

УДК 582.282.123.4:577.152.34

МИКРОМИЦЕТЫ *Aspergillus ochraceus* – ПРОДУЦЕНТЫ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕИНАЗ – АКТИВАТОРОВ ПРОТЕИНА С ПЛАЗМЫ КРОВИ

© 2012 г. А. А. Осмоловский*, В. Г. Крейер*, А. В. Кураков*, Н. А. Баранова*, Н. С. Егоров**

* Биологический факультет и **Международный биотехнологический центр

Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991; e-mail: aosmol@mail.ru

Поступила в редакцию 28.12.2011 г.

Проведен скрининг природных изолятов микромицетов *Aspergillus ochraceus* из почв и растительных остатков разных регионов. Выделенные штаммы характеризовались сходными культурально-морфологическими свойствами и идентичной нуклеотидной последовательностью по участку ITS1-5, 8S-ITS2 рДНК. Установлена способность внеклеточных протеиназ микромицетов *A. ochraceus* активировать протеин С плазмы крови. Выявлены различия в накоплении протеиназ с активаторной к протеину С активностью и протеиназ с тромбиноподобной и плазминоподобной активностью в динамике роста продуцентов.

Тромбоэмболические осложнения становятся наиболее частыми и серьезными заболеваниями сердечно-сосудистой системы. Факторы риска развития таких осложнений могут быть не только приобретенными, но и наследственными, в результате которых тромбоэмболии переходят в тромбофилии. К ним относятся недостаточность содержания в плазме крови антитромбина, протеина С, протеина S, повышенное содержание фактора VIII и появление в кровотоке фактора V Лейдена – мутантной формы фактора V, резистентного к активированному протеину С [1]. Протеин С является витамин К-зависимым белком, циркулирующим в крови в виде профермента – предшественника ключевой протеиназы системы гемостаза – активированного протеина С. Активация профермента в фермент осуществляется на поверхности эндотелия комплексом тромбин-тромбомодулин. Важнейшие функции активированного протеина С в организме связаны с его антикоагулянтными и цитопротекторными свойствами: он инактивирует факторы свертывания крови (Va и VIIa), предотвращая чрезмерное тромбообразование, и участвует в ингибировании освобождения цитокинов (прежде всего факторов некроза опухоли), ингибировании апоптоза, блокировании воспаления и изменении экспрессии генов в эндотелиальных клетках, выступая в качестве сигнальной молекулы [2–4]. Недостаточность содержания в крови самого профермента (протеин С) может привести как к рискам возникновения тромбоэмболических осложнений, так и в ряде случаев к летальным исходам. Поэтому актуальными представляются средства, активирующие протеин С, а также позволяющие качественно и своевременно диагностировать его содержание в крови человека. К

настоящему времени известны активаторы протеина С, содержащиеся в яде некоторых видов змей [5]. Протеолитические ферменты – активаторы протеина С, выделенные из яда южно-американского щитомордника *Agkistrodon contortrix contortrix*, находят широкое применение в составе диагностикумов для определения протеина С в плазме крови человека [5, 6].

Характерной особенностью микромицетов является способность продуцировать широкий спектр внеклеточных ферментов, в том числе и протеиназ [7]. Поэтому более доступными и перспективными могут оказаться протеиназы грибного происхождения, осуществляющие активацию протеина С или других факторов свертывания крови.

Особенно интенсивно в последнее время изучаются протеолитические ферменты мицелиальных грибов, оказывающие воздействие на белки системы гемостаза [8–10]. Микромицеты вида *A. ochraceus* являются известными продуцентами протеиназ, проявляющих фибринолитические и прокоагулянтные свойства [11].

Впервые антикоагулянтная активность внеклеточных протеиназ микромицетов была показана сотрудниками Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова [12]. Одним из наиболее активных продуцентов подобных протеиназ оказалась культура *A. ochraceus*. Ферменты *A. ochraceus*, добавленные к плазме крови, удлиняли активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) по типу активаторов протеина С аналогично тромбин-тромбомодулиновому комплексу и активаторам из яда щитомордника [12, 13]. Было высказано предположение, что данная активность может быть связана с активацией протеина С. В связи с этим зна-

чительный интерес представляет изучение внеклеточных протеиназ *A. ochraceus* как возможных активаторов протеина С плазмы крови человека.

Цель работы — определение способности микроскопических грибов *A. ochraceus* образовывать протеиназы — активаторы протеина С плазмы крови.

