

РАСТВОРИМЫЕ И ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ПАПАИН И ТРИПСИН–ДЕСТРУКТОРЫ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНОК

Е.Ю. Тризна¹, Д.Р. Байдамшина¹, М.Г. Холявка², И.С. Шарафутдинов¹, А.Р. Хаирутдинова¹,
Ф.А. Хафизова¹, Е.Ю. Закирова¹, Р.Г. Хафизов¹, М.И. Богачев³, А.Р. Каюмов¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Воронежский Государственный университет, Воронеж, Россия

³ Санкт–Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ»
им. В.И. Ульянова (Ленина), Санкт–Петербург, Россия

Soluble and immobilized papain and trypsin as destroyers of bacterial biofilms

E.Yu. Trizna¹, D.R. Baydamshina¹, M.G. Kholyavka², I.S. Sharafutdinov¹, A.R. Hairutdinova¹,
F.A. Khafizova¹, E.Yu. Zakirova¹, R.G. Hafizov¹, A.R. Kayumov¹

¹ Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

² Voronezhsky State University, Voronezh, Russia

³ St. Petersburg Electrotechnical University, St. Petersburg, Russia

Протеолитические ферменты активно используются в медицине при лечении пациентов с длительно незаживающими ранами, удаления некротических масс и служат дополнением к хирургическому вмешательству. В связи с этим исследовали способность папаина и трипсина в растворимой и иммобилизованной форме разрушать бактериальные биопленки. Установлено, что обработка папаином приводит к лизису биопленок образованных *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, и в меньшей степени *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis*. Показано, что ни один из исследуемых ферментов не обладает мутагенностью и цитотоксичностью, и не вызывает повышения количества некротических клеток в культуре *in vitro*.

Ключевые слова: протеолитические ферменты, биопленки, папаин, трипсин, иммобилизация.

Введение

Протеолитические ферменты, катализирующие гидролиз белков, давно используются в медицине при лечении пациентов с длительно незаживающими ранами и ожогами [1–5]. Ферменты разрушают некротические массы, образующиеся в результате повреждения тканей, снижают риск тромбоза. В организме они продуцируются эндогенно и их активация регулируется, но не всегда она оказывается достаточной для эффективного заживления раны [6]. В современной медицине все чаще для ранозаживления применяются растворимые и иммобилизованные формы ферментов, среди которых наиболее распространены трипсин, химотрипсин, коллагеназа и папаин [1, 2, 7]. Для трипсина и папаина были получены положительные результаты при использовании при лечении ожогов, пролежней и других повреждений покровов и мягких тканей [8–10].

Известно, что растворимые формы ферментов обладают некоторыми недостатками, такими как быстрая инактивация, гидролиз собственными протеазами организма и бактерий [3, 4]. Одним из способов повышения стабильности ферментов является иммобилизация на нерастворимых носителях [11–13]. Это позволяет увеличить время полужизни фермента, упрощает доставку и дает возможность быстро удалить фермент [11]. Свойства иммобилизованных ферментов определяются свойствами как самого фермента, так и его носителя [14]. Однако до сих пор не существует оптимальной методики иммо-

The proteolytic enzymes are widely used in medicine as a wound healing agents, removing necrotic tissues and serving as an alternative to surgery. The ability of soluble and immobilized papain and trypsin to destroy bacterial biofilm was investigated. We show that treatment with papain leads to disruption of biofilms formed by *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, and in a lesser extent of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. It is shown that none of the investigated enzymes has mutagenicity and cytotoxicity, and causes no increase in the amount of necrotic cells in culture *in vitro*.

Key words: proteolytic enzymes, biofilms, papain, trypsin, immobilization.

биллизации протеолитических ферментов с выраженным регенерирующим эффектом [15].

Одним из наиболее перспективных матриц для иммобилизации с хорошей способностью к формированию геля, мембраны, с хорошими адгезионными свойствами, низкой стоимостью, низкими иммунногенностью и токсичностью, высокой механической прочностью и стабильностью, антибактериальными свойствами является природный полимер – хитозан [12, 15–17]. Композиция на основе хитозана, содержащая азелаиновую, ретиноевую или салициловую кислоту и антибиотики в различных комбинациях, используется в дерматологии [18]. Разработано ранозаживляющее средство, в составе которого содержится: порошкообразный хитозан (65%); аскорбиновая кислота (5%); тримекаин (0,75%); пепсин и коллагеназа (32%) [19].

Недавно была показана возможность использования протеолитических ферментов для борьбы с бактериальными биопленками на поверхности ран, тканей, медицинских изделий [8–11]. Пектиназа и субтилизин А разрушали биопленку *Escherichia coli* и повышали их чувствительность к антибиотику [12]. Химотрипсин эффективно разрушал биопленку *Staphylococcus aureus* [13].

