

**Государственное бюджетное общеобразовательное учреждение города
Москвы «Курчатовская школа»**

**ПОЛУЧЕНИЕ КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА
ОСНОВЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕАЗ *ASPERGILLUS USTUS***

Автор работы:

Бозиева Джамиля

ученица 9 класса Т

ГБОУ «Курчатовская школа»

Руководитель работы:

Лавренова Виктория Николаевна

кандидат биологических наук,

младший научный сотрудник кафедры микробиологии

Биологического факультета МГУ,

учитель биологии

ГБОУ «Курчатовская школа»

г. Москва, 2026

СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ.....	2
ВВЕДЕНИЕ.....	3
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	4
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	5
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	10
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	15
ВЫВОДЫ.....	16
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	17

ВВЕДЕНИЕ

Одним из перспективных направлений современной медицины является противорубцовая терапия, основанная на реорганизации волокон коллагена внеклеточного матрикса в составе шрамов и ран [1]. Особо опасными считаются келоидные шрамы, отличающиеся повышенным содержанием и низкой организованностью фибрилл коллагена [2]. Современная медицина предлагает множество методов лечения рубцов, например хирургическое иссечение или лазерное удаление, однако эти процедуры могут вызывать ряд побочных эффектов, таких как отеки и гематомы. Альтернативой инвазивной противорубцовой терапии являются различные мази и гели на основе ферментов, разрушающих коллаген в составе рубцового новообразования.

Ранее на базе лаборатории физиологии и биохимии микроорганизмов МГУ было проведено исследование секрета мицелиального гриба *Aspergillus ustus*, в ходе чего была показана коллагенолитическая активность культуральной жидкости этого гриба [3].

Настоящая работа предлагает новый подход к противорубцовой терапии, основанный на использовании коллагенолитических ферментов, полученных из культуральной жидкости гриба *A. ustus*. Ранее было показано, что внеклеточные пептидазы этого гриба обладает коллагенолитической активностью, что делает его перспективным источником для разработки новых противорубцовых препаратов [3].

Разработка методов культивирования *A. ustus* для получения высокоактивных коллагенолитических ферментов, а также последующее изучение физико-химических и энзиматических свойств обнаруженных внеклеточных пептидаз, открывает новые возможности для создания неинвазивных

противорубцовых препаратов. Эти препараты могут быть использованы в качестве альтернативы традиционным методам лечения, снижая риск побочных эффектов и улучшая качество жизни пациентов с патологическими рубцами. Кроме того, разработка очищенного препарата коллагеназы на основе ферментов *A. ustus* может стать значительным шагом в области дерматологии и пластической хирургии, позволяя более эффективно лечить келоидные и гипертрофические рубцы.

Целью работы являлось получение препарата рекомбинантной коллагеназы *A. ustus*.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

- 1) идентифицировать активно транскрибируемые мРНК внеклеточных пептидаз *A. ustus* по транскриптомным данным;
- 2) оценить возможность связывания выявленных внеклеточных протеаз с коллагеном, предсказать пептидазу, наиболее эффективно гидролизующую коллаген;
- 3) клонировать ген выбранной коллагенолитической пептидазы *Aspergillus ustus* в гетерологическую систему экспрессии;
- 4) доказать коллагенолитическую активность рекомбинантного белка.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

На сегодняшний день коллагенолитические ферменты грибного происхождения преимущественно исследуются в контексте деградации кожного коллагена для косметических или биотехнологических целей, [4, 5, 6, 7, 8]. но не представлены как действующие вещества для целенаправленного ферментативного ремоделирования патологических рубцов (в отличие от бактериальных коллагеназ, например *Clostridium histolyticum*) [9].

Кроме того, в литературе не описаны конкретные молекулярные механизмы действия грибных коллагенолитических пептидаз на фиброзно-изменённую

дермальную ткань. У существующих аналогов (животного или бактериального происхождения), таких как коллагеназа I типа (матриксная металлопептидаза-1), коллагеназа II типа (коллагеназа нейтрофилов) и коллагеназа *Clostridium histolyticum*, отсутствует селективность к зрелому коллагену I типа, составляющему основу гипертрофических и келоидных рубцов [9, 10].

