнительно свидетельствуют данные табл. 1.

Ввиду перспективности использования протеазы микромицета *A. ochraceus* L-1 как активатора протеина С важной представляется задача по разработке диагностикума на ее основе. В связи с этим необходимо подобрать ключевые параметры — оптимальную концентрацию специфического хромогенного пептидного субстрата активированного протеина С (Glp-Pro-Arg-pNA), используемого для детекции протеина С, и оптимальное время реакции с образцом плазмы. На рис. 2 представлены данные, показывающие зависимость скорости реакции от концентрации субстрата активированного протеина С. Как видно из рисунка, скорость реакции линейна в диапазоне исследуемых концентраций от 0,1 мг/мл до 0,5 мг/мл. Следовательно, для лабораторного определения протеина С с помощью протеазы-активатора протеина С микромицета *A. ochraceus* L-1 следует использовать концентрацию указанного субстрата в этом диапазоне.

Поскольку реакция активации протеина С — сопряженная, со стадией прединкубации, время этой стадии может являться важным фактором для проведения корректного определения протеина С в образце. Результаты подбора оптимального времени инкубации протеазы микромицета с нормальной плазмой человека представлены на рис. 3. Видно, что увеличение активности идет в диапазоне от 10 до 180 с, после чего наблюдаются плато и снижение активности. Соответственно, рекомендуемое для определения содержания протеина С плазмы крови человека с использованием протеазы микромицета время составляет до 3 мин.

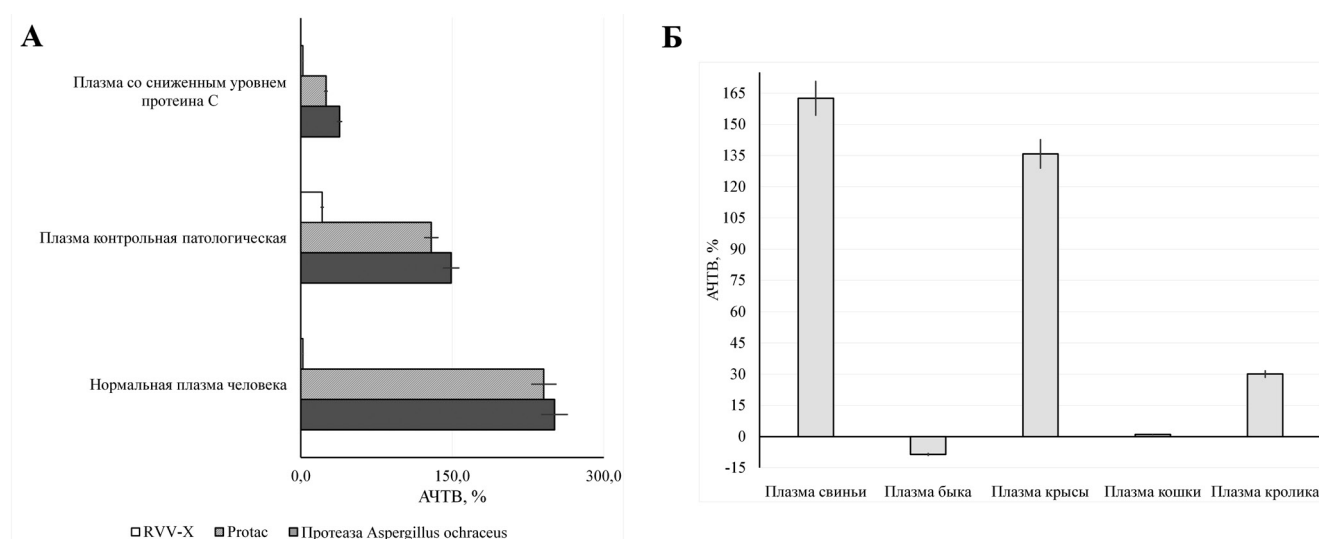


Рис. 1. АЧТВ образцов плазмы человека под действием протеаз *A. ochraceus* L-1 и препаратов Protac® и RVV-X® (А) и плазм крови других млекопитающих под действием протеазы *A. ochraceus* L-1 (Б).

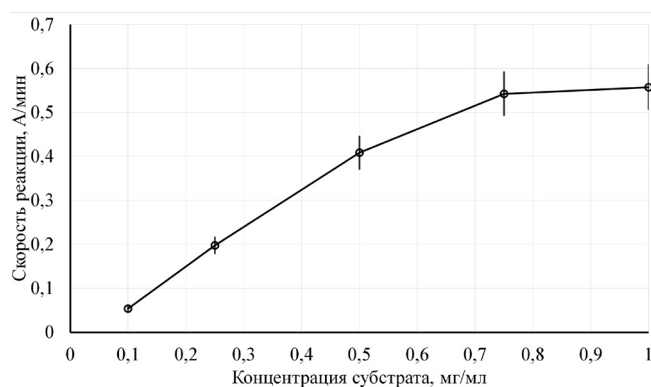


Рис. 2. Определение оптимальной концентрации хромогенного пептидного субстрата активированного протеина С для выявления содержания протеина С в образце при использовании протеазы *A. ochraceus* L-1.