МЕТОДИКА

Выделение и идентификация микромицетов *Aspergillus ochraceus*. Выделение проводили методом посева почвенного мелкозема и фрагментов растительных остатков на чашки Петри с агаровой средой с целлюлозой (среда Гетчинсона) и сусло-агаром с последующей инкубацией при 25°C [14]. Использовали образцы верхних горизонтов пустынных песчаных почв, сероземов, солончаков, карбонатных черноземов, дерново-аллювиальных почв, красно-коричневых почв и растительных субстратов, отобранных соответственно в степной (Воронежская обл., Краснодарский край), пустынной и полупустынной зонах (Туркмения) и регионах с субтропическим и тропическим климатом (Крым, Греция, Мексика). Чашки с нанесенным мелкоземом предварительно выдерживали в течение нескольких часов при повышенной температуре 52–54°C, а затем инкубировали при 20°C. В качестве ингибитора роста бактерий использовали сульфат стрептомицина. Поддержание выделенных штаммов осуществляли на среде Чапека–Докса и сусло-агаре.

Идентификацию штаммов проводили по культурально-морфологическим признакам с помощью определителя [15] и молекулярно-генетическим признакам на основе ПЦР-анализа с последующим секвенсом амплификонов и анализом секвенсов.

Выделение ДНК из мицелия проводили по стандартной методике [16].

Для проведения полимеразной цепной реакции использовали рекомендуемые для микромицетов праймеры ITS-1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') и ITS-4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT G-3') [17]. Амплификацию для каждого образца ДНК проводили с 1 мкл выделенной тотальной ДНК, разведенной в 100 раз, в 30 мкл реакционной смеси, содержащей 2 mM MgCl₂, 1.5 E Taq ДНК-полимеразы (“Синтол”, Россия), 0.5 мкМ каждого праймера и 400 мкМ каждого дНТФ в соответствии со следующим протоколом: первичная денатурация в течение 5 мин при 95°C с последующими 40 циклами денатурации при 95°C 30 с, отжигом при 50°C 30 с и элонгацией при 72°C 1 мин с заключительным этапом элонгации 3 мин при 72°C. Полученные ПЦР-продукты были очищены с использованием набора реактивов Wizard® DNA Clean-Up System (“Promega”,

США). Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3730 Applied Biosystems.

Анализ полученных последовательностей осуществляли с использованием программы BioEdit. Поиск и ранжирование гомологичных нуклеотидных последовательностей в международной базе данных GenBank проводили в программе BLAST.

Культивирование микромицетов. Микромицеты выращивали в условиях глубинного культивирования в качалочных колбах объемом 750 мл со 100 мл питательной среды на орбитальных качалках (200 об/мин) при 28°C. В качестве посевного материала использовали 7-суточные культуры микромицетов, выращенные на скошенном сусло-агаре. Культивирование проводили в две стадии, сначала на среде с суслон, глюкозой и пептоном [13], после чего, по истечении 2 сут культивирования часть биомассы переносили в ферментационную среду следующего состава (%): глюкоза — 3.5, крахмал — 1.0, соевая мука — 0.2, гидролизат рыбной муки — 0.5, пептон — 0.5, NaCl — 0.2, K₂HPO₄ — 0.05, MgSO₄ — 0.05.

Определение протеолитической активности. Активность протеиназ определяли в культуральной жидкости, предварительно отделив биомассу фильтрованием.

Общую протеолитическую активность культур определяли модифицированным методом Ансона [18]. Активность выражали в мкМ тирозина, образовавшегося в течение 1 мин в 1 мл культуральной жидкости.

Активаторную к протеину С активность определяли по расщеплению хромогенного пептидного субстрата пироглутамил-L-пролил-L-аргинил-п-нитроанилида (pGlu-Pro-Arg-pNA) [19] с помощью метода, модифицированного В.Г. Крейер. Для проведения анализа к 200 мкл фильтрата культуральной жидкости добавляли 50 мкл разведенной в 2 раза человеческой плазмы крови, используемой в качестве источника протеина С. Полученную смесь инкубировали на водяной бане в течение 5 мин при 37°C, после добавляли 100 мкл 0.05%-ного раствора хромогенного субстрата в 0.05 M Трис-HCl-буфере, pH 8.2 и продолжали инкубацию еще в течение 5 мин при тех же условиях. Реакцию останавливали добавлением 200 мкл 50%-ной уксусной кислоты. Измерение оптической плотности проводили при 405 нм. Для расчета активаторной активности строили калибровочную кривую по п-нитроанилину. Линейность поглощения наблюдали в интервале 10 × 10⁻³–150 × 10⁻³ мкМ pNA/мл.