В настоящее время в клинической практике отсутствуют препараты на основе коллагеназ грибного происхождения, зарегистрированные для наружного применения с целью ферментной коррекции патологического рубцевания. Таким образом, разрабатываемый препарат является новым классом противорубцовых средств и может предложить ряд преимуществ: местное действие, селективность к патологически накопленному коллагену, низкую иммуногенность и отсутствие системных побочных эффектов, характерных для инъекционных форм или инвазивных методов противорубцовой терапии, к примеру лазерное удаление или иссечение.

Согласно проведённому ранее исследованию [11] по выделению и изучению биохимических свойств коллагенолитической пептидазы *Aspergillus ustus*, целевой фермент проявлял высокую активность в отношении коллагена, сопоставимую с активностью коллагеназы *Clostridium histolyticum*, используемой при лечении фиброзных заболеваний, таких как контрактура Дюпюитрена и болезнь Пейрони [9].

Неполными аналогами разрабатываемого препарата на основе рекомбинантной коллагенолитической пептидазы *Aspergillus ustus* являются различные ферментные средства, применяемые для коррекции рубцово-фиброзных изменений кожи: коллагенолитический крем Ферменкол®, содержащий смесь коллагеназ, выделенных из пищеварительных органов морских беспозвоночных; наружные формы препаратов, содержащие гиалуронидазу и другие ферменты с деполимеризирующей активностью (Лонгидаза®, Лидаза®), используемые для рассасывания инфильтратов и коррекции рубцов; силиконовый гель

Kelo-cote®), применяемый для образования защитной пленки в зоне рубца, обеспечивающей ускорение процесса заживления келоидного новообразования. Вышеперечисленные средства имеют ряд ограничений. Ферменкол® и его аналоги получают преимущественно из природного сырья, что ограничивает стандартизацию состава препарата и приводит к колебаниям в активности между сериями. Препараты гиалуронидазы действуют не на коллаген, а на другие компоненты межклеточного матрикса, вследствие чего их эффективность при лечении фиброзов и плотных рубцов значительно ниже. Силиконовый гель Kelo-cote® обеспечивает преимущественно барьерное действие, не влияя на метаболизм коллагена.

Сравнительный анализ стоимости различных противорубцовых препаратов показал, что цена Ферменкола® колеблется в диапазоне 1500 до 3000 рублей за упаковку крема (10 - 30г), что делает его относительно доступным ферментным препаратом. Силиконовый гель Kelo-cote® стоит около 2200–3500 рублей за тюбик (6 - 15г), предлагая относительно бюджетное решение, однако без ферментативного воздействия. Зарубежный инъекционный препарат коллагеназы *Clostridium histolyticum* Xiaflex®, применяемый для лечения контрактуры Дюпюитрена и болезни Пейрони, стоит порядка 7000 - 13000 долларов США за курс, что существенно ограничивает его доступность. По нашим оценкам крем на основе рекомбинантной коллагенолитической пептидазы *Aspergillus ustus* предполагает стоимость примерно 1500–3500 рублей за 1 мг белкового препарата.

Разрабатываемый препарат представляет собой инновационное и экономически эффективное решение для лечения рубцово-фиброзных изменений кожи, объединяя преимущества рекомбинантной биотехнологии и целенаправленного коллагенолитического действия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Биоинформатический анализ

1.1. Определение принадлежности пептидаз к суперсемействам по классификации MEROPS

Полученные по результатам предыдущих исследований транскриптомные данные были аннотированы с помощью модуля AUGUSTUS в Python.

Найденные последовательности пептидаз затем исследовались на веб-сервере HMMER для выявления принадлежности к определенным семьям пептидаз по классификации MEROPS.

1.2. Докинг на нативную структуру коллагена

Пространственные модели пептидаз строились с помощью веб-сервера AlfaFold на основе аминокислотных последовательностей соответствующих ферментов. Далее с помощью веб-сервера LZerD проводился докинг на пространственную модель участка тройной спирали молекулы коллагена человека, полученную из библиотеки Protein Data Bank (id: pdb_00007cwk). Для анализа аффинности ферментов к субстрату были получены и проанализированы показатели изменения свободной энергии Гиббса связывания моделей комплексов соответствующих пептидаз и коллагена с помощью веб-сервера PRODIGY.