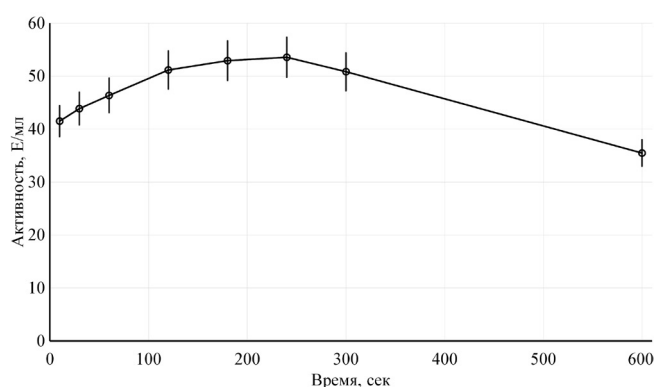


Рис. 3. Определение времени прединкубации протеазы *A. ochraceus* L-1 с плазмой крови человека для диагностики протеина С в образце.

Таким образом, было изучено антикоагулянтное действие *in vitro* нескольких протеаз — секретруемой микромицетом *A. ochraceus* L-1 и содержащихся в яде змей. Показана выраженность действия протеазы микромицета по отношению к плазмам человека и теплокровных животных, а также плазмам человека, дефицитным по определенным факторам системы гемостаза в сопоставлении с протеазами змей в реакциях с хромогенными пептидными субстратами активированного протеина С и фактора Х, а также с помощью теста на АЧТВ. Были подобраны оптимальное время прединкубации проте-

азы микромицета *A. ochraceus* L-1 с плазмой крови человека (3 мин) и концентрация хромогенного пептидного субстрата активированного протеина С (от 0,1 до 0,5 мг/мл), необходимые для корректного определения протеина С.

Работа выполнена при финансовой поддержке Совета по грантам Президента РФ № СП-3906.2021.4. Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abdal-Aziz S.A.A., Ali S.M. Molecular characterization and differentiation of proteases isolated from different *Aspergillus* fungal species // OnLine J. Biol. Sci. 2021. Vol. 21. N 1. P. 69–119.
2. Srilakshmi J., Madhavi J., Lavanya S., Ammani K. Commercial potential of fungal protease: past, present and future prospects // J. Pharm. Chem. Biol. Sci. 2015. Vol. 2. N 4. P. 218–234.
3. Osmolovskiy A.A., Zvonareva E.S., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. The effect of micromycete extracellular proteases of *Aspergillus* genus on the proteins of haemostatic system // Russ. J. Bioorg. Chem. 2014. Vol. 40. N 6. P. 634–639.
4. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Кураков А.В., Баранова Н.А., Пискунова Н.Ф., Егоров Н.С. Микромицеты *Aspergillus flavus* и *A. oryzae* как продуценты протеиназ—активаторов белков системы гемостаза человека // Микол. фитопатол. 2019. Т. 53. № 3. С. 183–185.
5. Osmolovskiy A.A., Şaş B., Aleksandrova A.V., Baranova N.A., Kreyer V.G. Evaluation of the spectrum of proteolytic activity of micromycetes of the genus *Aspergillus* in relation to proteins of the hemostasis system // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2022. Vol. 77. N 2. P. 133–137.
6. Zvonareva E.S., Osmolovskiy A.A., Kreyer V.G., Baranova N.A., Kotova I.B., Egorov N.S. Identification of targets for extracellular proteases activating proteins of the haemostatic system produced by micromycetes *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus terreus* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2015. Vol. 41. N 5. P. 500–505.
7. Palta S., Saroa R., Palta A. Overview of the coagulation system // Indian J. Anaesth. 2014. Vol. 58. N 5. P. 515–523.
8. Sajevec T., Leonardi A., Križaj I. Haemostatically active proteins in snake venoms // Toxicon. 2011. Vol. 57. N 5. P. 627–645.
9. Kunes Y.Z., Sanz M.-C., Tumanova I., Birr C.A., Shi P.Q., Bruguera P., Ruiz J.A., Sanchez-Martinez D. Expression and characterization of a synthetic protein C activator in *Pichia pastoris* // Protein Expr. Purif. 2002. Vol. 26. P. 406–415.
10. Osmolovskiy A.A., Kreyer V.G., Kurakov A.V., Baranova N.A., Egorov N.S. Properties of extracellular proteinase — an activator of protein C in blood plasma formed by *Aspergillus ochraceus* // Appl. Biochem. Microbiol. 2015. Vol. 51. N 1. P. 86–92.
11. Осмоловский А.А., Орехова А.В., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Возможность применения внеклеточной протеазы микромицета *Aspergillus ochraceus* ВКМ F-4104D для определения содержания протеина С в плазме крови человека // Биомед. хим. 2018. Т. 64. № 1. С. 115–118.
12. Orekhova A.V., Osmolovskiy A.A., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Possibility for application of extracellular protease of micromycete *Aspergillus ochraceus* for