Ранее нами были иммобилизованы трипсин на матрице хитозана [20, 21], исследованы кинетические параметры фермента [22]. Также была проведена иммобилизация папаина на матрице хитозана (неопубликованные данные) по тем же методикам [20, 21].

Целью работы было оценить гено- и цитотоксические свойства иммобилизованных ферментов *in vitro* для дальнейших исследований для удаления бактериальной флоры с зубных имплантатов в процессе остеоинтеграции и наращивания костной ткани вокруг имплантата.

Материал и методы

Исследуемые соединения

В работе использовались ферменты: папаин, трипсин (Sigma, США). Трипсин и папаин были иммобилизованы ранее на кислоторастворимом среднемолекулярном ($M_r = 200$ кДа, СД 82%) хитозане (ЗАО «Биопрогресс», Россия) [21, 22].

Штаммы, линии клеток и условия культивирования

В работе использовали штаммы *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus epidermidis* (клинический изолят), *Micrococcus luteus* (клинический изолят), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus subtilis* 168. Образование биопленок бактериями определяли с использованием среды BM (Basal medium, г/л: пептон – 7; глюкоза – 5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 2; $CaCl_2$ – 0,05).

Для проверки мутагенности соединений использовали штаммы *Salmonella typhimurium* TA98 (*hisD3052*, *rfa*, *uvr-*, *pkm101*, *bio-*) [23] и *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 [24]. Все бактериальные штаммы культивировали в среде LB (триптон – 10 г/л; дрожжевой экстракт – 5 г/л; NaCl – 5 г/л; pH 8,5) [25].

Для оценки цитотоксичности ферментов в работе использовали линию клеток MCF7 и мезенхимные стволовые клетки, полученные из стромально-васкулярной фракции жировой ткани собаки. Клетки ресуспендировали (1×10^5 клеток на мл) в среде DMEM с добавлением 10% FBS, 2 mM L-глутамина, 100 мкг/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина.

Получение мезенхимных стволовых клеток

Получение образца жировой ткани из большого сальника собаки проводилось в асептических условиях ветеринарной операционной под общим наркозом. Образец ткани был доставлен в лабораторию в стерильном контейнере с физиологическим раствором в течение 1 ч. Стромально-васкулярная фракция клеток была получена в результате ферментативной обработки гомогенизированной жировой ткани собаки 0,2% раствором коллагеназы краба (Биолот, Россия) в DPBS (ПанЭко, Россия) при 37°C в течение 1 ч. с качанием. Из суспензии отдельных клеток путем центрифугирования выделяли осадочную фракцию клеток стромально-васкулярного фенотипа. Супернатант удаляли, осадок трехкратно промывали физиологическим раствором (Биолот, Россия), осаждая центрифугированием. Затем жировую ткань обрабатывали коллагеназой I путем легкого перемешивания (в течение часа при 37°C). Клетки концентрировали и 2-кратно отмывали центрифугированием при 500 g в течение 10 мин. Затем клетки ресуспендировали в ростовой среде, высевали на 96-луночные планшеты и культивировали 24 ч. (37°C, 5% CO_2). Через сутки делали смену ростовой среды. При этом клетки, не подвергшиеся адгезии, удалялись [27].

Иммунофенотип полученных клеток оценивали по экспрессии ряда поверхностных маркеров (табл. 1). Иммуноцитохимические реакции ставили согласно протоколам фирм-изготовителей. При выявлении маркеров неконъюгированными антителами в качестве вторичных антител применялись антивидовые антитела, меченные флуоресцентными красителями. В качестве контроля для конъюгированных антител использовали пробы с добавлением неиммунных меченых FITC («Сорбент», Россия) того же изотипа, что и антитела против исследуемого маркера. Для окрашивания ядер использовали DAPI (Sigma, США) в концентрации 1 мкг/мл. Препараты анализировали с помощью конфокального микроскопа (Carl Zeiss, Германия).