2. Клонирование в систему экспрессии *E. coli*

2.1. Материалы

2.1.1. Плазмидный вектор

Сборка плазмиды для клонирования целевого гена проводилась с использованием вектора pET-32a (Merck KGaA, Германия).

2.1.2. Олигонуклеотиды

Олигонуклеотиды были синтезированы в ЗАО «Евроген» на синтезаторах Applied Biosystems ABI 3900 и dr.Oligo 192. Последовательности олигонуклеотидов, используемых в работе, приведены в Таблице 1.

Таблица 1. Последовательности используемых нуклеотидов и их применение

Название	Последовательность 5'-3'	Применение
PrB-Gibso n-F	TGGTGGTGGTGCTCGAAAGCAACAACCTG CATCCTGGATCT	Сборка плазмиды
PrB-Gibso n-R	CGACGGCAACGGGCGACATGGCCTTGTC GTCG	Сборка плазмиды
pet32-F	CGGTGGTGGCTCTG	Проверочная ПЦР
T7 Terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Проверочная ПЦР, проверочное секвенирование
pet32A-col ust-F	CTGGTGCCACGCGGTTCT	Проверочное секвенирование

2.1.3. Штамм *E. coli*

Для проведения трансформации и индукции синтеза целевого белка был использован штамм *E. coli* XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIq ΔM15 Tn10 (Tetr)*]).

2.2. Методы

2.2.1. Синтез кДНК

Получение кДНК *Aspergillus ustus* проводилось по протоколам ExtractRNA (Евроген, Россия) и Mint kit (Евроген, Россия).

2.2.2. Дизайн олигонуклеотидов и плазмидного вектора со вставкой целевого гена

Дизайн плазмиды и олигонуклеотидов проводился в программах Benchling и SnapGene. Карта плазмиды приведена на Рисунке 1.

