

Оригинальная статья / Research article

УДК 54.062; 615.21/26; 615.07

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1669>



Влияние *in vitro* на параметры фибринолиза водных экстрактов грибов, произрастающих на древесных растениях

Н. М. Фаустова¹✉, Д. Н. Ведерников², В. В. Баканов², Е. Н. Павлова³,
Е. Н. Власова³, Ю. А. Скорик³

¹ Акционерное Общество «Научно-производственное Объединение «ДОМ ФАРМАЦИИ». 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, п. Кузьмовский, Заводская ул., д. 3-245

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет имени С. М. Кирова». 194021, Россия, г. Санкт-Петербург, Институтский пер., д. 5, литер У

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук (ИВС РАН). 199004, Россия, г. Санкт-Петербург, Большой проспект Васильевского острова, д. 31

✉ Контактное лицо: Фаустова Наталья Михайловна. E-mail: faustova.nm@doclinika.ru

ORCID: Н. М. Фаустова – <https://orcid.org/0000-0002-5557-1287>; Д. Н. Ведерников – <http://orcid.org/0000-0001-9996-2100>;

В. В. Баканов – <http://orcid.org/0009-0003-0478-1836>; Е. Н. Павлова – <http://orcid.org/0000-0003-3766-1729>;

Е. Н. Власова – <http://orcid.org/0000-0002-4644-0445>; Ю. А. Скорик – <https://orcid.org/0000-0002-9731-6399>.

Статья поступила: 01.12.2023

Статья принята в печать: 27.05.2024

Статья опубликована: 27.05.2024

Резюме

Введение. В составе экстрактов грибов присутствуют соединения, представляющие интерес как источник новых активных фармацевтических субстанций, обладающих антитромботическим действием.

Цель. Цель работы – определение потенциальной антитромботической активности *in vitro* водных экстрактов грибов, произрастающих на древесных растениях: шиитаке (*Lentinula edodes*); чешуйчатка обыкновенной (*Pholiota squarrosa*); опят различных видов – зимних (*Flammulina velutipes* (Curtis) Signer), летних (*Kuehneromyces mutabilis*), луковичноногих (*Armillaria cepistipes*), северных (*Armillaria borealis*), серопластинчатых (*Hypholoma capnoides*); лентинеллуса уховидного (*Lentinellus cochleatus*), вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*).

Материалы и методы. Изучение плазминоген-активаторных свойств тестируемых экстрактов, оценку их влияния на активность фермента системы фибринолиза альфа-2-антиплазмина, фибринолитическую активность плазмы крови, а также на концентрацию фибриногена проводили с использованием наборов реагентов НПО «РЕНАМ» и ООО Фирма «Технология-Стандарт» (Россия).

Результаты и обсуждение. Водный экстракт *L. edodes* и его фракции (водная, солевая и щелочерастворимая), выделенные с использованием сорбента диэтиламиноэтилцеллюлозы, демонстрируют выраженную антитромботическую активность, оказывая влияние в разной степени на все изученные параметры фибринолиза. Водные экстракты шляпок и ножек *P. squarrosa*, *K. mutabilis* и *F. velutipes* и фракции из этих экстрактов также проявляют антитромботическую (фибринолитическую) активность *in vitro*, оказывая статистически значимое влияние на различные параметры фибринолиза. Для водного экстракта *L. cochleatus* отмечено менее выраженное действие на параметры фибринолиза по сравнению с вышеперечисленными образцами. Экстракты плодовых тел *A. cepistipes*, *A. borealis*, *H. capnoides*, *P. ostreatus* не оказывают влияния на параметры фибринолиза и концентрацию фибриногена.

Заключение. Полученные данные позволяют рекомендовать экстракты из грибов *L. edodes*, *P. squarrosa*, *K. mutabilis* и *F. velutipes* для дальнейшего изучения с целью разработки функциональных пищевых добавок для коррекции сердечно-сосудистых заболеваний или для создания антитромботических лекарственных средств.

Ключевые слова: водные экстракты ксилотрофных грибов, фибринолитическая активность, плазминоген, альфа-2-антиплазмин, фибриноген

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Н. М. Фаустова и Д. Н. Ведерников придумали и разработали эксперимент. Д. Н. Ведерников, В. В. Баканов, Е. Н. Павлова, Е. Н. Власова и Ю. А. Скорик получили объекты исследования и выполнили оценку общего химического состава методом инфракрасной спектроскопии. Н. М. Фаустова выполняла оценку влияния объектов исследования на параметры фибринолиза, обработку экспериментальных данных и написание текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-26-00345) «Исследование состава экстрактивных веществ плодовых тел грибов, произрастающих на деревьях. Биологическая активность экстрактов. Содержание тяжелых металлов».

Благодарность. Авторы выражают благодарность сотрудникам АО «НПО «Дом фармации» Т. Н. Барыбиной, А. Ю. Романенко и П. В. Саковичу за помощь в определении фибринолитической активности объектов исследования и концентрации фибриногена.

Для цитирования: Фаустова Н. М., Ведерников Д. Н., Баканов В. В., Павлова Е. Н., Власова Е. Н., Скорик Ю. А. Влияние *in vitro* на параметры фибринолиза водных экстрактов грибов, произрастающих на древесных растениях. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(2):217–232. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1669>

© Фаустова Н. М., Ведерников Д. Н., Баканов В. В., Павлова Е. Н., Власова Е. Н., Скорик Ю. А., 2024

© Faustova N. M., Vedernikov D. N., Bakanov V. V., Pavlova E. N., Vlasova E. N., Skorik Yu. A., 2024

In vitro influence on fibrinolysis parameters of aqueous extracts of mushrooms growing on woody plants

Natalia M. Faustova¹✉, Dmitriy N. Vedernikov², Vyacheslav V. Bakanov², Ekaterina N. Pavlova³, Elena N. Vlasova³, Yury A. Skorik³

¹ RMC «HOME OF PHARMACY», 3-245, Zavodskaya str., Kuzmolovsky village, Vsevolozhsk district, Leningrad region, 188663, Russia

² Saint-Petersburg State Forest Technical University, 5U, Institutskiy lane, Saint-Petersburg, 194021, Russia

³ Institute of Macromolecular Compounds of RAS, 31, Bolshoi avenue of Vasilevskogo Island, Saint-Petersburg, 199004 Russia

✉ Corresponding author: Natalia M. Faustova. E-mail: faustova.nm@doclinika.ru

ORCID: Natalia M. Faustova – <https://orcid.org/0000-0002-5557-1287>; Dmitriy N. Vedernikov – <http://orcid.org/0000-0001-9996-2100>;

Vyacheslav V. Bakanov – <http://orcid.org/0009-0003-0478-1836>; Ekaterina N. Pavlova – <http://orcid.org/0000-0003-3766-1729>;

Elena N. Vlasova – <http://orcid.org/0000-0002-4644-0445>; Yury A. Skorik – <https://orcid.org/0000-0002-9731-6399>.

Received: 01.12.2023

Accepted: 27.05.2024

Published: 27.05.2024

Abstract

Introduction. Various compounds of mushroom extracts are of interest as a source of new active pharmaceutical substances with antithrombotic activity.

Aim. The aim of the work is to determine the potential antithrombotic activity in vitro of aqueous extracts of xylophilic mushrooms: *Lentinula edodes*, *Pholiota squarrosa*, *Flammulina velutipes* (Curtis) Signer, *Kuehneromyces mutabilis*, *Armillaria cepistipes*, *Armillaria borealis*, *Hypholoma capnoides*, *Lentinellus cochleatus*, *Léccinum aurantiacum*, *Pleurotus ostreatus*.

Materials and methods. The study of fibrinolytic activity of water extracts of mushrooms in vitro was carried out. The effect of test objects on plasminogen activation, on the activity of enzymes of the fibrinolysis system α 2-antiplasmin, on the time of euglobulin clot lysis and on the concentration of fibrinogen was evaluated. For the analysis we used reagent kits of SPD «RENAM» and LLC Company «Technology-Standard» (Russia).

Results and discussion. Pronounced antithrombotic activity is demonstrated by an aqueous extract of *L. edodes* and fractions of aqueous extract. Extracts of *L. edodes* affect all studied parameters of fibrinolysis to varying degrees. Caps and stems of *P. squarrosa*, *K. mutabilis*, and *F. velutipes* aqueous extracts and fractions of aqueous extracts also demonstrate antithrombotic (fibrinolytic) activity in vitro, having a statistically significant effect on various parameters of fibrinolysis. A less pronounced effect on fibrinolysis parameters in comparison with the above samples is observed when using an aqueous extract of *L. cochleatus* marked. *A. cepistipes*, *A. borealis*, *H. capnoides*, *L. aurantiacum*, *P. ostreatus* fruiting bodies aqueous extracts do not affect the studied parameters of fibrinolysis and the concentration of fibrinogen.

Conclusion. The data obtained make it possible to recommend extracts from *L. edodes*, *F. velutipes*, *P. squarrosa* and *K. mutabilis* for further study, for example, in order to develop functional food products for cardiovascular diseases or to create antithrombotic drugs.

Keywords: xylophilic mushrooms, aqueous extract, fibrinolytic activity, plasminogen, α 2-antiplasmin

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Natalia M. Faustova and Dmitriy N. Vedernikov conceived of the presented idea. Dmitriy N. Vedernikov, Vyacheslav V. Bakanov, Ekaterina N. Pavlova, Elena N. Vlasova and Yury A. Skorik received study objects and assessed the general chemical composition by infrared spectroscopy. Natalia M. Faustova assessed the influence of study objects on fibrinolysis parameters, processed the experimental data and wrote the text of the article. All authors participated in the discussion of the results.

Funding. The work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 22-26-00345) "Study of the composition of extractive substances of the fruiting bodies of fungi growing on trees. Biological activity of extracts. Content heavy metals".

Acknowledgment. The authors express their gratitude to the employees of JSC "NPO "Dom Pharmacy" T. N. Barybina, A. Yu. Romanenko and P. V. Sakovich for their assistance in determining the fibrinolytic activity of the study objects and fibrinogen concentration.

For citation: Faustova N. M., Vedernikov D. N., Bakanov V. V., Pavlova E. N., Vlasova E. N., Skorik Yu. A. In vitro influence on fibrinolysis parameters of aqueous extracts of mushrooms growing on woody plants. *Drug development & registration*. 2024;13(2):217–232. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1669>

ВВЕДЕНИЕ

Нормальное функционирование системы гемостаза зависит от взаимодействия его звеньев: свертывающего и противосвертывающего, обеспечивающих гемостатический потенциал крови. Нарушения в работе системы гемостаза приводят к различным заболеваниям, в том числе и к угрожающим жизни состояниям – тромбозам и неконтролируемым кровотечениям [1]. Фибринолиз – важный биохимический

процесс, направленный на разрушение фибриновых сгустков, образующихся при участии каскада ферментов системы свертывания крови [1–3].

К настоящему времени разработаны различные лекарственные средства, способствующие растворению тромбов и препятствующие их образованию: тромболитические (фибринолитические) средства (альтеплаза, тенектеплаза, урокиназа, плазминоген и другие) и различные антикоагулянты (гепарины, низкомолекулярные гепарины и их аналоги). Применение

этих препаратов сопряжено с рядом негативных побочных эффектов, включая развитие иммуногенности, системного фибринолиза [1, 3, 4]. Поиск альтернативных препаратов, в том числе среди экстрактов растительного происхождения, обладающих антикоагулянтным, антитромботическим действием, не теряет своей актуальности.

Согласно опубликованным данным, экстракты грибов содержат металлопротеиназы, проявляющие достаточную активность в кровотоке, способные расщеплять тромбы, фибрин и фибриноген. [5–10]. Также была отмечена способность полисахаридов, выделенных из водных экстрактов грибов, влиять на активность альфа-2-антиплазмина и плазминогена [9]. Отсюда можно предположить, что грибы могут иметь применение, например, в качестве активных фармацевтических субстанций (АФС) для создания лекарственных средств для лечения тромбоза или для разработки функциональных пищевых добавок при сердечно-сосудистых заболеваниях.