Тромбиноподобную и плазминоподобную активность определяли с хромогенными субстрата-

Таблица 1. Определение активаторной к протеину С активности культуральной жидкости *A. ochraceus* L-1 с хромогенным субстратом pGlu-Pro-Arg-pNA

№ пробы	Состав инкубационной смеси	Активаторная к протеину С активность, Е/мл $\times 10^{-3}$
1	Культуральная жидкость <i>A. ochraceus</i> L-1 + плазма (протеин С) + субстрат	77.0
2	Культуральная жидкость <i>A. ochraceus</i> + субстрат	0.0
3	Плазма + субстрат	0.8

ми тозил-L-глицил-L-пролил-L-аргинил-п-нитроанилидом (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA) и D-валил-L-лейцил-L-лизил-п-нитроанилидом (DVal-Leu-Lys-pNA) соответственно добавляя к 100 мкл культуральной жидкости 150 мкл 0.05 М Трис-HCl-буфера, pH 8.2, и 100 мкл 0.05%-ного раствора соответствующего субстрата. Смесь инкубировали в течение 5 мин при 37°C, после чего реакцию останавливали добавлением 200 мкл 50%-ной уксусной кислоты. Измерение оптической плотности проводили при 405 нм на спектрофотометре Hitachi 200-20 (Япония).

За единицу активности (Е) во всех случаях принимали количество мкМ отщепившегося п-нитроанилина в 1 мл культуральной жидкости за 1 мин.

Биомассу определяли весовым методом, высушивая ее при 86°C до постоянной массы.

Эксперименты выполнены в 3 повторностях, полученные результаты приведены, как средние величины из трех опытов. Ошибка средних значений не превышала 5–7%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

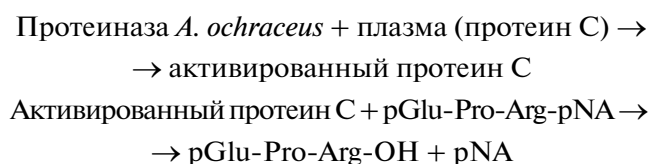
Аспергиллы и, в частности *A. ochraceus*, широко представлены в микобиоте почв южных регионов, что и обусловило их выбор для поиска данных микроорганизмов [20, 21]. В результате проведенных посевов были выделены в чистую культуру 10 изолятов, которые имели типичные для *A. ochraceus* культурально-морфологические признаки [15]. Незначительные отличия между штаммами были отмечены в скорости роста, интенсивности спороношения и пигментации. Изоляты хорошо росли на стандартных средах: суло-агар, среда Чапека–Докса, глюкозо-пептонная среда при 25°C. Спороношение начиналось на 4, 5 сут, обильно спороносящие колонии формировались к 7–10 сут. Часть культур выделяло экссудат янтарного цвета.

Микромицеты вида *A. ochraceus* Wilhelm относятся к митоспоровым грибам – анаморфам аскомицетного аффинитета: рода *Aspergillus*, семейства Trichosomaceae, порядка Eurotiales, класса Eurotiomycetes, отдела Ascomycota и являются космополитными и термотолерантными организмами, способными расти в широком интервале

температур (8–55°C) с оптимальным ростом при 25–30°C.

Определение нуклеотидной последовательности локусов ITS1-5,8S-ITS2 рДНК всех штаммов *A. ochraceus* показало их полную идентичность. Сравнительный анализ полученных последовательностей участков ITS изученных штаммов с последовательностями ITS-участков этого вида, представленными в GenBank (JN246072.1, EU273559.1, AY373856.1), выявил их 100% сходство, что подтверждает проведенную нами идентификацию штаммов как *A. ochraceus* и данные литературы о гомогенности этого вида [22].