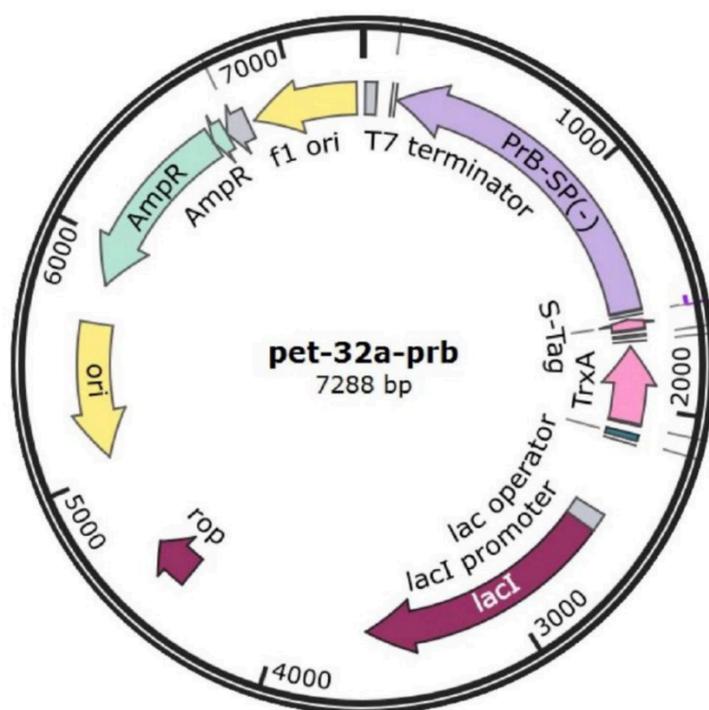


Рисунок 1. Карта плазмидного вектора

2.2.3. ПЦР

ПЦР использовали для наработки вставки целевого гена и проверки правильности сборки плазмиды. Для проведения ПЦР использовали следующие реактивы: Таq-полимеразу 5 ед./мкл (Евроген, Россия), дезоксинуклеозидтрифосфаты 10X (Евроген, Россия), ПЦР-буфер 10X (Евроген, Россия), деионизованную воду (Евроген, Россия), праймеры PrB-Gibson-F и PrB-Gibson-R (Таблица 1). Для проверочной ПЦР использовались праймеры pet32-F и T7 Terminator (Таблица 1). ПЦР проводили в общем объёме 25 мкл. Для проведения одной реакции использовали 10 нг кДНК, по 5 пмоль праймеров, 0,2 мкл Таq-полимеразы. Детектирование полученных фрагментов ДНК осуществляли при помощи горизонтального электрофореза в 1% агарозном геле.

2.2.4. Линеаризация плазмидного вектора

Рестрикцию векторной ДНК с целью линеаризации для дальнейшей сборки конструкции проводили при 37°C в течение 60 мин в буфере, рекомендованном производителем. Плазмидную ДНК и эндонуклеазы

рестрикции (ThermoFisher, США) использовали в соотношении: 1 мкг ДНК – 1 ед.

2.2.5. Сборка плазмиды

Сборка конструкции осуществлялась по стандартному протоколу ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit V2 (Vazyme, Россия).

2.2.6. Трансформация *E. coli*

Получение химически компетентных клеток штамма XL1-Blue проводили согласно стандартному протоколу Inoue. Трансформацию производили методом теплового шока: необходимое количество плазмиды (в зависимости от компетентности клеток) в объёме 1 мкл смешивали со 100 мкл компетентных клеток, инкубировали на льду 30 мин, затем при 42°C 2-3 мин, и снова на льду 10 мин, после чего добавляли 500 мкл среды LB, не содержащей антибиотиков. После инкубации при 37°C и постоянном перемешивании в течение 20-40 мин высевали бактерии на LB-агар, содержащий ампициллин, инкубировали при 37°C в течение ночи.

2.2.7. Культивирование *E. coli*

Для культивирования клеток *E. coli* в жидкой среде использовали среду LB, содержащую 1% NaCl, 1% бакто-триптона (Difco, США), 0,5% дрожжевого экстракта (Difco, США), 150 мкг/мл ампициллина (Difco, США). Для культивирования клеток *E. coli* на твёрдой среде использовали LB-агар, содержащий 1% NaCl, 1% бакто-триптона (Difco, США), 0,5% дрожжевого экстракта (Difco, США), 1,5% бакто-агара (Difco, США), 150 мкг/мл ампициллина (Difco, США).

2.2.8. Секвенирование

Секвенирование для проверки правильности сборки плазмиды проводили в ЗАО “Евроген” на генетическом анализаторе 3500xL Applied Biosystems по методу Сэнгера. Для секвенирования использовались праймеры pet32A-colust-F и T7 Terminator (Таблица 1).

2.2.9. Индукция экспрессии целевого фермента

Индукцию экспрессии целевого фермента проводили в объеме жидкой среды LB 100 мл с добавлением 1 мл 0,1М раствора ИПТГ при достижении оптической плотности клеточной культуры значения 0,6. Культуры с ИПТГ выращивались в течении 3 часов после добавления ИПТГ.

2.2.10. Разделение проб цитоплазмы и телец включения *E. coli*

После проведения индукции экспрессии культура клеток была разлита по фальконам по 50 мл. В каждый фалькон было добавлено 5 мл ТЕ буфера, содержащий 0,01М Трис-НСl рН 8,2 и 1мМ ЭДТА. Пробы цитоплазмы и телец включения разделялись с помощью ультразвука (4 минуты при 44 кГц) и центрифугирования (10 мин) при 15000 g. Проба цитоплазмы была смешана с ТЕ буфером в отношении 3:1. Агрегаты телец включения, выпавшие в осадок, были растворены в 2% растворе SDS.