В первую очередь в качестве источников АФС были исследованы микромицеты [5, 11, 12], выделяющие при культивировании протеолитические ферменты. Например, были разработаны фибринолитические препараты «Террилитин» на основе фермента, продуцированного почвенным микромицетом *Aspergillus terricola* [13, 14], и его модификация «Терридеказа»¹, ферментный препарат тромболитического и фибринолитического действия из базидиально-го гриба рода *Coprinus* [15].

При применении тромболитических препаратов, полученных с помощью микробного синтеза микромицетов, у пациентов развивается ряд серьезных побочных эффектов, связанных с высоким уровнем общего неспецифического протеолиза. В связи с этим перспективным является изучение компонентов плодовых тел различных видов грибов-макромицетов с целью поиска веществ, обладающих более высокой специфичностью в отношении фибринолитической активности и антитромботическим действием. По литературным данным, ферменты, выделенные из *Flamulina velutipes*, *Armillaria mellea*, *Léccinum varicolor*, обладают тромболитической, а выделенные из *Pleurotus ostreatus*, – фибринолитической активностью [5].

Целью настоящей работы является определение *in vitro* потенциальной антитромботической активности водных экстрактов грибов:

- 1) шиитаке (*Lentinula edodes*);
- 2) чешуйчатки обыкновенной (*Pholiota squarrosa*);
- 3) опенка зимнего (*Flamulina velutipes*);
- 4) опенка летнего (*Kuehneromyces mutabilis*);
- 5) лентинеллуса уховидного (*Lentinellus cochleatus*);
- 6) опенка луковичного (*Armillaria cepistipes*);

¹ Терридеказа® (Terridecase). Доступно по: <https://www.rlsnet.ru/drugs/terridekaza-5315>. Ссылка активна на 01.12.2023.

- 7) опенка северного (*Armillaria borealis*);
- 8) опенка серопластинчатого (*Hypholoma capnoides*).

Для сравнения фармакологической активности полученных экстрактов *in vitro* были выбраны следующие показатели фибринолиза [1, 2, 4]:

- 1) активация плазминогена;
- 2) активность альфа-2-антиплазмина;
- 3) фибринолитическая активность плазмы крови (время лизиса эуглобулиновых сгустков);
- 4) концентрация фибриногена.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования

Объекты исследования представляют собой водные экстракты, полученные из шляпок и ножек ксилотрофных грибов следующих видов:

- 1) шиитаке (*L. edodes*);
- 2) чешуйчатки обыкновенной (*P. squarrosa*);
- 3) опенка зимнего (*F. velutipes* (Curtis) Signer);
- 4) опенка летнего (*K. mutabilis*);
- 5) лентинеллуса уховидного (*L. cochleatus*);
- 6) опенка луковичного (*A. cepistipes*);
- 7) опенка северного (*A. borealis*);
- 8) опенка серопластинчатого (*H. capnoides*).

Образцы грибов были собраны в лесах Ленинградской области в период с июня по август 2020 и 2021 года, кроме опят зимних, которые были собраны в ноябре 2021 года.

Методика получения водных экстрактов грибов

Для получения экстрактов плодовые тела были разделены на шляпки и ножки, промыты водой дистиллированной, а затем высушены в течение 14 часов при 40 °С до остаточной влажности 10–15 % и измельчены до размера частиц не более 2,5 мм. Затем образцы шляпок и ножек грибов последовательно экстрагировались изопропиловым спиртом («х.ч.», АО «ВЕКТОН», Россия), а затем водой дистиллированной. Водные экстракты грибов замораживали при температуре не выше –18 °С и лиофильно высушивали. Лиофилизаты водных экстрактов грибов представляли собой порошкообразную массу желто-коричневого цвета различной интенсивности. Объекты исследования хранили при температуре 2–8 °С.

Методика фракционирования водных экстрактов грибов

Из водных экстрактов плодовых тел шиитаке, ножек и шляпок чешуйчатки обыкновенной, опят зимних и летних были получены три фракции – водная (№ 1), солевая (№ 2) и щелочная (№ 3) – с использованием сорбента диэтиламиноэтилцеллюлозы (ДЭАЭЦ) (Reanal, Венгрия) с номинальной емкостью 0,6–0,8 ммоль-экв/г и фактором набухаемости 9,0 мл/г.

Для подготовки сорбента сухую ДЭАЭЦ заливали дистиллированной водой и оставляли набухать в течение 2 суток с периодическим перемешиванием и заменой воды. Для перевода сорбента в ОН-форму его сначала заливали 0,5 М раствором HCl на 1 ч при периодическом перемешивании, отмывали дистиллированной водой до нейтрального pH, затем заливали 0,5 М раствором NaOH на 1 ч при периодическом перемешивании и отмывали дистиллированной водой до нейтрального pH.

Для получения водной фракции лиофильно высушенные образцы экстрактов растворяли в дистиллированной воде (200 мг на 100 мл воды) и смешивали с сорбентом. Сорбент отделяли центрифугированием, в раствор добавляли свежую порцию ДЭАЭЦ. Этап повторяли 2–3 раза до полного обесцвечивания раствора. Полученный раствор упаривали на ротормном испарителе RV 06-ML (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Германия) при температуре не выше 100 °C и скорости вращения ротора не более 50 об/мин до 20–50 мл и сушили лиофильно.

Для получения солевой фракции к сорбенту ДЭАЭЦ, оставшемуся после отделения водной фракции, добавляли 200 мл 1 М раствора NaCl и периодически перемешивали в течение 1 ч, сорбент отделяли центрифугированием. Этап повторяли 3–5 раз, полученные растворы объединяли, упаривали на ротормном испарителе до 20–50 мл, диализовали (диализный мешок Zellu Trans Dialysis Tube T2, молекулярная масса отсека 3,5 КДа) в течение 3 суток против дистиллированной воды и сушили лиофильно.

Для получения щелочной фракции к сорбенту ДЭАЭЦ, оставшемуся после отделения солевой фракции, добавляли 200 мл раствора 0.1 М NaOH / 0,5 М NaCl и периодически перемешивали в течение 1 ч, сорбент отделяли центрифугированием. Этап повторяли 2–3 раза, полученные растворы объединяли, упаривали на ротормном испарителе до 20–50 мл, диализовали в течение 3 суток против дистиллированной воды и сушили лиофильно.

Инфракрасная (ИК) спектроскопия

ИК-спектры полученных экстрактов регистрировали на ИК-фурье-спектрометре VERTEX 70 (Bruker Corporation, США) с разрешением 4 см⁻¹, число сканов 60. Для регистрации спектров использовали микроприставку однократного нарушенного полного внутреннего отражения Pike с рабочим элементом из ZnSe. При регистрации спектров вводили поправку, учитывающую глубину проникновения в зависимости от длины волны.

Методики оценки параметров фибринолиза *in vitro*

Для оценки влияния объектов на параметры фибринолиза *in vitro* была использована коммерчески доступная референтная нормальная пулированная плазма крови человека (РНП-плазма):

- 1) РНП-плазма, № 717 (ООО Фирма «Технология-Стандарт», Россия);
- 2) плазма контрольная, № KM-2 (НПО «РЕНАМ», Россия).

Для получения модельных смесей использовали плазму крови человека с параметрами гемостаза в пределах нормы.

Приготовление сток-растворов и модельных смесей тестируемых объектов

Навеску тестируемых объектов, взвешенную с точностью до 0,00001 г, растворяли в воде очищенной из расчета 100 мкл раствора на 1 мг вещества, в результате получали сток-растворы № 1 с концентрацией тестируемого объекта 10 мг/мл. Далее с помощью серии последовательных разведений в 5 раз в воде очищенной готовили сток-растворы № 2–6 с концентрациями 0,0016–1,0 мг/мл.

Для получения модельных смесей к 270 мкл РНП-плазмы прибавляли 30 мкл сток-растворов № 1–6, затем смеси интенсивно перемешивали при 2000 об/мин в течение 30–40 с и инкубировали при 650 об/мин при 37 °C в течение 15 мин. Концентрация тестируемых объектов в модельных смесях МС1 – МС6 составила 0,16–1000 мкг/мл. Для получения модельной смеси с концентрацией объектов 0 мкг/мл (К(-), отрицательный контроль) к 270 мкл плазмы крови прибавляли 30 мкл воды очищенной.

Модельные смеси объектов с РНП-плазмой крови использовали для дальнейшего анализа с целью определения параметров фибринолиза.

Для проведения исследования использовали следующие наборы реагентов:

- 1) «Реахром-плазминоген» (№ ФА-2, НПО «РЕНАМ», Россия) для определения плазминоген-активаторных свойств объектов исследования;
- 2) «Реахром-антиплазмин» (№ ФА-3, НПО «РЕНАМ», Россия) для оценки влияния на активность альфа-2-антиплазмина;
- 3) «Тех-Фибриноген-тест» (№ 94, ООО Фирма «Технология-Стандарт», Россия) для оценки влияния объектов исследования на концентрацию фибриногена (время формирования фибринового сгустка) по методу Клаусса;
- 4) «XIIa-зависимый фибринолиз» (№ ФА-1, НПО «РЕНАМ», Россия) для оценки влияния на фибринолитическую активность плазмы крови.

В работе использовано следующее оборудование: микропланшетный анализатор CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия), коагулометр АПГ4-02-П (ООО «ЭМКО», Россия), весы лабораторные электронные AUW-220D (Shimadzu Corporation, Япония), система очистки воды Simplicity® Water Purification System (Millipore Corporation, США).

Описание принципов методов анализа представлено на основании литературных данных [16, 17] и инструкций к набору реагентов.

Определение активации пламиногена. Метод оценивает способность пламиногена образовывать комплекс со стрептокиназой, гидролизующий пептидный хромогенный субстрат.

1. Пламиноген + Стрептокиназа (избыток) \Rightarrow Комплекс.
2. Комплекс + Пептид-rNA \Rightarrow Пептид + rNA (желтый).
Линейный диапазон методики: 11,5–130 % активности пламиногена.

Перед началом анализа модельные смеси с тестируемыми образцами разбавляли в 30 раз рабочим буферным раствором, входящим в состав набора (трис-HCl, pH = 7,4 \pm 0,5). Далее анализ активности пламиногена в модельных смесях выполняли в соответствии с инструкцией производителя.

Определение активности альфа-2-антиплазмина. Метод основан на способности α 2-антиплазмина ингибировать активность пламина. В плазму / модельную смесь добавляют избыток пламина, оставшееся количество последнего катализирует отщепление пара-нитроанилина (pNA) от синтетического хромогенного субстрата.

1. α 2-АП (биоматериал) + плазмин (избыток) \rightarrow (α 2-АП-плазмин) + плазмин (остаток).
2. Субстрат-rNA + плазмин (остаток) \rightarrow Пептид + rNA.
Линейный диапазон методики: 10–150 % активности альфа-2-антиплазмина. Описание процедуры анализа представлено в соответствии с инструкцией к набору в модификации авторов.

Перед началом анализа модельные смеси разбавляли в 3–5 раз рабочим буферным раствором (100 мМ фосфатный буферный раствор, pH = 7,5 \pm 0,05). Для проведения реакции в лунки 96-луночного полистиролового планшета, предварительно прогретого до температуры инкубации (37 °C), вносили по 50 мкл рабочего буферного раствора, 50 мкл рабочего раствора пламина, инкубировали 5 мин при 37 °C при 650 об/мин, затем вносили по 10 мкл калибровочных растворов / контрольных плазм / модельных смесей с тестируемыми объектами, инкубировали 3 мин. По окончании инкубации вносили по 20 мкл раствора хромогенного субстрата, инкубировали 2 мин, реакцию останавливали 70 мкл 20 % раствора уксусной кислоты. Оптическую плотность измеряли при длине волны 405 нм (основная длина волны) и 650 нм (референсная длина волны).

Построение калибровочных зависимостей и расчет активности альфа-2-антиплазмина и пламиногена выполняли с помощью программного обеспечения (ПО) Mars 4.01 R2 (BMG LABTECH, Германия).