determining factor X content in human blood plasma // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2019. Vol. 74. N 2. P. 117–120.

13. Osmolovskiy A.A., Rukavitsyna E.D., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Production of proteinases with fibrinolytic and fibrinogenolytic activity by a micromycete *Aspergillus ochraceus* // Microbiology. 2017. Vol. 86. N 4. P. 512–516.

14. Osmolovskiy A.A., Orekhova A.V., Conti E., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Production and stability of the proteinase complex from *Aspergillus ochraceus* L-1 with fibrinolytic and anticoagulant activity // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2020. Vol. 75. N 3. P. 130–135.

15. Komarevsev S.K., Popova E.A., Kreier V.G., Miroshnikov K.A., Osmolovskiy A.A. Purification of the protease activator of protein C of human blood plasma produced by the mi-

cromycete *Aspergillus ochraceus* VKM F-4104D // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. Vol. 56. N 1. P. 32–36.

16. Gertler A., Trop M. The elastase-like enzymes from *Streptomyces griseus* (Pronase). Isolation and partial characterization // Eur. J. Biochem. 1971. Vol. 19. N 1. P. 90–96.

17. 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. Vol. 48. N 5. P. 488–492.

Поступила в редакцию 17.01.2023

После доработки 21.02.2023

Принята в печать 02.03.2023

SHORT COMMUNICATION

Comparison of the *in vitro* anticoagulant action of proteases secreted by the micromycete *Aspergillus ochraceus* and contained in snake venom

A.A. Osmolovskiy^{1,*} , I. Dombeck², S. Hauke³, A.V. Orekhova^{1,4}, V.G. Kreier¹

¹Department of Microbiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Faculty of Natural Sciences, University of Hohenheim, Garbenstraße 13, Stuttgart, 70599, Germany;

³School of Engineering and Design, Technical University of Munich, Boltzmann str. 15, Garching, 85748, Germany;

⁴Federal State Budgetary Institution “National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine” of the Ministry of Health of Russia, Petroverigsky per., 10, Moscow, 101990, Russia

*e-mail: aosmol@mail.ru

The *in vitro* anticoagulant action of proteases secreted by the micromycete *Aspergillus ochraceus* L-1 and contained in snakes' venoms (Protac[®] and RVV-X[®] preparations) was studied. The severity of the action of micromycete protease in relation to plasmas of humans and warm-blooded animals, as well as human plasmas deficient in certain factors of the hemostasis system, in comparison with snake proteases in reactions with chromogenic peptide substrates of activated protein C and factor X, as well as using the activated partial thromboplastin time (APTT) test. The optimal time of preincubation of the micromycete *A. ochraceus* L-1 protease with human blood plasma (3 min) and the concentration of the chromogenic peptide substrate of activated protein C (from 0.1 to 0.5 mg/ml) necessary for the correct determination of protein C with her help.

Keywords: proteases of snake venom, *Aspergillus ochraceus* protease, anticoagulant enzymes, hemostasis protein activators, chromogenic peptide substrates, APTT

Funding: This work was supported by the Financial Council for Grants of the President of the Russian Federation No. SP-3906.2021.4.

Сведения об авторах

Осмоловский Александр Андреевич — канд. биол. наук, доц. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: aosmol@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6672-0551>

Домбек Изабель (Isabelle Dombeck) — магистр университета Хоэнхайма. Тел: +49-711-459 22780; e-mail: i.dom@gmx.de

Хауке Себастиан (Sebastian Hauke) — магистр Мюнхенского технологического университета. Тел: +49-89-289-15712; e-mail: sebastian.hauke@tum.de

Орехова Анастасия Владимировна — канд. мед. наук, науч. сотр. Национального медицинского исследовательского центра терапии и профилактической медицины Минздрава России, вед. инженер кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: stasya77@list.ru

Крейер Валериана Георгиевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: vkreyer@yandex.ru