2.2.11. Определение коллагенолитической активности с помощью зимографии с нативным коллагеном

Зимографию в полиакриламидном геле проводили с концентрацией акриламида в концентрирующем геле – 6%, в разделяющем – 12,5% с добавлением 15 мг коллагена Sigma-Aldrich (Merck) при силе тока в 50 мА в системе Лэммли. Для определения молекулярной массы фермента использовали набор метчиков Blue Plus® Protein Marker (TransGen Biotech). После проведения фореза проводили инкубацию геля на качалке в течение 30 минут в рефолдинговом растворе (10 мл 0,5 М Трис-НСl, рН 7, 2,5 мл Тритон-Х100, довести до 100 мл H₂O дист.). Раствор сливали, инкубировали гель на качалке в течение 30 минут в дистиллированной H₂O. После раствор сливали, проводили инкубацию геля в термостатируемом шкафу при 37°C в течение 18 часов в реакционном буфере (0,04 г NaN₃, 20 мл 0,3 М Трис-НСl, рН 7, довести до 200 мл H₂O дист.). После раствор сливали, проводили инкубацию геля на качалке в фиксирующем растворе (60 мл H₂O дист., 10 мл уксусной кислоты, 30 мл изопропанола) в течение 30 минут. Раствор сливали, затем инкубировали гель на качалке в течение 30 минут в окрашивающем растворе (2 мл 25-кратного раствора Кумасси, 48 мл раствора 5% этанола +

5% уксусной кислоты). Раствор сливали, гель инкубировали на качалке в течение 18 часов в отмывочном растворе (5% уксусной кислоты, 5% этанола).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Характеризация пептидаз *A. ustus*, найденных по транскриптомным данным

Анализ секвенирования транскриптома культуральной жидкости, собранной на 120 час культивирования на среде с ГРМ и коллагеном, показал наличие 51 транскрипта различных пептидаз. Результаты определения принадлежности пептидаз *A. ustus* к суперсемействам по классификации MEROPS представлены на Рисунке 2. Было выявлено, что наиболее представленным суперсемейством являются сериновые пептидазы (43%), среди которых превалирует семейство S10 (8 пептидаз). Также в секрете *A. ustus* обнаружили довольно большое количество металлопротеаз (31%) и аспаргатных протеаз (22%), среди которых превалируют семейства A1 (10 пептидаз) и M20 (5 пептидаз).

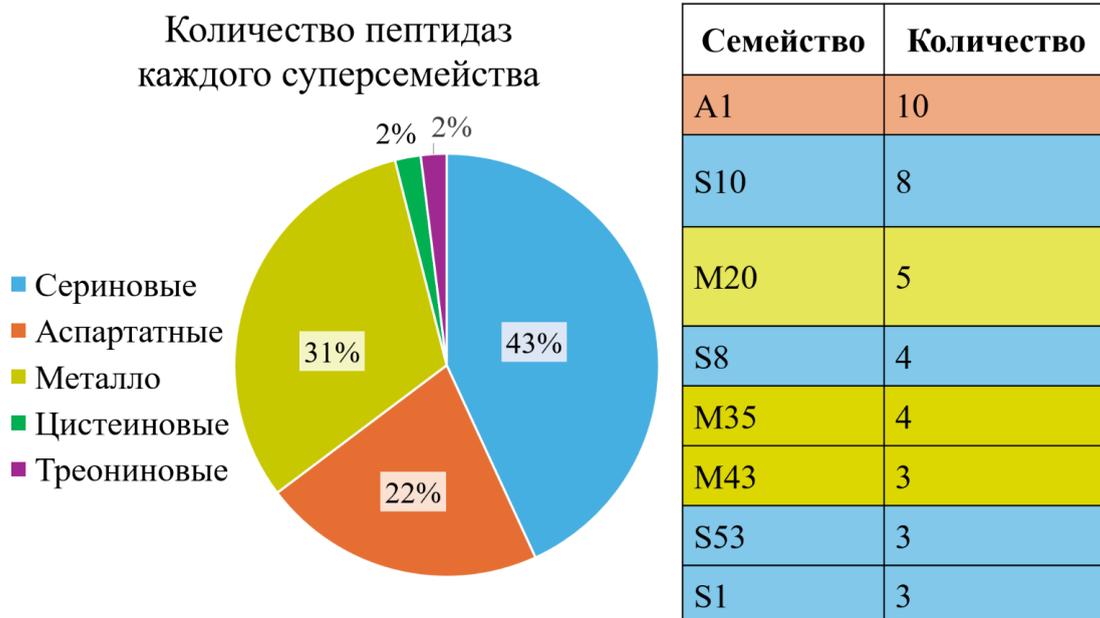


Рисунок 2. Определение принадлежности секретиромых *A. ustus* пептидаз к различным группам по классификации MEROPS