Определение концентрации фибриногена. Функциональный анализ определения концентрации фибриногена (по методу Клаусса) основан на времени формирования фибринового сгустка: измеряется время свертывания разбавленной цитратной плазмы крови при добавлении избытка тромбина [использовали полуавтоматический коагулометр АПГ4-02-П (ООО «ЭМКО», Россия)].

Оценка фибринолитической активности плазмы крови (XIIIa-зависимый фибринолиз): измеряют время полного лизиса эуглобулинового сгустка, полученного из плазмы крови при осаждении в кислой среде (содержит факторы свертывания крови и фибринолиза и не содержит ингибиторов фибринолиза). В качестве испытуемых растворов использовали сток-растворы № 1–6 с концентрациями тестируемых объектов 0,0016–10 мг/мл.

Для водных экстрактов из шиитаке, чешуйчатки и зимних опят было дополнительно оценено влияние на такие параметры гемостаза, как протромбиновое время (ПВ) и активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), с использованием наборов реагентов «Техпластин-тест» для ПВ (№ 131, ООО Фирма «Технология-Стандарт», Россия) и «АЧТВ-тест» (№ 649, ООО Фирма «Технология-Стандарт», Россия).

Обработка данных

Для всех данных была применена описательная статистика: рассчитаны средние арифметические значения (M), соответствующие им стандартные отклонения (SD); *n* – количество повторностей. Обработка данных была проведена с использованием программы Excel 2007. Статистический анализ проводили с использованием программ Excel 2007 и STATISTICA 10 (StatSoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основании литературных данных мы предположили, что экстракты содержат нейтральные и анионные полисахариды, белки и пептиды, меланины [18, 19]. Фракционирование полученных экстрактов грибов с использованием ионного обмена на катионном сорбенте ДЭАЭЦ в Н-форме позволило получить три фракции, получившие в зависимости от использованного элюента следующие названия:

- 1) водная фракция (ВФр-1);
- 2) солевая фракция (СФр-2);
- 3) щелочная фракция (ЩФр-3).

Для общей характеристики химического состава фракции анализировали методом ИК-спектроскопии. На рисунке 1 приведены типичные ИК-спектры фракций на примере опенка зимнего.

В ИК-спектре водной фракции (рисунок 1, кривая 1) наблюдаются следующие полосы поглощения: широкая полоса 3500–3200 см⁻¹ (валентные колебания первичных и вторичных ОН-групп), плечо при 3285 см⁻¹ (валентные колебания N—H вторичного амида), 2920 см⁻¹ (валентные колебания C—H), плечо при 1660 см⁻¹ (валентные колебания C=O вторичного амида, полоса амид I), полоса 1530 см⁻¹ (деформационные колебания N—H вторичного амида, полоса амид II), полосы 1608 см⁻¹ и 1400 см⁻¹ (антисимметричные и симметричные колебания карбоксилатных групп), интенсивные полосы в области 1070–

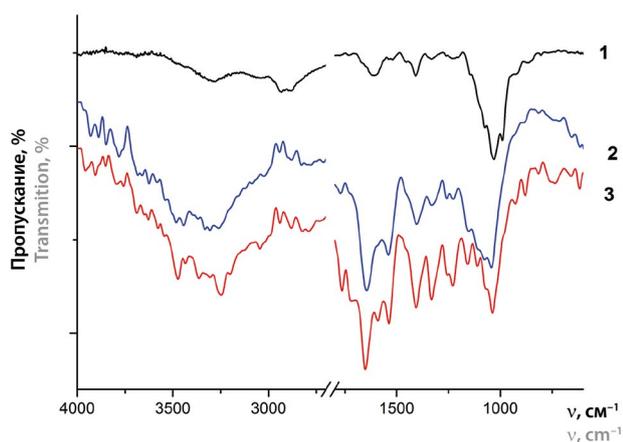


Рисунок 1. Инфракрасные спектры водной (1), солевой (2) и щелочной (3) фракций экстракта *F. velutipes*

Figure 1. Infrared spectra of water-soluble fraction (1), salt fraction (2) and alkali fraction (3) from extract of *F. velutipes*

990 cm^{-1} (скелетные колебания C—O—N глюкопиранозного кольца). С учетом относительной интенсивности полос поглощения можно предположить, что в водной фракции основными компонентами являются полисахариды с небольшими примесями белков и/или пептидов.

В ИК-спектре солевой фракции (рисунок 1, кривая 2) имеются те же полосы поглощения, что и в водной фракции, однако относительная интенсивность полисахаридных полос (3500–3200 cm^{-1} , 1100–1040 cm^{-1}) существенно ниже полос вторичных ами-

дов (3285, 1640, 1535 cm^{-1}). То есть в солевой фракции мажорным компонентом являются белки, а полисахариды – минорным.

В ИК-спектре щелочной фракции (рисунок 1, кривая 3), кроме уже описанных полос полисахаридов и белков, наблюдаются достаточно интенсивные полосы поглощения в области 1760–1700 cm^{-1} , которые можно отнести к валентным колебаниям C=O кетонов и хинонов в структуре меланина. Относительная интенсивность полос поглощения в ИК-спектре говорит о том, что основными компонентами этой фракции являются меланины и белки, а примесными – полисахариды. Отсутствие полос поглощения меланина в водной и солевой фракциях говорит об эффективной очистке этих фракций от меланина с использованием сорбента ДЭАЭЦ.

Для ряда полисахаридов и веществ белковой природы, содержащихся в растительном сырье, известны антикоагулянтное и антитромботическое действие, фибринолитическая активность [20–22], что позволило нам предположить наличие влияния на свертывающую систему крови человека изучаемых водных экстрактов грибов.

Свертывание крови и фибринолиз являются многоступенчатыми процессами [1–3]. В ходе исследования *in vitro* оценивали влияние экстрактов на ряд параметров, характеризующих процесс фибринолиза (рисунок 2): активацию пламиногена, активность альфа-2-антиплазмина, фибринолитическую активность плазмы крови (XIIa-зависимый фибринолиз) и концентрацию фибриногена.

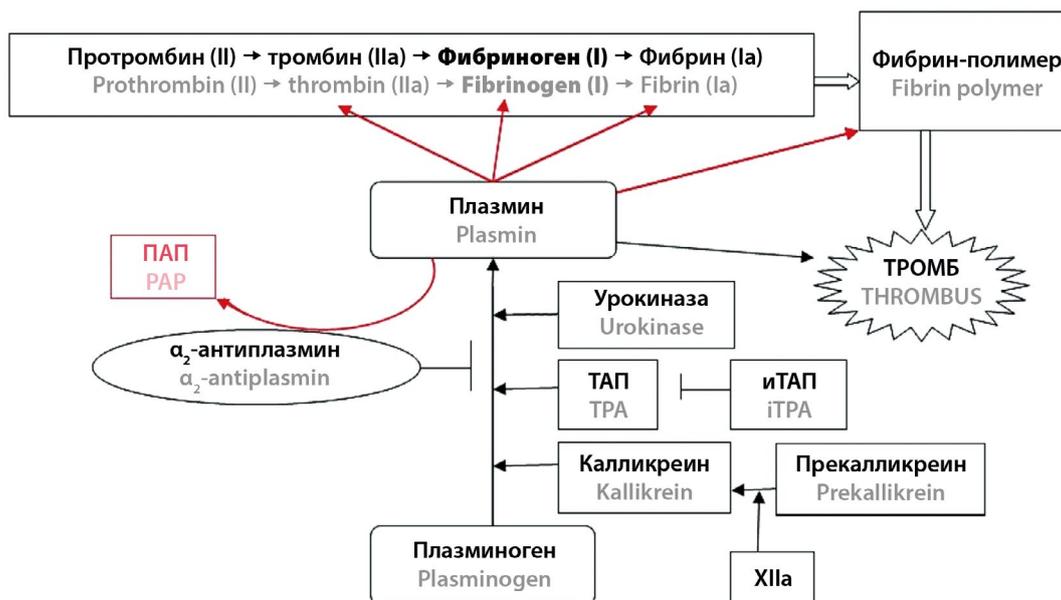


Рисунок 2. Фрагмент схемы свертывания крови с активацией системы фибринолиза [23]:

ТАП – тканевый активатор пламиногена; иТАП – ингибитор тканевого активатора пламиногена; ПАП – плазмин-антиплазминовый комплекс

Figure 2. Part of the blood coagulation scheme with activation of the fibrinolysis system [23]:

tPA – tissue plasminogen activator; iTPA – tissue plasminogen activator inhibitor; PAP – plasmin-antiplasmin complex

В ходе первичного скринингового анализа оценивали биологическую активность суммарных водных экстрактов из шляпок и ножек ксилотрофных грибов. Затем были проанализированы фракции, выделенные из водных экстрактов, оказавших влияние на параметры фибринолиза.

На основании результатов анализа было установлено влияние на различные стадии фибринолиза водных экстрактов из грибов следующих видов (таблица 1, рисунок 3):

- 1) шиитаке;
- 2) чешуйчатки обыкновенной;
- 3) опят зимних;
- 4) опят летних;
- 5) лентинеллуса уховидного.

Водные экстракты из остальных видов грибов: опят луковичноногих, опят северных, опят серопластинчатых, – не оказывали *in vitro* влияния на указанные параметры фибринолиза ни в одной из исследованных концентраций (0,16–1000 мкг/мл).

Необходимо отметить, что не было найдено значительных различий по характеру влияния на параметры фибринолиза между экстрактами, полученными из шляпок и ножек исследуемых видов грибов.

Для экстрактов из грибов шиитаке и чешуйчатки характерно «куполообразное» изменение активности α2-антиплазмина в зависимости от их концентрации (рисунок 3), причем экстракт из грибов шиита-

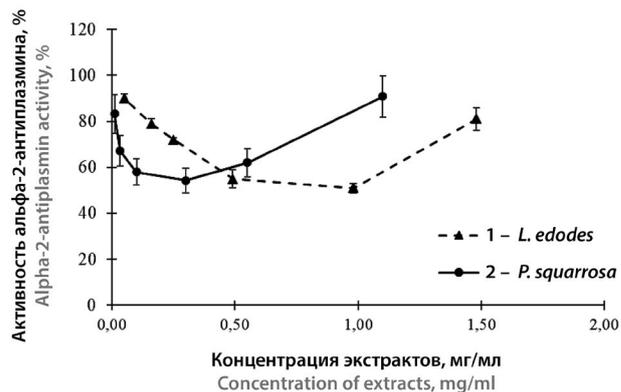


Рисунок 3. Влияние суммарных водных экстрактов из *L. edodes* и *P. squarrosa* на активность альфа-2-антиплазмина ($M \pm SD$, $n = 3$)

Figure 3. The inhibitory effects of mushroom extracts from *L. edodes* and *P. squarrosa* on the alpha-2-antiplasmin activity ($M \pm SD$, $n = 3$)

ке является наиболее эффективным ингибитором этого фермента системы фибринолиза из исследованных типов грибов (см. таблица 1).