Результаты определения активаторной к протеину С активности культуральной жидкости на примере микромицета *A. ochraceus* L-1 с хромогенным пептидным субстратом pGlu-Pro-Arg-pNA в сравнении с контролями (пробы № 2 и 3 соответственно) приведены в табл. 1. Из таблицы видно, что ни культуральная жидкость, ни плазма по отдельности не расщепляли хромогенный субстрат, и только после предварительной инкубации культуральной жидкости *A. ochraceus* L-1 и плазмы (протеин С), действительно, происходит активация протеина С, и образующийся активированный протеин С расщепляет хромогенный субстрат по аргинину в соответствии со следующей схемой:



Таким образом протеиназы *A. ochraceus* отщепляют п-нитроанилин (pNA) от субстрата, аналогично активаторам яда змеи щитомордника [6, 23, 24].

Способность к образованию внеклеточных протеиназ – активаторов протеина С установлена у всех изученных изолятов *A. ochraceus* вне зависимости от экотопов и регионов, из которых они были выделены. Причем активаторная к протеину С активность обнаруживалась в культуральной жидкости *A. ochraceus* уже на 1 сут культивирования (табл. 2).

Образование протеиназ, активирующих протеин С плазмы крови, было изучено в динамике. Параллельно проводили определение тромбино-

Таблица 2. Активаторная к протеину С активность штаммов *A. ochraceus*, выделенных из разных экотопов

Штамм <i>A. ochraceus</i> №	Источник и место выделения	Активаторная к протеину С активность, Е/мл × 10 ⁻³ *
121	Солончак (Крым, Украина)	59.0
154	Растительные остатки подстилки (Греция)	66.3
247	Чернозем на карбонатных породах (Воронежская обл., Россия)	65.0
513N	Пустынная почва (Туркмения)	63.5
L-1	Погребенная почва (раскопки г. Фанагории, Краснодарский край, Россия)	63.9
L-2	Растительные остатки подстилки (Мексика)	34.0
МА-1	Серая лесная почва (Московская обл., Россия)	58.1
МА-2	Растительные остатки (Московская обл., Россия)	58.8
X-1	Растительные остатки (Греция)	59.2
X-2	Дерново-аллювиальная почва (Мексика)	55.8

* На 1 сут культивирования микромицетов.

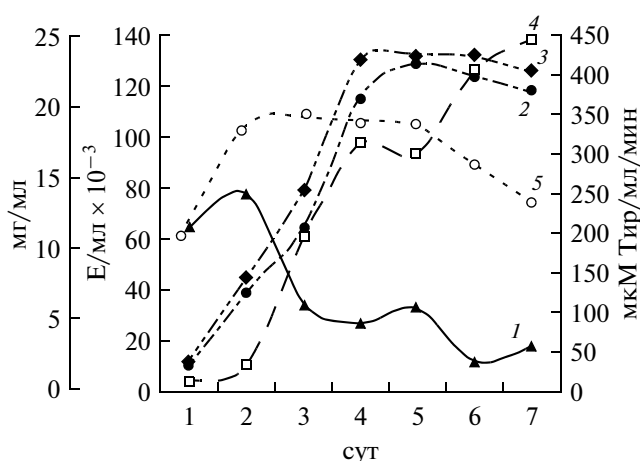
подобной и плазминоподобной активностей культуральной жидкости со специфическими хромогенными субстратами, общую протеолитическую активность с казеином и биомассу. На рисунке представлены данные по накоплению в культуральной жидкости внеклеточных протеиназ для *A. ochraceus* L-1. Сходную динамику показателей роста и активностей протеиназ наблюдали у всех остальных изученных штаммов.

Максимальные значения активаторной к протеину С активности обнаруживали на 2 сут культивирования в логарифмической фазе роста, после чего активность снижалась с небольшим пиком активности на 5 сут в стационарной фазе. Максимумы образования протеиназ с тромбиноподобной и плазминоподобной активностями

приходились на 3, 4 сут культивирования (стационарная фаза роста), имели близкие значения и сходную положительную корреляцию и не совпадали с пиком активности протеиназ-активаторов протеина С. Полученные данные свидетельствуют, что протеиназы – активаторы протеина С и протеиназы с плазмино- и тромбиноподобной активностью являются разными ферментами. В то же время трудно говорить о принадлежности тромбиноподобной и плазминоподобной активностей разным ферментам, т.к. известно, что плазмин (плазминоподобные ферменты) способен расщеплять субстраты тромбина [25].

Динамика общей протеолитической активности культуральной жидкости была сходной с тромбино- и плазминоподобными активностями и не совпадала с максимальными значениями активаторной к протеину С активности (рисунок).