Далее для аминокислотной последовательности каждой пептидазы были построены пространственные модели в веб-сервере AlfaFold. На Рисунке 3 представлена примерная модель одной из найденных пептидаз (кодовое название - g9572).



Рисунок 3. Пример построенной модели для пептидазы g9572

С помощью веб-сервера LZerD были построены модели докинга каждой пептидазы на нативную структуру коллагена. На Рисунке 4 изображена примерная модель докинга одной из найденных пептидаз (g9572). Молекулярный докинг — это метод предсказания эффективности взаимодействия фермента или рецептора с лигандом посредством создания модели наиболее устойчивого комплекса двух молекул.



Рисунок 4. Модель докинга пептидазы g9572 (темно-зеленая структура) на тройную спираль коллагена I типа (светло-зеленая, фиолетовая и розовая спирали)

Каждая модель докинга была оценена по следующим критериям внутри веб-сервера – GOAP (**G**eneralized **O**rientation-dependent, **A**ll-atom statistical **P**otential for protein structure prediction), зависящий от относительной ориентации полей атомов в молекуле, DFIRE (**D**istance-scaled, **F**inite ideal-gas **R**eference state), учитывающий потенциалы аминокислотных остатков для более точного предсказания структуры белка, ITScore (**I**terative method for deriving), обучение модели которого основано на изменении парного атомарного потенциала до момента, пока модель не отличит нативную конформацию от макета. Чем меньше сумма оценок критериев, тем более репрезентативна получившаяся модель. Модели докинга каждой пептидазы на молекулу коллагена I типа сравнивали с моделью докинга коллагеназы *S. histolyticum*, подтвержденно имеющей высокую коллагеназную активность и использующуюся при лечении контрактуры Дюпюитрена [12]. Сравнение показало, что у 38 из 51 пептидаз *A. ustus* суммарный ранг модели докинга меньше, чем у модели докинга коллагеназы *S. histolyticum*. Такие результаты

свидетельствуют о том, что пептидазы гриба взаимодействуют с коллагеном с большей эффективностью, чем коллагеназа бактерии.

Для нахождения показателя изменения свободной энергии Гиббса связывания был использован веб-сервер PRODIGY, куда загружались модели докинга пептидаз на коллаген. После анализа результатов удалось обнаружить, что у 6 из 51 пептидаз *A. ustus* изменение энергии связывания меньше, чем у коллагеназы *C. histolyticum*, что свидетельствует о большей аффинности этих пептидаз к коллагену по сравнению с коллагеназой бактерии.

По результатам проведенного анализа среди пептидаз *A. ustus*, связывающих коллаген с большей эффективностью, чем коллагеназа *C. histolyticum*, были выявлены ранее неописанные пептидазы семейств C13, A1, S28 и S10 с коллагенолитическим потенциалом. Широкое разнообразие внеклеточных пептидаз *A. ustus*, обладающих коллагенолитической активностью, делает этот вид перспективным для изучения и получения пептидаз различного происхождения.

2. Обнаружение пептидазы, наиболее активно гидролизующей коллаген

По результатам биоинформатического анализа для клонирования в экспрессионную систему *E. coli* была выбрана пептидаза g5679 (Таблица 2). Она более высокоэкспрессированна, чем 94% найденных пептидаз, обладает молекулярной массой в 39,57 кДа и связывается с коллагеном с большей эффективностью, чем коллагеназа *C. histolyticum*.