Компоненты водных экстрактов грибов шиитаке, чешуйчатки и зимних опят *in vitro* в диапазоне концентраций 0,05–100 мкг/мл не вызывают изменения таких параметров гемостаза, как АЧТВ и ПВ,

Таблица 1. Результаты оценки влияния водных экстрактов изучаемых видов грибов на параметры фибринолиза

Table 1. Effects of water extracts from researched types of mushrooms on fibrinolysis parameters

Вид грибов Types of mushrooms	Характер действия на параметры фибринолиза Effects on fibrinolysis parameters		
	Активация плазминогена, % Plasminogen activation, %	Активность α2-антиплазмина, % α2-Antiplasmin activity, %	Концентрация фибриногена, г/л Concentration of the fibrinogen, g/l
<i>L. edodes</i>	Активация на 20–47 % (C = 0,16–100 мкг/мл) Activation by 20–47 % at C = 0,16–100 µg/ml	Ингибирование на 21–49 % (C = 0,05–0,98 мкг/мл) Activity inhibition by 21–49 % at C = 0,05–0,98 µg/ml	Снижение концентрации на 17–82 % (C = 0,16–10,0 мкг/мл) The decrease of the concentration by 17–82 % at C = 0,16–10,0 µg/ml
<i>P. squarrosa</i>	Активация на 20–35 % (C = 0,80–100 мкг/мл) Activation by 20–35 % at C = 0,80–100 µg/ml	Ингибирование на 20–42 % (C = 0,3–3,0 мкг/мл) Activity inhibition by 20–42 % at C = 0,3–3,0 µg/ml	Влияние отсутствует No effects
<i>F. velutipes</i>	Влияние отсутствует No effects	Ингибирование на 25–50 % (C = 0,80–20 мкг/мл) Activity inhibition by 25–50 % at C = 0,80–20 µg/ml	Снижение концентрации на 20–50 % (C = 0,80–20,0 мкг/мл) The decrease of the concentration by 20–50 % at C = 0,16–10,0 µg/ml
<i>K. mutabilis</i>	Активация на 19–37 % (C = 0,15–4,1 мкг/мл) Activation by 19–37% at C = 0,15–4,1 µg/ml	Влияние отсутствует No effects	Снижение концентрации на 10–52 % (C = 0,40–4,9 мкг/мл) The decrease of the concentration by 10–52 % at C = 0,4–4,9 µg/ml
<i>L. cochleatus</i>	Активация на 14–27 % (C = 0,06–0,15 мкг/мл) Activation by 14–27 % at C = 0,06–0,15 µg/ml	Повышение активности на 13–32 % (C = 4,0–20,0 мкг/мл) The increase of enzyme activities by 13–32 % at C = 4,0–20 µg/ml	Снижение концентрации на 15–61 % (C = 0,12–15 мкг/мл) The decrease of the concentration by 15–61 % at C = 0,12–15,0 µg/ml

Примечание. C – концентрация экстрактов в модельной смеси, мкг/мл.

Note. C – the concentration of water extract, µg/ml.

т. е. не оказывают влияния на внешний и внутренний пути свертывания крови.

На основании литературных данных необходимо отметить, что исследования, посвященные фибринолитической и тромболитической активности экстрактов из плодовых тел грибов, были направлены в первую очередь на выделение и характеристику водорастворимых белковых комплексов, содержащих различные протеолитические ферменты [5–8]. Тогда как роль полисахаридных комплексов грибов как антикоагулянтов и антиагрегантов изучена в меньшей степени. Содержание белков в экстрактах, определенное биуретовым методом, составляет в среднем 18–25 %. Выявленная биологическая активность может быть обусловлена не только наличием ферментов, но и действием полисахаридов.

По итогам первого этапа работы для дальнейшего изучения были выбраны 4 вида фракций, полученные из экстрактов 5 видов грибов: шиитаке, чешуйчатки обыкновенной, зимних и летних опят.

Плазминоген-активаторные свойства фракций, выделенных из водных экстрактов грибов

При участии плазмينا, основного белка системы фибринолиза, образующегося из предшественника плазминогена под действием активаторов, расщепляющих пептидную связь Arg561 – Val562, происходит гидролиз нитей фибрина [24, 25]. Кроме лизиса сгустков, плазминоген участвует в заживлении поврежденных тканей и слизистых оболочек.

Активирующее влияние на плазминоген проявляют компоненты водных фракций из экстрактов шиитаке и шляпок чешуйчатки обыкновенной (рисунок 4, таблица 2).

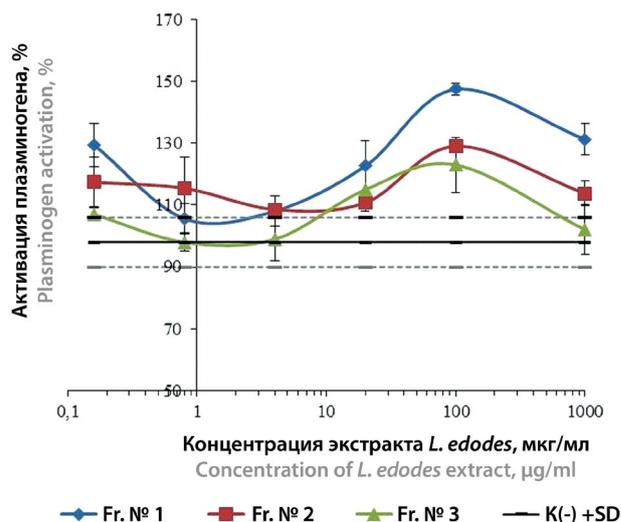


Рисунок 4. Влияние фракций, выделенных из водных экстрактов шиитаке (*L. edodes*), на активацию плазминогена ($M \pm SD$, %, $n = 3$)

Figure 4. Effects of fractions from the water extract of *L. edodes* on plasminogen activation ($M \pm SD$, %, $n = 3$)

Фракции, выделенные из водных экстрактов шляпок и ножек опят летних и зимних, не оказывают статистически значимого влияния на активацию плазминогена ($p > 0,05$, критерий Стьюдента; данные не приводятся).

Фракция № 1, выделенная из водного экстракта шиитаке (*L. edodes*), проявляет *in vitro* плазминоген-активаторные свойства и статистически значимо повышает активность плазминогена в модельной смеси с плазмой крови на 23–47 % ($p < 0,05$, критерий Стьюдента) в диапазоне концентраций 20–1000 мкг/мл (рисунок 4). Фракции № 2 и № 3 из этого вида гриба

Таблица 2. Влияние фракций, выделенных из водных экстрактов чешуйчатки обыкновенной (*Ph. squarrosa*), на активацию плазминогена ($M \pm SD$, %, $n = 3$)

Table 2. Effects of fractions from the water extract of *Ph. Squarrosa* on plasminogen activation ($M \pm SD$, %, $n = 3$)

Концентрация, мкг/мл Concentration, µg/ml	Активация плазминогена, % Plasminogen activation, %					
	Шляпки Pileus			Ножки Stipes		
	ВФр. № 1 Fr. № 1	СФр. № 2 Fr. № 2	ЩФр. № 3 Fr. № 3	ВФр. № 1 Fr. № 1	СФр. № 2 Fr. № 2	ЩФр. № 3 Fr. № 3
100	194 ± 24 [#]	123 ± 1	105 ± 1	124 ± 4 [#]	129 ± 2 [#]	90 ± 2 [#]
20,0	166 ± 6 [#]	126 ± 3 [#]	94 ± 9	118 ± 4	121 ± 2 [#]	100 ± 2
4,0	124 ± 7	120 ± 1	105 ± 4	126 ± 3 [#]	136 ± 1 [#]	101 ± 3
0,80	122 ± 3	125 ± 2 [#]	94 ± 3	118 ± 4	128 ± 2 [#]	100 ± 3
0,16	131 ± 2	120 ± 1	108 ± 4	123 ± 5	131 ± 2 [#]	96 ± 2
0,05	71 ± 2 [#]	70 ± 2 [#]	103 ± 2	67 ± 4 [#]	66 ± 3 [#]	111 ± 2
0,00	115 ± 4	115 ± 4	99 ± 4	115 ± 4	99 ± 4	99 ± 4

Примечание. [#] Статистически значимые отличия от значений, полученных для отрицательного контроля (значения вероятности, соответствующие парному критерию Стьюдента, с двусторонним распределением $p < 0,05$).

Note. [#] Statistical difference from date for negative control (Student's criterion with two-side distribution, $p < 0,05$).

приводят к активации плазминогена на 25–30 % только при действии растворов достаточно высокой концентрации – более 100 мкг/мл.

Концентрационно зависимое плазминоген-активирующее действие оказывают растворы фракции № 1, выделенной из шляпок чешуйчатки (20–100 мкг/мл) (см. таблица 2). Необходимо отметить, что при тестировании растворов водной (№ 1) и солевой (№ 2) фракций, выделенных из шляпок и ножек, этого вида грибов концентрацией 0,05 мкг/мл наблюдали статистически значимое снижение активации плазминогена в 1,5–1,7 раз. Фракции № 3 из ножек и шляпок этого вида гриба не оказывают влияния на активацию этого фермента.

Таким образом, плазминоген-активирующие свойства проявили водная и солевая фракции из экстрактов шиитаке и чешуйчатки.

Влияние водных экстрактов грибов на активность альфа-2-антиплазмина

Альфа-2-антиплазмин, являющийся основным ингибитором плазмينا в организме, характеризуется следующими свойствами: быстрым ингибированием активности плазмينا; затруднением присоединения плазминогена к фибрину; образованием перекрестных связей с альфа-цепями фибрина во время фибринообразования, что резко замедляет фибринолиз [2, 27]. Инактивация альфа-2-антиплазмина приводит к увеличению скорости фибринолиза.

На основании полученных данных (рисунок 5) необходимо отметить, что растворы фракций № 1 и № 2 из грибов шиитаке в диапазоне концентраций 4,0–20 мкг/мл статистически значимо повышают активность альфа-2-антиплазмина на 25–30 % по сравнению с растворами отрицательного контроля ($p < 0,05$, критерий Стьюдента). Фракция № 3 не оказывает влияния на этот показатель.

Фракции № 1–3, выделенные из шляпок водных экстрактов опят зимних (рисунок 6), ингибируют активность альфа-2-антиплазмина. В наибольшей степени (до 51,4%) ингибирует активность этого фермента фракция № 3, выделенная из шляпок опят зимних: статистически значимое ингибирование активности фермента (критерий Стьюдента, $p < 0,05$) получено для диапазона концентраций 0,16–100 мкг/мл.

Интересно отметить тот факт, что фракции, полученные из ножек и шляпок опят зимних, оказывают разнонаправленный эффект на активность альфа-2-антиплазмина: водные экстракты из шляпок *in vitro* ингибируют активность этого фермента, а фракции № 1–3 из ножек (0,8–0,16 мкг/мл), наоборот, приводят к увеличению его активности. Получены зависимости куполообразной формы (см. рисунок 6).

Полученные эффекты для экстрактов грибов можно сопоставить с действием тканевого активатора

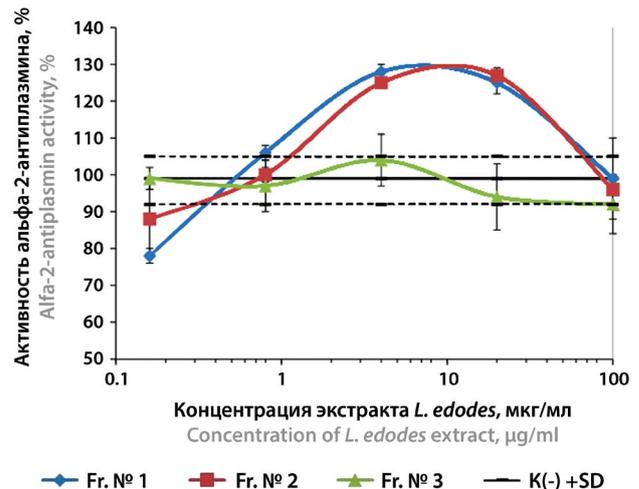


Рисунок 5. Влияние фракций, выделенных из водного экстракта шиитаке (*L. edodes*), на активность альфа-2-антиплазмина ($M \pm SD$, %, $n = 3$)

Figure 5. Effects of fractions from the water extract of *L. edodes* on alfa-2-antiplasmin activity ($M \pm SD$, %, $n = 3$)

плазминогена – тенектеплазы. Тенектеплаза, являющаяся активным действующим веществом препарата Метализе® (Metalyse®, лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения, 10 000 ЕД (50 мг), «Берингер Ингельхайм Интернешнл ГмБХ», Германия, серия 010220, срок годности до 10.2021), при тестировании *in vitro* оказывает плазминоген- и альфа-2-антиплазмин-активирующие свойства. Полученные *in vitro* зависимости изменения активности параметров фибринолиза от концентрации тестируемого препарата имеют куполообразный характер (рисунок 7). При этом *in vivo* после введения под действием снижается уровень плазминогена, фибриногена и увеличивается потребление альфа-2-антиплазмина [28].

Диапазон концентраций, для которого отмечено *in vitro* проявление биологического действия для водных экстрактов грибов и выделенных из них фракций, в целом сопоставим с тенектеплазой, хотя является менее выраженным.