Интересно отметить, что протеиназы культуральной жидкости изученных микромицетов гидролизуют субстрат тромбина Tos-Gly-Pro-Arg-pNA (активность варьировала в пределах 110–144 Е/мл × 10⁻³ у разных штаммов) и не способны были расщеплять субстрат pGlu-Pro-Arg-pNA, отличающийся на 1 аминокислоту (табл. 1, № 2). Эти данные свидетельствуют, что протеолитические ферменты *A. ochraceus* обладают разной субстратной специфичностью по отношению к хромогенным пептидным субстратам. В случае с активаторами протеина С из яда щитомордника наличие в хромогенном субстрате-трипептиде перед аргинином пролина приводит к его гидролизу активированным протеином С, если же пролин замещен на другую аминокислоту, например фенилаланин, субстрат не гидролизует. Введение в дипептид пролил-аргинил-pNA дополнительной аминокислоты незначительно влияло на



Динамика накопления (сут) протеолитических ферментов микромицетом *A. ochraceus* L-1. 1 – активаторная к протеину С активность, 2 – тромбиноподобная активность, 3 – плазминоподобная активность, 4 – общая протеолитическая активность, 5 – биомасса.

Таблица 3. Плазминоподобная, тромбиноподобная и общая протеолитическая активность внеклеточных протеиназ штаммов *A. ochraceus* в максимуме активаторной к протеину С активности

Штамм <i>A. ochraceus</i> , №	Активность активаторов протеина С, Е/мл × 10 ⁻³	Плазминоподобная, Е/мл × 10 ⁻³	Тромбиноподобная, Е/мл × 10 ⁻³	Общая протеолитическая активность, мкМ Тир/мл/мин
121	71.9	125.5	95.2	149.8
154	69.0	81.4	62.3	110.5
247	77.9	99.8	84.2	67.2
513N	76.1	81.4	82.7	40.2
L-1	77.5	46.3	47.5	54.3
L-2	67.4	65.3	84.0	167.8
МА-1	71.0	40.4	32.3	37.7
МА-2	64.4	44.9	39.3	95.1
X-1	72.5	80.6	72.1	58.8
X-2	69.6	74.5	63.5	87.9

расщепление субстрата активированным протеином С [6].

В табл. 3 приведены значения протеолитической активности разных штаммов *A. ochraceus* в максимуме активаторной к протеину С активности. Видно, что максимальные значения активаторной к протеину С активности микромицетов близки и их варьирование не превышало 15%. Активности с субстратами плазмينا и тромбина, а также общая протеолитическая активность в максимальных значениях активаторной активности различаются. Варьирование по тромбиноподобной, плазминоподобной и общей протеолитической активности составило 67, 66 и 77% соответственно. Значительный интерес представляют продуценты протеиназ–активаторов протеина С, проявляющие более низкие величины значений сопутствующей протеолитической активности. По этому критерию были отобраны штаммы *A. ochraceus* 247, *A. ochraceus* 513N, *A. ochraceus* L-1 и *A. ochraceus* X-1, которые депонированы в ВКМ под соответствующими номерами ВКМ F-4106D, ВКМ F-4107D, ВКМ F-4104D, ВКМ F-4105D.

Полученные результаты показывают, что способность образовывать протеиназы – активаторы протеина С плазмы крови изученных штаммов *A. ochraceus* – изолятов различных экотопов географически отдаленных регионов может являться характерным признаком аспергиллов этого вида. Кроме протеиназ–активаторов протеина С, изоляты образуют протеиназы с тромбиноподобной и плазминоподобной активностью. Небольшой срок культивирования микромицетов и образование протеиназ с активаторной к протеину С активностью на доступных средах делает возможным практическое использование микромицетов *A. ochraceus* в качестве альтернативных яду щитовидки источников активаторов протеина С.

Авторы глубоко благодарны сотрудникам кафедры микробиологии МГУ А.Л. Брюханову, В.А. Корнеевой и И.А. Бубнову за консультации и помощь в проведении молекулярно-генетических исследований.