Таблица 2. Характеристики выбранной для клонирования пептидазы g5679

Название	g5679.t1	Молекулярная масса, кДа	39,57
Уровень экспрессии, fpkm	96,47	ΔG (kJ mol⁻¹)	-38,49

Семейство по	S8	Общий ранг	438
MEROPS		модели	
		докинга	

3. Экспрессия пептидазы g5679 *A. ustus* в систему экспрессии *E. coli*

Результаты секвенирования подтвердили успешное клонирование гена пептидазы g5679 в вектор pET-32a. Выравнивание полученной последовательности относительно предсказанной конструкции показало полное соответствие, что свидетельствует о правильности сборки плазмиды и отсутствии ошибок в амплификации, клонировании и сборке с использованием набора для Gibson assembly.

Зимография полученного препарата телец включения и надосадочной жидкости цитоплазмы, проведенная в геле с коллагеном, показала наличие одной активной фракции коллагенолитической пептидазы с молекулярной массой около 40 кДа (Рисунок 5). Полосу наблюдали как в надосадочной жидкости цитоплазмы, так и в осадке телец включения, что указывает на успешную продукцию пептидазы в трансформированных клетках *E. coli*. Выявление целевого белка в обеих фракциях предполагает частичное растворение пептидазы в цитоплазме, а также ее агрегирование в тельцах включения. Данные результаты подтверждают, что созданная конструкция обеспечивает экспрессию белка с ожидаемыми характеристиками и возможностью дальнейшей очистки и анализа.

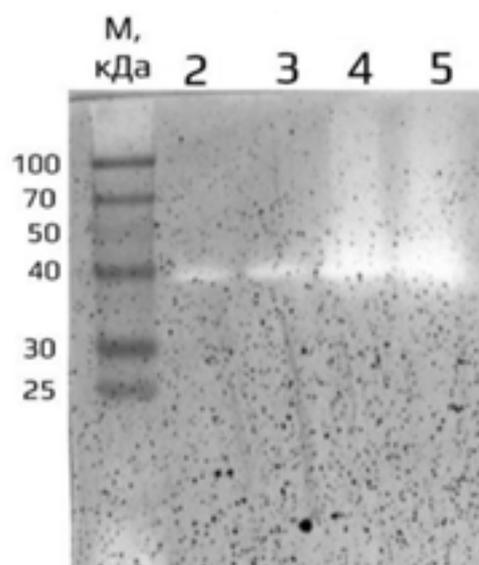


Рисунок 5. Зимограмма в геле с коллагеном образцов надосадочной жидкости (2, 3) и телец включения (4, 5)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рубцы и шрамы являются распространённым типом косметических дефектов кожи. Современные методы лечения рубцов могут вызывать ряд неблагоприятных побочных эффектов. Альтернативой инвазивной противорубцовой терапии являются мази и гели на основе коллагенолитических ферментов. Перспективными продуцентами таких ферментов являются микромицеты рода *Aspergillus*, в том числе *A. ustus*. Транскриптомный анализ показал наличие 51 мРНК внеклеточных протеаз. Сравнение моделей докинга этих протеаз на нативную структуру коллагена с результатом докинга для уже использующейся в медицине коллагеназы *Clostridium histolyticum* выявило 38 ферментов *A. ustus*, параметры докинга которых превосходят таковые для протеазы *C. histolyticum*. 6 ферментов микромицета связывались с коллагеном с более отрицательной энергией Гиббса связывания, чем коллагеназа клостридии. Данный фермент был затем клонирован в экспрессионную систему *Escherichia coli*. Зимография в геле с коллагеном показала наличие одной активной коллагеназы молекулярной массой около 40 кДа. Полученные результаты создают основу для разработки препаратов на основе коллагенолитического фермента *A. ustus*, превосходящего коммерческие аналоги, и подтверждают перспективность *A. ustus* как продуцента ферментов для биомедицины.