Фракции, выделенные из водных экстрактов шляпок и ножек опят летних, как и суммарные экстракты, не влияют на активность альфа-2-антиплазмина. Необходимо отметить, что в отличие от суммарного водного экстракта чешуйчатки (см. таблица 1) выделенные из него фракции не оказали влияния на активность альфа-2-антиплазмина: полученные значения активности этого фермента для проб с тестируемыми объектами не имеют статистических отличий от значений отрицательного контроля (критерий Стьюдента, $p > 0,05$; данные не приводятся).

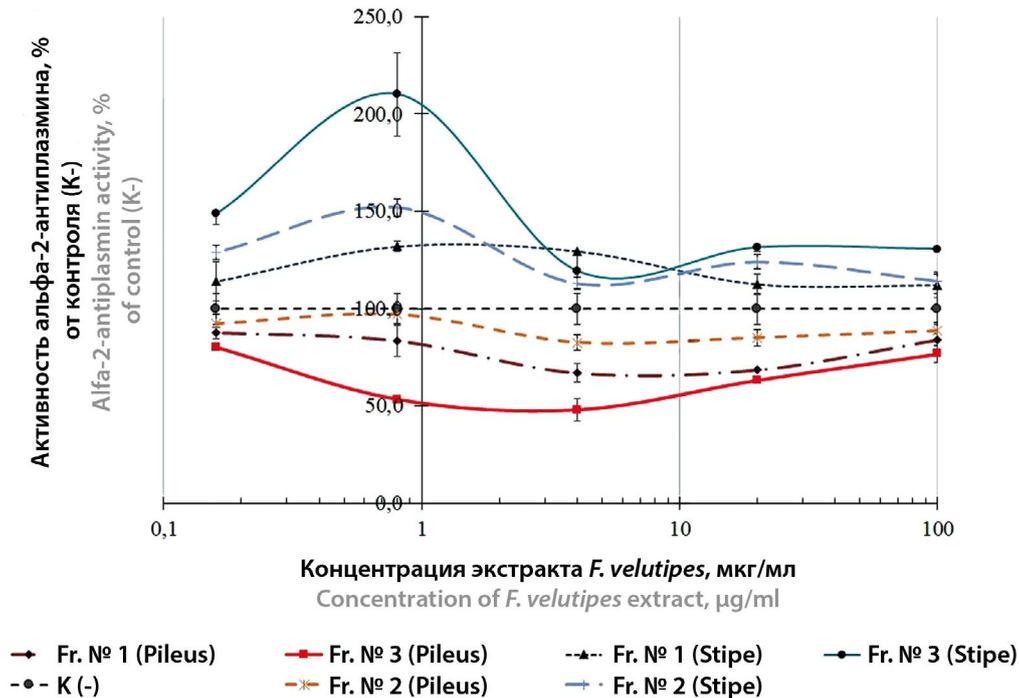


Рисунок 6. Влияние фракций, выделенных из водных экстрактов опят зимних на активность альфа-2-антиплазмина ($M \pm SD$, %, $n = 3$):

1 – условное обозначение проб включает обозначение части плодового тела гриба (pileus – «шляпка», stipe – «ножка») и номер фракции (Fr. 1, Fr. 2, Fr. 3); 2 – K (-) – отрицательный контроль; 3 – на оси ординат приведена относительная активность альфа-2-антиплазмина, % от отрицательного контроля

Figure 6. Effects of fractions from water extract of *F. velutipes* (Curtis) Signer on alfa-2-antiplasmin activity ($M \pm SD$, %, $n = 3$):

1 – the designation of the samples includes the fraction number (Fr. 1, Fr. 2, Fr. 3), the part of the mushroom (Pileus, Stipe); 2 – K (-) – negative control; 3 – on the ordinate axis the relative activity of alpha-2-antiplasmin, % of the negative control is given

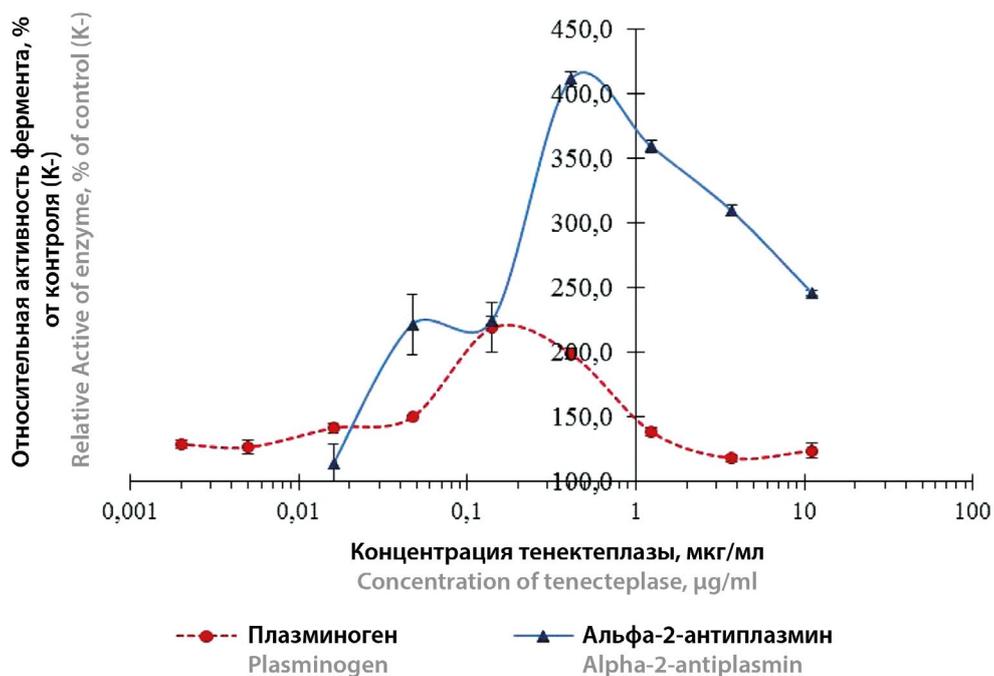


Рисунок 7. Влияние тенектеплазы (мгк/мл) на активность альфа-2-антиплазмина и активацию плазминогена ($M \pm SD$, $n = 3$)

Figure 7. Effect of tenecteplase ($\mu\text{g/ml}$) on alpha-2-antiplasmin activity and plasminogen activation ($M \pm SD$, $n = 3$)

Таким образом, из всех изученных экстрактов грибов на активность альфа-2-антиплазмина статистически значимое влияние оказывают фракции, выделенные из экстрактов грибов шиитаке и опят зимних.

Оценка влияния тестируемых объектов на концентрацию фибриногена

Фибриноген, циркулирующий в кровотоке, является единственным субстратом для образования фибринового сгустка крови (тромба) [1–3]. В *in vitro* исследованиях снижение концентрации этого белка в модельных смесях с плазмой крови и, соответственно, увеличение времени формирования сгустка может быть связано не только с фибринолитическими свойствами тестируемых соединений, но и антитромботическим действием, обусловленным предположительно свойствами полисахаридов.

Компоненты водной фракции № 1 из грибов шиитаке *in vitro* оказывают незначительное влияние на время формирования фибринового сгустка и снижают концентрацию фибриногена в плазме крови только на 12–20 % в диапазоне концентраций 4–100 мкг/мл (таблица 3). Более выраженное действие на данный параметр оказывают солевая (№ 2) и щелочная (№ 3) фракции, выделенные из шляпок опят летних, в диапазоне концентраций 0,8–100 мкг/мл: статистически значимо снижают концентрацию фибриногена в плазме крови, следовательно, увеличивают время образования фибринового сгустка в среднем на 30–45 % (таблица 4).

Фракции, выделенные из водных экстрактов чешуйчатки обыкновенной и опят зимних, не оказывают статистически значимого влияния на концентрацию фибриногена в плазме крови и не вызывают изменения времени образования сгустка фибрина (данные не приводятся).

Таблица 3. Влияние фракций, выделенных из водного экстракта шиитаке (*L. edodes*), на концентрацию фибриногена в плазме крови *in vitro*, г/л (M ± SD)

Table 3. Effects of fractions from the water extract of *L. edodes* on the concentration of fibrinogen in blood plasma *in vitro*, g/l (M ± SD)

Концентрация экстрактов, мкг/мл Concentration, µg/ml	Концентрация фибриногена, г/л The concentration of fibrinogen, g/l		
	ВФр № 1 (n = 4)	СФр № 2 (n = 2)	ЩФр № 3 (n = 2)
	Fr. № 1 (n = 4)	Fr. № 2 (n = 2)	Fr. № 3 (n = 2)
100	1,83 ± 0,03 [#]	1,72 ± 0,02 [#]	1,93 ± 0,08
20	1,78 ± 0,06 [#]	1,9 ± 0,2	1,6 ± 0,3
4,0	1,94 ± 0,06 [#]	1,9 ± 0,2	2,15 ± 0,08
0,8	2,0 ± 0,1	2,2 ± 0,2	2,0 ± 0,1
0,16	1,9 ± 0,1	2,0 ± 0,3	1,96 ± 0,06
0,00	2,2 ± 0,07		

Примечание. [#] Статистически значимые отличия от значений, полученных для отрицательного контроля (критерий Стьюдента с двусторонним распределением $p < 0,05$).

Note. [#] Statistical difference from date for negative control (Student's criterion with two-side distribution, $p < 0,05$).

Оценка влияния тестируемых объектов на фибринолитическую активность плазмы крови человека (время полного лизиса эуглобулиновой фракции)

Тест эуглобулинового времени лизиса сгустка (XIIa-зависимый фибринолиз) оценивает способность системы лизировать сгусток, получаемый из эуглобулиновой фракции плазмы крови при добавлении к ней раствора хлорида кальция. С помощью данного теста можно оценить общее изменение активности системы лизиса без детализации механизма этого влияния, так как получаемый в ходе реакции эугло-

Таблица 4. Влияние фракций, выделенных из водных экстрактов опят летних (*K. mutabilis*), на концентрацию фибриногена в плазме крови *in vitro*, г/л (M ± SD, n = 4)

Table 4. Effects of fractions from the water extract of *K. mutabilis* on the concentration of fibrinogen in blood plasma *in vitro*, g/l (M ± SD, n = 4)

Концентрация, мкг/мл Concentration, µg/ml	Концентрация фибриногена, г/л The concentration of fibrinogen, g/l					
	Шляпки Pileus			Ножки Stipes		
	ВФр № 1 Fr. № 1	СФр № 2 Fr. № 2	ЩФр № 3 Fr. № 3	ВФр № 1 Fr. № 1	СФр № 2 Fr. № 2	ЩФр № 3 Fr. № 3
100	1,92 ± 0,1	1,0 ± 0,2 [#]	0,90 ± 0,01 [#]	1,41 ± 0,07	1,52 ± 0,14	1,48 ± 0,02
20	1,66 ± 0,01	1,17 ± 0,03 [#]	1,0 ± 0,2	1,37 ± 0,02 [#]	1,41 ± 0,06	1,51 ± 0,00
4,0	1,92 ± 0,00	1,2 ± 0,1	0,90 ± 0,01 [#]	1,36 ± 0,06 [#]	1,7 ± 0,3	1,41 ± 0,00
0,8	1,85 ± 0,14	1,14 ± 0,01 [#]	1,39 ± 0,02 [#]	2,1 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,5 ± 0,1
0,16	1,85 ± 0,04	1,51 ± 0,02	1,51 ± 0,01	...	1,56 ± 0,04	1,41 ± 0,06
0,00	1,66 ± 0,05					

Примечание. [#] Статистически значимые отличия от значений, полученных для отрицательного контроля (критерий Стьюдента с двусторонним распределением $p < 0,05$); «...» – анализ не проводили.

Note. [#] Statistical difference from date for negative control (Student's criterion with two-side distribution, $p < 0,05$); «...» – analysis has not been done.

булиновый сгусток не содержит ингибиторов фибринолиза [1, 29].