Секвенирование ДНК проводили в межинститутском центре коллективного пользования “ГЕНОМ” ИМБ РАН (<http://www.genome-centre.narod.ru/>), организованном при поддержке РФФИ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rosendaal F.R., Reitsma P.H.* // J. Thromb. Haemost. 2009. V. 7. № S1. P. 301–304.
2. *Струкова С.М.* // Биохимия. 2004. Т. 69. № 10. С. 1314–1331.
3. *Dahlbäck B., Villoutreix B.O.* // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2005. V. 25. № 7. P. 1311–1320.
4. *Mosnier L.O., Zlokovich B.V., Griffin J.H.* // Blood. 2007. V. 109. № 3. P. 3161–3172.
5. *Gempeler-Messina P.M., Müller C.* // Toxin Rev. 2006. V. 25. № 4. P. 335–349.
6. *Stoker K., Fisher H., Meier J., Brogli M., Svendsen L.* // Toxicol. 1987. V. 25. № 3. P. 239–252.
7. *Павлюкова Е.Б., Белозерский М.А., Дунаевский Я.Е.* // Биохимия. 1998. Т. 63. № 8. С. 1059–1089.
8. *Подорольская Л.В., Серебрякова Т.Н., Шаркова Т.С., Неумывакин Л.В., Андреев Г.В.* // Вопр. биол. мед. и фарм. химии. 2007. № 1. С. 10–13.
9. *Wu B., Wu L., Chen D., Yang Z., Luo M.* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 36. № 3. P. 451–459.
10. *Gopinath S.M., Suneetha T.B., Ashwini Patil G.M.* // J. Research Biol. 2011. V. 1. № 4. P. 242–245.
11. *Клечковская В.В., Егоров Н.С.* // Микробиология. 1983. Т. 52. № 3. С. 396–403.
12. *Ландау Н.С., Кураков А.В., Гуликова О.М., Батомункеева Б.П., Струкова С.М., Егоров Н.С.* // Микробиология. 1998. Т. 67. № 2. С. 215–220.
13. *Батомункеева Б.П., Егоров Н.С.* // Микробиология. 2001. Т. 70. №5. С. 602–606.

14. Кураков А.В. Методы выделения и характеристики комплексов микроскопических грибов наземных экосистем. М.: МАКС Пресс, 2001. 89 с.
15. Klich M.A., Pitt J.I. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. North Ryde: CSIRO Division of food Processing. 1992. 116 p.
16. Rodrigues P., Soares C., Kozakiewich Z., Paterson R.R.M., Lima N., Venancio A. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in App. Microbiol. V. 2 / Ed. A. Méndez-Vilas. Badajoz: Formatex, 2007. P. 527–534.
17. Henry T., Iwen P., Hinrichs H. // J. Clinical Microb. 2000. V. 38. № 4. P. 1510–1515.
18. Егоров Н.С., Ландау Н.С., Буюк Л.И., Крейер В.Г. // Микробиология. 1991. Т. 60. № 4. С. 637–643.
19. Sakata T., Hatsuyama H., Kitamura T., Uchida K., Katsuyama Y., Matsuyama T. // Rinsho Byori. 1990. V. 38. № 8. P. 937–941.
20. Кураков А.В., Болобова А.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 1999. Т. 35. № 3. С. 332–341.
21. Klich M.A. // Mycologia. 2002. V. 94. № 1. P. 21–27.
22. Gil-Serna J., Gonzalez-Salgado A., Gonzalez-Jaen M.T., Vazquez C., Patino B. // Int. J. Food Micr. 2009. № 131. P. 162–167.
23. Exner T., Vaasjoki R. // Thromb. Haemost. 1988. V. 59. P. 40–44.
24. Orthner C.L., Brattacharia P., Strickland D.K. // Biochemistry. 1988. V. 27. № 7. P. 2558–2564.
25. Suomela H. // Haemostasis. 1978. V. 7. № 2–3. P. 95–96.

***Aspergillus ochraceus* Myxomycetes Produce Extracellular Proteinases—Protein C Activators of Blood Plasma**

A. A. Osmolovskii^a, V. G. Kreier^a, A. V. Kurakov^a, N. A. Baranova^a, and N. S. Egorov^b

^a *Biological Faculty, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

^b *International Biotechnological Center, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

e-mail: aosmol@mail.ru

Received December 28, 2011

Abstract—Natural isolates of *Aspergillus ochraceus* myxomycetes from soil and plant remains from various regions have been screened. The isolated strains were characterized by similar cultural and morphological features and an identical nucleotide sequence in the ITS1–5,8S–ITS2 region of rDNA. The ability of the extracellular proteinases of *A. ochraceus* myxomycetes to activate protein C of blood plasma has been established. Differences are revealed in the accumulation of proteinases activating protein C and proteinases with thrombin- and plasmin-like activities in the growth dynamics of producers.