ВЫВОДЫ

1. По результатам анализа транскриптома культуральной жидкости, собранной на 5 день твердофазного культивирования на среде с ГРМ и коллагеном был выявлен 51 высоко экспрессированный транскрипт внеклеточных пептидаз, большинство из которых входят в семейство сериновых пептидаз (43%).
2. Анализ моделей белковых комплексов выявленных пептидаз с коллагеном показал, что у 38 из 51 пептидазы суммарный ранг модели докинга в LZerD оказался ниже, чем у комплекса коллагеназы *C. histolyticum*, изменение свободной энергии Гиббса связывания – ниже у 6 из 51 пептидазы.
3. Клонирование в систему экспрессии *E. coli* гена пептидазы g5679.t1 успешно произведено и подтверждено методом ПЦР.
4. Зимография, проведенная в геле с коллагеном, показала наличие одной активной рекомбинантной коллагеназы с молекулярной массой около 40 кДа во фракциях телец включения и в надосадочной жидкости.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mehta M., Branford O.A., Rolfe K.J. The evidence for natural therapeutics as potential anti-scarring agents in burn-related scarring // *Burns Trauma*. 2016. Vol. 4. P. 15.
2. Mari W., Alsabri S.G., Tabal N., Younes S., Sherif A., Simman R. Novel Insights on Understanding of Keloid Scar: Article Review // *J Am Coll Clin Wound Spec*. 2015. Vol. 7, № 1-3. P. 1–7.
3. Попова, Е. А., Осмоловский, А. А., Крейер, В. Г., Котова, И. Б. Продукция штаммом *Aspergillus ustus* протеиназ, высокоактивных в отношении фибриллярных белков // *Mikol. Fitopatol*. Pleiades Publishing Ltd, 2019. Vol. 53, № 4. P. 229–235.
4. Wan M.-Y., Wang H.-Y., Zhang Y.-Z., Feng H. Substrate specificity and thermostability of the dehairing alkaline protease from *Bacillus pumilus* // *Appl Biochem Biotechnol*. 2009. Vol. 159, № 2. P. 394–403.
5. Ida É.L., da Silva R.R., de Oliveira T.B., Souto T.B., Leite J.A., Rodrigues A., Cabral H. Biochemical properties and evaluation of washing performance in commercial detergent compatibility of two collagenolytic serine peptidases secreted by *Aspergillus fischeri* and *Penicillium citrinum* // *Prep Biochem Biotechnol*. 2017. Vol. 47, № 3. P. 282–290.
6. Lima C.A., Lima Filho J.L., Marques B.V., Converti A., de Souza A.F., Porto A.L.F. Production and characterization of a collagenolytic serine proteinase by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622: A factorial study // *Biotechnol. Bioprocess Eng*. Springer Science and Business Media LLC, 2011. Vol. 16, № 3. P. 549–560.
7. Sukhosyrova E.A., Nikitina Z.K., Yakovleva M.B., Veshchikova E.V., Bykov V.A. Characteristics of collagenolytic enzymes secreted by deuteromycete fungi *Aspergillus flavus* // *Bull Exp Biol Med*. 2003. Vol. 135, № 5. P. 447–451.
8. Wanderley M.C.A., Duarte Neto J.M.W., de Lima Filho J.L., Lima C.A., Teixeira J.A.C., Porto A.L.F. Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review // *Braz J Microbiol*. 2017. Vol. 48, № 1. P. 13–24.

9. Gur S., Limin M., Hellstrom W.J.G. Current status and new developments in Peyronie's disease: medical, minimally invasive and surgical treatment options // *Expert Opin Pharmacother.* 2011. Vol. 12, № 6. P. 931–944.
10. Zhang Y.-Z., Ran L.-Y., Li C.-Y., Chen X.-L. Diversity, Structures, and Collagen-Degrading Mechanisms of Bacterial Collagenolytic Proteases // *Appl Environ Microbiol.* 2015. Vol. 81, № 18. P. 6098–6107.
11. Попова, Е. А., Крейер, В. Г., Комаревцев, С. К., Шабунин, С. В., Осмоловский, А. А. (2021). Свойства внеклеточной протеиназы микромицета *Aspergillus ustus* 1, обладающей высокой активностью при гидролизе фибриллярных белков. *Прикладная биохимия и микробиология*, 57(2), 138-144
12. Warwick D., Arandes-Renú J.M., Pajardi G., Witthaut J., Hurst L.C. Collagenase *Clostridium histolyticum*: emerging practice patterns and treatment advances // *J Plast Surg Hand Surg.* 2016. Vol. 50, № 5. P. 251–261.