Фибринолитическая активность плазмы крови человека с нормальными параметрами гемостаза составила $8,7 \pm 0,6$ мин, для плазмы крови со сниженными параметрами гемостаза – $11,9 \pm 0,9$ мин, что соответствует допустимым значениям для контрольных плазм в соответствии с паспортом к набору ($7,0 \pm 2,0$ мин и $10,0 \pm 2,0$ мин соответственно).

Добавки испытуемых растворов фракций, выделенных из грибов шиитаке, вызывают концентрационно зависимое повышение фибринолитической активности плазмы крови и статистически значимо снижают время полного лизиса эуглобулинового сгустка в 2–2,8 раза: фракция № 1 в диапазоне концентраций 0,5–5,0 мкг/мл, фракции № 2 и № 3 – 0,004–5,0 мг/мл (таблица 5).

Водные фракции № 1, выделенные из шляпок и ножек грибов чешуйчатки обыкновенной, а также солевая фракция № 2 из шляпок этого вида грибов не оказывают влияния на изучаемый показатель (таблица 6). Для растворов фракции № 3 из шляпок с концентрациями 0,02–5,0 мг/мл отмечено небольшое снижение времени лизиса эуглобулинового сгустка на 13–24 %. Солевая (№ 2) и щелочная (№ 3) фракции, выделенные из ножек грибов чешуйчатки обыкновенной, в диапазоне концентраций 0,02–5,0 мг/мл вызывают повышение фибринолитической активности плазмы, вызывая дозозависимое снижение времени полного лизиса эуглобулинового сгустка в среднем на 15–34 %, однако в меньшей степени, чем экстракты из грибов шиитаке.

Наиболее выраженным фибринолитическим действием обладают солевая и щелочная фракции, выделенные из опят зимних и опят летних (таблицы 7, 8).

Таблица 5. Влияние фракций, выделенных из водного экстракта шиитаке (*L. edodes*), на фибринолитическую активность плазмы крови ($M \pm SD$, мин, $n = 3$)

Table 5. Effects of fractions from the water extract of *L. edodes* on the fibrinolytic activity of blood plasma ($M \pm SD$, min, $n = 3$)

Концентрация, кг/мл* Concentration, µg/ml*	Время полного лизиса эуглобулинового сгустка, мин Euglobulin clot lysis time, min		
	ВФр № 1 Fr. № 1	СФр № 2 Fr. № 2	ЩФр № 3 Fr. № 3
	5000	$4,6 \pm 0,4^{\#}$	$3,4 \pm 0,3^{\#}$
1250	$5,1 \pm 0,1^{\#}$	$4,4 \pm 0,4^{\#}$	$3,6 \pm 0,4^{\#}$
500	$5,5 \pm 0,4^{\#}$	$4,2 \pm 0,3^{\#}$	$4,4 \pm 0,4^{\#}$
100	$7,1 \pm 0,5$	$5,5 \pm 0,3^{\#}$	$7,4 \pm 0,4$
20,0	$8,5 \pm 0,3$	$6,5 \pm 0,3^{\#}$	$7,7 \pm 0,4$
4,00	$8,7 \pm 0,5$	$6,6 \pm 0,2^{\#}$	$7,9 \pm 0,4$
0,80	$8,8 \pm 0,2$	$8,1 \pm 0,2$	$8,3 \pm 0,8$
0,00	$8,8 \pm 0,3$		

Примечания. 1. * Здесь и далее концентрация тестируемых объектов приведена с учетом разбавления проб в реакционной смеси ($k = 2$).

2. * Статистически значимые отличия от значений, полученных для отрицательного контроля (критерий Стьюдента с двусторонним распределением $p < 0,05$).

Notes. 1. * Hereinafter, the concentration of the tested objects is given taking into account the dilution in the reaction mixture by 2 times.

2. * Statistical difference from date for negative control (Student's criterion with two-side distribution, $p < 0,05$).

Фракции № 2 и № 3, выделенные из шляпок опят зимних, и фракция № 3, выделенная из ножек этого вида грибов, статистически значимо снижают время лизиса эуглобулинового сгустка в широком диапазоне концентраций 0,004–5,0 мг/мл на 15–40 %.

Фракции № 2 и № 3, выделенные из водных экстрактов шляпок и ножек опят летних, проявляют выраженное фибринолитическое действие в широком

Таблица 6. Влияние фракций, выделенных из водных экстрактов чешуйчатки обыкновенной (*Ph. squarrosa*), на фибринолитическую активность плазмы крови ($M \pm SD$, мин, $n = 3$)

Table 6. Effects of fractions from the water extract of *Ph. squarrosa* on the fibrinolytic activity of blood plasma ($M \pm SD$, min, $n = 3$)

Концентрация, мг/мл Concentration, µg/ml	Время полного лизиса эуглобулинового сгустка, мин Euglobulin clot lysis time, min					
	Шляпки Pileus			Ножки Stipes		
	ВФр № 1 Fr. № 1	СФр № 2 Fr. № 2	ВФр № 1 Fr. № 1	СФр № 2 Fr. № 2	ВФр № 1 Fr. № 1	СФр № 2 Fr. № 2
5000	$7,5 \pm 0,4$	$7,4 \pm 0,3$	$6,4 \pm 0,5^{\#}$	$7,3 \pm 0,3$	$5,9 \pm 0,4^{\#}$	$5,6 \pm 0,3^{\#}$
1250	$8,2 \pm 0,0$	$7,9 \pm 0,4$	$6,8 \pm 0,2^{\#}$	$7,5 \pm 0,1$	$6,2 \pm 0,7^{\#}$	$6,2 \pm 0,6^{\#}$
500	$8,0 \pm 0,3$	$8,1 \pm 0,5$	$7,3 \pm 0,2^{\#}$	$7,4 \pm 0,5$	$6,8 \pm 0,7^{\#}$	$6,6 \pm 0,5^{\#}$
100	$8,8 \pm 0,3$	$7,7 \pm 0,4$	$7,3 \pm 0,4$	$7,7 \pm 0,2$	$7,1 \pm 0,3^{\#}$	$7,2 \pm 0,2^{\#}$
20,0	$8,5 \pm 0,0$	$8,3 \pm 0,4$	$8,4 \pm 0,3$	$8,2 \pm 0,4$	$7,4 \pm 0,2$	$7,6 \pm 0,3$
4,00	$9,0 \pm 0,2$	$8,8 \pm 0,3$	$8,3 \pm 0,6$	$8,0 \pm 0,1$	$8,0 \pm 0,3$	$8,2 \pm 0,7$
0,0	$8,4 \pm 0,5$					

Примечание. * Статистически значимые отличия от значений, полученных для отрицательного контроля (критерий Стьюдента с двусторонним распределением $p < 0,05$).

Note. * Statistical difference from date for negative control (Student's criterion with two-side distribution, $p < 0,05$).

Таблица 7. Влияние фракций, выделенных из водных экстрактов опят зимних (*F. velutipes*), на фибринолитическую активность плазмы крови (M ± SD, мин)

Table 7. Effects of fractions from the water extract of *F. velutipes* on the fibrinolytic activity of blood plasma (M ± SD, min)

Концентрация, мг/мл Concentration, µg/ml	Время полного лизиса эуглобулинового сгустка, мин Euglobulin clot lysis time, min					
	Шляпки Pileus			Ножки Stipes		
	ВФр № 1 (n = 2) Fr. № 1 (n = 2)	СФр № 2 (n = 3) Fr. № 2 (n = 3)	ЩФр № 3 (n = 3) Fr. № 3 (n = 3)	ВФр № 1 (n = 2) Fr. № 1 (n = 2)	СФр № 2 (n = 3) Fr. № 2 (n = 3)	ЩФр № 3 (n = 3) Fr. № 3 (n = 3)
5000	8,5 ± 0,1	5,2 ± 0,4 [#]	...	8,6 ± 0,2	7,3 ± 0,3 [#]	5,9 ± 0,1 [#]
500	8,2 ± 0,2	6,0 ± 0,2 [#]	5,7 ± 0,3 [#]	8,4 ± 0,5	8,3 ± 0,2	6,4 ± 0,2 [#]
100	7,9 ± 0,1	6,7 ± 0,2 [#]	6,4 ± 0,6 [#]	8,8 ± 0,5	8,3 ± 0,3	6,5 ± 0,3 [#]
20,0	8,0 ± 0,2	7,3 ± 0,3 [#]	7,3 ± 0,5 [#]	9,1 ± 0,1	8,2 ± 0,5	6,6 ± 0,4 [#]
4,00	8,0 ± 0,3	7,2 ± 0,1 [#]	7,6 ± 0,6 [#]	9,1 ± 0,5	7,9 ± 0,5	7,0 ± 0,5 [#]
0,80	8,6 ± 0,6	8,1 ± 0,3	8,2 ± 0,4	8,8 ± 0,3	8,5 ± 0,2	7,8 ± 0,4
0,0	8,8 ± 0,4					

Примечания. 1. [#] Статистически значимые отличия от значений, полученных для отрицательного контроля (критерий Стьюдента с двусторонним распределением, $p < 0,05$).

2) «...» – анализ не проводили.

Notes. 1. # Statistical difference from date for negative control (Student's criterion with two-side distribution, $p < 0,05$).

2. «...» – analysis has not been done.

Таблица 8. Влияние фракций, выделенных из водных экстрактов опят летних (*K. mutabilis*), на фибринолитическую активность плазмы крови (M ± SD, мин)

Table 8. Effects of fractions from the water extract of *K. mutabilis* on the fibrinolytic activity of blood plasma (M ± SD, min)

Концентрация, мг/мл Concentration, µg/ml	Время полного лизиса эуглобулиновой фракции, мин Euglobulin clot lysis time, min					
	Шляпки Pileus			Ножки Stipes		
	ВФр № 1 (n = 2) Fr. № 1 (n = 2)	СФр № 2 (n = 3) Fr. № 2 (n = 3)	ЩФр № 3 (n = 3) Fr. № 3 (n = 3)	ВФр № 1 (n = 3) Fr. № 1 (n = 3)	СФр № 2 (n = 3) Fr. № 2 (n = 3)	ЩФр № 3 (n = 3) Fr. № 3 (n = 3)
5000	7,1 ± 0,2 [#]	3,6 ± 0,4 [#]	4,5 ± 0,4 [#]	7,9 ± 0,3	5,6 ± 0,1 [#]	4,4 ± 0,3 [#]
500	7,8 ± 0,4	3,5 ± 0,5 [#]	4,4 ± 0,5 [#]	7,5 ± 0,3 [#]	4,2 ± 0,3 [#]	5,0 ± 0,7 [#]
100	8,1 ± 0,3	2,4 ± 0,3 [#]	4,9 ± 0,7 [#]	6,5 ± 0,4 [#]	5,0 ± 0,5 [#]	5,4 ± 0,8 [#]
20,0	9,3 ± 0,3	2,9 ± 0,3 [#]	6,8 ± 0,7 [#]	6,3 ± 0,3 [#]	6,4 ± 0,2 [#]	6,4 ± 0,2 [#]
4,00	9,0 ± 0,1	6,0 ± 0,1 [#]	7,1 ± 0,4 [#]	6,5 ± 0,2 [#]	6,3 ± 0,3 [#]	6,3 ± 0,2 [#]
0,08	8,7 ± 0,2	7,6 ± 0,6	8,2 ± 0,8	7,4 ± 0,5	8,1 ± 0,7	8,6 ± 0,6
0,0	8,4 ± 0,6					

Примечание. [#] Статистически значимые отличия от значений, полученных для отрицательного контроля (критерий Стьюдента с двусторонним распределением $p < 0,05$).

Note. [#] Statistical difference from date for negative control (Student's criterion with two-side distribution, $p < 0,05$).

диапазоне концентраций 0,004–5,0 мг/мл, дозозависимо снижая время лизиса эуглобулинового сгустка на 25–50 %.

Водные экстракты из шляпок и ножек лентинеллуса уховидого, опят луковичноногих, северных и серопластинчатых не оказывают влияния на фибринолитическую активность плазмы крови: время лизиса эуглобулиновых сгустков при действии испытуемых растворов этих экстрактов не имеет статистически значимых отличий от растворов отрицательного контроля.

При сопоставлении полученных эффектов для различных фракций (таблица 9) необходимо отметить, что выраженное влияние на активность плазминогена и альфа-2-антиплазмина *in vitro* оказывают полисахаридные компоненты, содержащиеся преимущественно в водной фракции № 1 и частично в солевой фракции № 2, за исключением этих фракций, выделенных из *K. mutabilis*, при этом водная фракция практически не проявляет фибринолитического действия и не влияет на время лизиса эуглобулинового сгустка и концентрацию фибриногена в отличие от фракций № 2 и № 3, содержащих белки. Фракции № 2 и № 3, выделенные из 4 видов грибов, проявляют выраженную фибринолитическую активность и снижают время полного лизиса эуглобулинового сгустка и концентрацию фибриногена (фракции из *K. mutabilis*), что может быть обусловлено действием ряда протеолитически активных белков (ферментов), присутствующих в составе этих фракций.

ридные компоненты, содержащиеся преимущественно в водной фракции № 1 и частично в солевой фракции № 2, за исключением этих фракций, выделенных из *K. mutabilis*, при этом водная фракция практически не проявляет фибринолитического действия и не влияет на время лизиса эуглобулинового сгустка и концентрацию фибриногена в отличие от фракций № 2 и № 3, содержащих белки. Фракции № 2 и № 3, выделенные из 4 видов грибов, проявляют выраженную фибринолитическую активность и снижают время полного лизиса эуглобулинового сгустка и концентрацию фибриногена (фракции из *K. mutabilis*), что может быть обусловлено действием ряда протеолитически активных белков (ферментов), присутствующих в составе этих фракций.

Таблица 9. Сводные данные оценки влияния фракций, выделенных из экстрактов изучаемых видов грибов на параметры фибринолиза
Table 9. The summary data on the effect of fractions isolated from water extracts of the mushrooms on Fibrinolysis Parameters

Вид гриба Types of mushrooms	Фракции Fraction	Характер действия на параметры фибринолиза Effects on fibrinolysis parameters			
		Активация плазминогена, % Plasminogen activation, %	Активность альфа-2-антиплазмина, % Alfa-2-antiplasmin activity, %	Фибриноген Concentration of the fibrinogen	Фибрино-литическая активность Fibrinolytic activity
<i>L. edodes</i>	№ 1 Водная Water-soluble Fr. № 1	↑ на 25–50 % (C = 20–1000) ↑ by 25–50 % (C = 20–1000)	↑ на 25–28 % (C = 4,0–20) ↑ by 25–28 % (C = 4,0–20)	Незначительное влияние Slight effect	↑ на 37–47 % (C = 500–5000) ↑ by 37–47 % (C = 500–5000)
	№ 2 Солевая Salt Fr. № 2	↑ на 16–32 % (C = 100–1000) ↑ by 16–32 % (C = 100–1000)	↑ на 25–27 % (C = 20–1000) ↑ by 25–27 % (C = 20–1000)	Нет влияния No effects	↑ на 25–61 % (C = 4,0–5000) ↑ by 25–61 % (C = 4,0–5000)
	№ 3 Щелочная Alkali Fr. № 3	Нет влияния No effects	Нет влияния No effects	Нет влияния No effects	↑ на 16–64 % (C = 100–5000) ↑ by 16–64 % (C = 100–5000)
<i>P. squarrosa</i>	№ 1 Водная Water-soluble Fr. № 1	↑ на 39–76 % (C = 20–100, шляпки, Pileus) ↑ by 39–76 % (C = 20–100, caps, Pileus)			Нет влияния No effects
	№ 2 Солевая Salt Fr. № 2	↑ на 21–36 % (C = 0,16–100, ножки, Stipes) ↑ by 21–36 % (C = 0,16–100, legs, Stipes)	Нет влияния No effects	Нет влияния No effects	↑ на 15–30 % (C = 100–5000, ножки, Stipes) ↑ by 15–30 % (C = 100–5000, legs, Stipes)
	№ 3 Щелочная № 3 Alkali	Влияние отсутствует No effects			↑ на 14–36 % (C = 100–5000, ножки, Stipes) ↑ by 14–36 % (C = 100–5000, legs, Stipes)
<i>F. velutipes</i>	Водная (№ 1) Water-soluble Fr. № 1		↓ на 16–33 % (C = 0,8–100, шляпки, Pileus); ↑ на 15–32 % (C = 0,8–4,0, ножки, Stipes) ↓ by 16–33 % (C = 0,8–100, caps, Pileus); ↑ by 15–32 % (C = 0,8–4,0, legs, Stipes)		Нет влияния No effects
	Солевая (№ 2) Salt Fr. № 2	Нет влияния No effects	↑ до 52 % (C = 0,16–0,8, ножки, Stipes) ↑ up to 52 % (C = 0,16–0,8, legs, Stipes)	Нет влияния No effects	↑ на 15–40 % (C = 4,0–5000, шляпки, Pileus) ↑ by 15–40 % (C = 4,0–5000, caps, Pileus)
	Щелочная (№ 3) Alkali Fr. № 3		↓ на 20–52 % (C = 0,16–100, шляпки, Pileus); ↑ на 150–210 % (C = 0,16–0,8, ножки, Stipes) ↓ by 20–52 % (C = 0,16–100, caps, Pileus); ↑ by 150–210 % (C = 0,16–0,8, legs, Stipes)		↑ на 15–40 % (C = 20–5000, шляпки, ножки, Pileus, Stipes) ↑ by 15–40 % (C = 20–5000, caps, legs, Pileus, Stipes)
<i>K. mutabilis</i>	Водная (№ 1) Water-soluble Fr. № 1			Нет влияния No effects	Незначительное влияние Slight effect
	Солевая (№ 2) Salt Fr. № 2	Нет влияния No effects	Нет влияния No effects	↓ до 40 % (C = 0,16–100, шляпки Pileus) ↓ up to 40 % (C = 0,16–100, Pileus hats)	↑ до 70 % (C = 4,0–5000 шляпки, ножки, Pileus, Stipes) ↑ up to 70 % (C = 4,0–5000 caps, legs, Pileus, Stipes)
	Щелочная (№ 3) Alkali Fr. № 3			↓ до 40 % (C = 0,16–100, шляпки, Pileus) ↓ up to 40 % (C = 0,16–100, caps, Pileus)	↑ до 46 % (C = 4,0–5000 шляпки, ножки, Pileus, Stipes) ↑ up to 46 % (C = 4,0–5000 caps, legs, Pileus, Stipes)

Примечание. Условные обозначения: ↑ – увеличение активности; ↓ – ингибирование активности, снижение концентрации; C – концентрация испытуемых растворов тестируемых объектов, мкг/мл.
Note. Symbols: ↑ – increase in activity; ↓ – inhibition of activity, decrease in concentration; C – concentration of test solutions of test objects, µg/ml.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведения исследования *in vitro* была изучена потенциальная антитромботическая и фибринолитическая активность водных экстрактов грибов:

- 1) шиитаке (*L. edodes*);
- 2) чешуйчатки обыкновенной (*Ph. squarrosa*);
- 3) опенка зимнего (*F. velutipes*);
- 4) опенка летнего (*K. mutabilis*);
- 5) лентинеллуса уховидного (*L. cochleatus*);
- 6) опенка луковичного (*A. cepistipes*);
- 7) опенка северного (*A. borealis*);
- 8) опенка серопластинчатого (*H. capnoides*).

Влияние водных экстрактов этих видов грибов на отдельные параметры фибринолиза (активацию плазминогена, активность альфа-2-антиплазмина, время лизиса эуглобулинового сгустка, концентрацию фибриногена) ранее не было изучено.

Фракции, выделенные из грибов шиитаке (*L. edodes*), обладают выраженной антитромботической активностью и оказывают влияние в разной степени на все изучаемые параметры фибринолиза. Фракции, выделенные из экстрактов шляпок и ножек чешуйчатки обыкновенной (*Ph. squarrosa*), летних (*K. mutabilis*) и зимних (*F. velutipes*) опять, также проявляют *in vitro* антитромботическую (фибринолитическую) активность, оказывая статистически значимое влияние на разные параметры фибринолиза.

Водные экстракты, выделенные из опят луковичноногих (*A. cepistipes*), северных (*A. borealis*) и серопластинчатых (*H. capnoides*), не оказывают влияния на изученные параметры фибринолиза и концентрации фибриногена.

Деление плодовых тел грибов на ножки и шляпки для получения экстрактов, скорее всего, не является целесообразным, так как значительных различий между экстрактами, выделенными из ножек и из шляпок, по биологическому действию в целом не выявлено. При фракционировании суммарных экстрактов выбранным способом было показано, что полисахариды водных экстрактов грибов оказывают влияние на активность плазминогена и альфа-2-антиплазмина, в то время как наличие фибринолитической активности обеспечивается белками, в составе которых, вероятно, присутствуют протеолитические ферменты.

Полученные данные позволяют рекомендовать водные экстракты из этих грибов для дальнейшего изучения, в том числе *in vivo*, например, с целью создания антитромботических лекарственных средств или разработки функциональных пищевых продуктов при сердечно-сосудистых заболеваниях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жалялов А. С., Баландина А. Н., Купраш А. Д., Шривастава А., Шибекко А. М. Современные представления о системе фибринолиза и методах диагностики ее нарушений. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. 2017;16(1):69–82. DOI: 10.24287/1726-1708-2017-16-1-69-82.
2. Cesarman-Maus G., Hajjar K. A. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British Journal of Haematology*. 2005;129(3):307–321. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2005.05444.x.

3. Carpenter S. L., Mathew P. Alpha2-antiplasmin and its deficiency: fibrinolysis out of balance. *Haemophilia*. 2008;14(6):1250–1254.
4. Литвинов Р. И. Молекулярные механизмы и клиническое значение фибринолиза. *Казанский медицинский журнал*. 2013;94(5):711–718.
5. Денисова Н. П. Тромболитические свойства ферментов базидиальных грибов. *Проблемы медицинской микологии*. 2009;11(4):3–9.
6. Park S.-E., Li M.-H., Kim J.-S., Sapkota K., Kim J.-E., Choi B.-S., Yoon Y.-H., Lee J.-C., Lee H.-H., Kim C.-S., Kim S.-J. Purification and characterization of a fibrinolytic protease from a culture supernatant of *Flammulina velutipes* mycelia. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2007;71(9):2214–2222. DOI: 10.1271/bbb.70193.
7. Kim J.-H., Lee E.-J., Seok S.-J. Fibrinolytic and α -Glucosidase Inhibitory Activities of Wild Mushroom Methanol Extracts. *The Korean Journal of Mycology*. 2007;35(2):128–132. DOI: 10.4489/KJM.2007.35.2.128.
8. Lee S.-Y., Kim J.-S., Kim J.-E., Sapkota K., Shen M.-H., Kim S., Chun H.-S., Yoo J.-C., Choi H.-S., Kim M.-K., Kim S.-J. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from cultured mycelia of *Armillaria mellea*. *Protein Expression and Purification*. 2005;43(1):10–7. DOI: 10.1016/j.pep.2005.05.004.
9. Choi J.-H., Kim S. Fibrinolytic and Thrombolytic Effects of an Enzyme Purified from the Fruiting Bodies of *Boletus pseudocalopus* (Agaricomycetes) from Korea. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2021;23(4):47–57. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.2021037957.
10. Islam M. R., Uddin Pk M. M. *In vitro* Doses and Incubations Dependent Thrombolytic Potential Study of Edible Mushrooms *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum* and *Lentinula edodes* Available in Bangladesh. *Journal of Pharmaceutical Research International*. 2015;7(1): 44–51. DOI: 10.9734/BJPR/2015/18227.
11. Denisova N. P. History of the Study of Thrombolytic and Fibrinolytic Enzymes of Higher Basidiomycetes Mushrooms at the V. L. Komarov Botanical Institute in Saint Petersburg, Russia. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2010;12(3):317–325. DOI: 10.1615/IntJMedMushr.v12.i3.110.
12. Шаркова Т. С., Кураков А. В., Осмоловский А. А., Матвеева Э. О., Крейер В. Г., Баранова Н. А., Егоров Н. С. Скрининг продуцентов протеиназ с фибринолитической и коллагенолитической активностями среди микромицетов. *Микробиология*. 2015;84(3):316–322. DOI: 10.7868/S0026365615030180.
13. Попова Е. А., Осмоловский А. А., Крейер В. Г., Котова И. Б., Егоров Н. С. Продукция штаммом *Aspergillus ustus* протеиназ, высокоактивных в отношении фибриллярных белков. *Микология и фитопатология*. 2019;53(4):229–235.
14. Осмоловский А. А., Орехова А. В., Конти Э., Крейер В. Г., Баранова Н. А., Егоров Н. С. Получение и стабильность комплексного препарата протеиназ *Aspergillus ochraceus* L-1 с фибринолитической и антикоагулянтной активностью. *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология*. 2020;75(3):158–163.
15. Шамцян М. М., Петрищев Н. Н., Денисова Н. П., Чефу С. Г., Васина Е. Ю., Тозик Е. В., Колесников Б. А. Ферментный препарат тромболитического и фибринолитического действия из базидиального гриба рода *Coprinus*. Патент RU2435848C1. 2010. Доступно по: <https://patent.ru/patent/RU2435848C1>. Ссылка активна на 01.12.2023.
16. Ву А. Х. Б., ред. Клиническое руководство Тица по лабораторным тестам. М.: Лабора; 2013. 1380 с.
17. Баркаган З. С., Момот А. П. Диагностика и контролируемая терапия нарушения гемостаза. М.: Ньюдиамед; 2008. 292 с.
18. Gong P., Wang S., Liu M., Chen F., Yang W., Chang X., Liu N., Zhao Y., Jing Wang, Chen X., Extraction methods, chemical characterizations and biological activities of mushroom polysaccharides: A mini-review. *Carbohydrate Research*. 2020;494. DOI: 10.1016/j.carres.2020.1080.
19. Villares A., Mateo-Vivaracho L., Guillamón E. Structural Features and Healthy Properties of Polysaccharides Occurring in Mushrooms. *Agriculture*. 2012;2(4):452–471. DOI: 10.3390/agriculture2040452.
20. Кузнецова Т. А. Антикоагулянтная и антитромботическая активность сульфатированных полисахаридов морских водорослей. *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2020;(2):53–59. DOI: 10.25555/THR.2020.2.0918.
21. Yoon S.-J., Yu M.-A., Pyun Y.-R., Hwang J.-K., Djong-Chi Ch.-D., Juneja L. R., Paulo A. S., Mourão P. A. S. The nontoxic mushroom *Auricularia auricula* contains a polysaccharide with anticoagulant activity mediated by antithrombin. *Thrombosis Research*. 2003;112(3):151–158. DOI: 10.1016/j.thromres.2003.10.022.

22. Huang X., Nie S. The structure of mushroom polysaccharides and their beneficial role in health. *Food Funct.* 2015;6(10):3205–3217. DOI: 10.1039/c5fo00678c.
23. Lin H., Xu L., Yu S., Hong W., Huang M., Xu P. Therapeutics targeting the fibrinolytic system. *Experimental & Molecular Medicine.* 2020;52:367–379. DOI: 10.1038/s12276-020-0397-x.
24. Collen D., de Maeyer L. Molecular biology of human plasminogen. I. Physicochemical properties and microheterogeneity. *Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica.* 1975;34(2):396–402.
25. Brandt J.T. Plasminogen and tissue-type plasminogen activator deficiency as risk factors for thromboembolic disease. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine.* 2002;126(11):1376–1381 DOI: 10.5858/2002-126-1376-PATTPA.
26. Mandle R.J., Kaplan A.P. Hageman-factor-dependent fibrinolysis: generation of fibrinolytic activity by the interaction of human activated factor XI and plasminogen. *Blood.* 1979;54(4):850–862.
27. Mast A.E., Enghild J.J., Pizzo S.V., Salvesen G. Analysis of the plasma elimination kinetics and conformational stabilities of native, proteinase-complexed and reactive site cleaved serpins: comparison of .alpha.1-proteinase inhibitor, .alpha.1-antichymotrypsin, antithrombin III, .alpha.2-antiplasmin, angiotensinogen, and ovalbumin. *Biochemistry.* 1991;30(6):1723–1730. DOI: 10.1021/bi00220a039.
28. 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):351–356. DOI: 10.1161/01.cir.95.2.351.
29. Collen D. On the regulation and control of fibrinolysis. Edward Kowalski Memorial Lecture. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 1980;43(2):77–89.

REFERENCES

1. Zhalyalov A.S., Balandina A.N., Kuprash A.D., Srivastava A., Shibeiko A.M. The overview of fibrinolysis system contemporary concepts and of its disorders diagnostic methods. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology.* 2017;16(1):69–82. (In Russ.) DOI: 10.24287/1726-1708-2017-16-1-69-82.
2. Cesarman-Maus G., Hajjar K.A. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British Journal of Haematology.* 2005;129(3):307–321. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2005.05444.x.
3. Carpenter S.L., Mathew P. Alpha2-antiplasmin and its deficiency: fibrinolysis out of balance. *Haemophilia.* 2008;14(6):1250–1254.
4. Litvinov R.I. Molecular mechanisms and clinical significance of fibrinolysis. *Kazan medical journal.* 2013;94(5):711–718. (In Russ.)
5. Denisova N.P. Thrombolytic peculiarities of basidial fungi. *Problems in medical mycology.* 2009;11(4):3–9. (In Russ.)
6. Park S.-E., Li M.-H., Kim J.-S., Sapkota K., Kim J.-E., Choi B.-S., Yoon Y.-H., Lee J.-C., Lee H.-H., Kim C.-S., Kim S.-J. Purification and characterization of a fibrinolytic protease from a culture supernatant of *Flammulina velutipes* mycelia. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 2007;71(9):2214–2222. DOI: 10.1271/bbb.70193.
7. Kim J.-H., Lee E.-J., Seok S.-J. Fibrinolytic and α -Glucosidase Inhibitory Activities of Wild Mushroom Methanol Extracts. *The Korean Journal of Mycology.* 2007;35(2):128–132. DOI: 10.4489/KJM.2007.35.2.128.
8. Lee S.-Y., Kim J.-S., Kim J.-E., Sapkota K., Shen M.-H., Kim S., Chun H.-S., Yoo J.-C., Choi H.-S., Kim M.-K., Kim S.-J. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from cultured mycelia of *Armillaria mellea*. *Protein Expression and Purification.* 2005;43(1):10–7. DOI: 10.1016/j.pep.2005.05.004.
9. Choi J.-H., Kim S. Fibrinolytic and Thrombolytic Effects of an Enzyme Purified from the Fruiting Bodies of *Boletus pseudocalopus* (Agaricomycetes) from Korea. *International Journal of Medicinal Mushrooms.* 2021;23(4):47–57. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.2021037957.
10. Islam M.R., Uddin Pk M.M. *In vitro* Doses and Incubations Dependent Thrombolytic Potential Study of Edible Mushrooms *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum* and *Lentinula edodes* Available in Bangladesh. *Journal of Pharmaceutical Research International.* 2015;7(1): 44–51. DOI: 10.9734/BJPR/2015/18227.
11. Denisova N.P. History of the Study of Thrombolytic and Fibrinolytic Enzymes of Higher Basidiomycetes Mushrooms at the V.L. Komarov Botanical Institute in Saint Petersburg, Russia. *International Journal of Medicinal Mushrooms.* 2010;12(3):317–325. DOI: 10.1615/IntJMedMushr.v12.i3.110.
12. Sharkova T.S., Kurakov A.V., Osmolovskiy A.A., Matveeva E.O., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Screening of producers of proteinases with fibrinolytic and collagenolytic activities among micromycetes. *Microbiology.* 2015;84(3):316–322. (In Russ.) DOI: 10.7868/S0026365615030180.
13. Popova E.A., Osmolovskiy A.A., Krejer V.G., Kotova I.B., Egorov N.S. Production by aspergillus ustus strain of proteinases highly active against fibrillar proteins. *Mycology and Phytopathology.* 2019;53(4):229–235. (In Russ.)
14. Osmolovskiy A.A., Orekhova A.V., Conti E., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Production and stability of a complex preparation of proteinases by *Aspergillus ochraceus* L-1 with fibrinolytic and anticoagulant activity. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16. Biologiya.* 2020;75(3):158–163. (In Russ.)
15. Shamtshyan M.M., Petrishchev N.N., Denisova N.P., Chefu S.G., Vasina E.Yu, Tozik E.V., Kolesnikov B.A. Enzyme preparation of thrombolytic and fibrinolytic action from basidial fungus of the genus *Coprinus*. Patent RU2435848C1. 2010. Available at: <https://patent.ru/patent/RU2435848C1>. Accessed: 01.12.2023. (In Russ.)
16. Wu A.H.B., editor. Tietz's Clinical Guide to Laboratory Tests. Москва: Labora; 2013. 1380 p. (In Russ.)
17. Barkagan Z.S., Momot A.P. Diagnosis and controlled therapy of hemostasis disorder. 2008. Moscow: N'yudiamed; 2008. 292 p. (In Russ.)
18. Gong P., Wang S., Liu M., Chen F., Yang W., Chang X., Liu N., Zhao Y., Jing Wang, Chen X., Extraction methods, chemical characterizations and biological activities of mushroom polysaccharides: A mini-review. *Carbohydrate Research.* 2020;494. DOI: 10.1016/j.carres.2020.1080.
19. Villares A., Mateo-Vivaracho L., Guillamón E. Structural Features and Healthy Properties of Polysaccharides Occurring in Mushrooms. *Agriculture.* 2012;2(4):452–471. DOI: 10.3390/agriculture2040452.
20. Kuznetsova T.A. Anticoagulant and antithrombotic activity of seaweed sulfated polysaccharides. *Tromboz, Gemostaz i Reologiy.* 2020;(2):53–59. (In Russ.)
21. Yoon S.-J., Yu M.-A., Pyun Y.-R., Hwang J.-K., Djong-Chi Ch.-D., Juneja L.R., Paulo A.S., Mourão P.A.S. The nontoxic mushroom *Auricularia auricula* contains a polysaccharide with anticoagulant activity mediated by antithrombin. *Thrombosis Research.* 2003;112(3):151–158. DOI: 10.1016/j.thromres.2003.10.022.
22. Huang X., Nie S. The structure of mushroom polysaccharides and their beneficial role in health. *Food Funct.* 2015;6(10):3205–3217. DOI: 10.1039/c5fo00678c.
23. Lin H., Xu L., Yu S., Hong W., Huang M., Xu P. Therapeutics targeting the fibrinolytic system. *Experimental & Molecular Medicine.* 2020;52:367–379. DOI: 10.1038/s12276-020-0397-x.
24. Collen D., de Maeyer L. Molecular biology of human plasminogen. I. Physicochemical properties and microheterogeneity. *Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica.* 1975;34(2):396–402.
25. Brandt J.T. Plasminogen and tissue-type plasminogen activator deficiency as risk factors for thromboembolic disease. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine.* 2002;126(11):1376–1381 DOI: 10.5858/2002-126-1376-PATTPA.
26. Mandle R.J., Kaplan A.P. Hageman-factor-dependent fibrinolysis: generation of fibrinolytic activity by the interaction of human activated factor XI and plasminogen. *Blood.* 1979;54(4):850–862.
27. Mast A.E., Enghild J.J., Pizzo S.V., Salvesen G. Analysis of the plasma elimination kinetics and conformational stabilities of native, proteinase-complexed and reactive site cleaved serpins: comparison of .alpha.1-proteinase inhibitor, .alpha.1-antichymotrypsin, antithrombin III, .alpha.2-antiplasmin, angiotensinogen, and ovalbumin. *Biochemistry.* 1991;30(6):1723–1730. DOI: 10.1021/bi00220a039.
28. 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):351–356. DOI: 10.1161/01.cir.95.2.351.
29. Collen D. On the regulation and control of fibrinolysis. Edward Kowalski Memorial Lecture. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 1980;43(2):77–89.