Таблица 1. Антитела, использованные в работе

Антитело	Производитель	Рабочее разведение
Кроличье поликлональное антитело к CD14	Santa Crus sc 9150	ICC-1:100
Мышиное моноклональное антитело к CD 34	Santa Crus sc 7324	ICC-1:100
Мышиное моноклональное антитело к CD 45	Santa Crus sc 18901	ICC-1:100
Мышиное моноклональное антитело к Thy-1, конъюгированное с FITC	Santa Crus sc 19614	ICC-1:100
Мышиное моноклональное антитело к CD 10, конъюгированное с FITC	ООО «Сорбент»	ICC-1:100
Мышиное моноклональное антитело к CD 71, конъюгированное с FITC	ООО «Сорбент»	ICC-1:100
FITC-меченые антимышиные антитела, изотипический контроль	ООО «Сорбент»	ICC-1:100
Антитела осли к IgG мыши, конъюгированные с флюорохромом Alexa Fluor 488	Invitrogen A 21202	ICC-1:1000
Антитела осли к IgG кролика, конъюгированные с флюорохромом Alexa Fluor 555	Invitrogen A 31572	ICC-1:1000

Получение биопленок и окрашивание кристаллическим фиолетовым

Анализ образования биопленок проводили в 96-луночных полистироловых планшетах (TC-treated, Eppendorf, США). Бактерии выращивали 3 сут. без качания при 37°C на среде BM в лунках, содержащих по 200 мкл культуры бактерий начальной плотностью 1×10^6 КОЕ/мл. Через 72 часа культивирования из опытных лунок удаляли культуральную жидкость и вносили среду с добавлением различных концентраций исследуемых веществ с последующей инкубацией в течение 24 ч. Затем удаляли культуральную жидкость, однократно промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) pH 7,4 и просушивали в течение 20 мин. Вносили 150 мкл 0,1% раствора кристаллического фиолетового (Sigma, США) в 96% этаноле, инкубировали в течение 20 мин. Несвязавшийся краситель смывали PBS. Связавшийся краситель элюировали в 150 мкл 96% этилового спирта и измеряли поглощение при длине волны 570 нм на микропланшетном ридере Tecan infinite 200 Pro (Швейцария). В качестве контроля использовали лунки, в которых клетки не инкубировали, но проводили все манипуляции процесса окрашивания.

Оценка гено- и цитотоксичности ферментов

Мутагенность веществ определяли с помощью теста Эймса. 5 мл ночной культуры *Salmonella typhimurium* A98 переносили в 20 мл LB с ампициллином (25 мкг/мл) и инкубировали при 37°C с качанием в течение 2 часов до достижения культурой экспоненциальной фазы роста. Затем клетки собирали центрифугированием в течение 15 мин. при 4000 об./мин. Осадок ресуспендировали в однократном растворе солевой основы. Исследуемые соединения тестировали в двух концентрациях 10 мкг/мл и 100 мкг/мл. В качестве позитивного контроля использовался азид натрия (NaN_3). Тестируемое вещество считали мутагенным, если число колоний-ревертантов в опыте достоверно превышало таковое в контроле (растворителе) более чем в 2 раза.

ДНК-повреждающую активность соединений оценивали в SOS-хроматесте на штамме *S. typhimurium* TA1535/pSK1002. Культуру бактерий разводили в среде LB в 10 раз. Полученную культуральную жидкость разливали по 3 мл в пробирки и растили 4 ч. в присутствии исследуемых соединений в необходимых концентрациях. Затем клетки собирали центрифугированием и определяли активность β -галактозидазы в клетках как описывалось в [27, 28].

Цитотоксичность веществ определяли с помощью метаболического MTS-теста на клетках линии MCF7 и клетках сосудисто-стромальной фракции. В 96-луночные пластиковые планшеты (TC-treated, Eppendorf) засевали культуру клеток (4000 кл. на лунку) и вносил исследуемые соединения. Затем

культуру клеток инкубировали 24 ч. при температуре 37°C и оценивали остаточную активность митохондриальной дегидрогеназы в клетках.

Контроль влияния ферментов на пролиферацию клеток также осуществляли с помощью флуоресцентной микроскопии. Клетки выращивали в течение 72 ч. в присутствии растворимых и иммобилизованных ферментов (10 мкг/мл, 100 мкг/мл). Через каждые 24 ч. культивирования удаляли культуру и проводили окрашивание клеток акридином оранжевым и бромистым этидием (5 мкг/мл и 3 мкг/мл в PBS, соответственно [29]) и анализировали с помощью дифференциальной флуоресцентной микроскопии на микроскопе KarlZeissObserver 2.0.

Результаты исследования

Оценка разрушения бактериальных биопленок растворимыми и иммобилизованными ферментами

Разрушая внеклеточный полимерный матрикс биопленки, можно повысить эффективность антибактериальных препаратов [30, 31]. Исследовали действие растворимой и иммобилизованной форм папаина и трипсина на образование бактериальных биопленок. Клетки условно-патогенных бактерий *S. aureus*, *S. epidermidis*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *E. coli* и *P. aeruginosa* выращивали в 96-луночных планшетах при 37°C на среде BM для образования прочной биопленки. После 72 ч. культивирования, удаляли культуральную жидкость, вносили свежую среду и ферменты в различных концентрациях, после продолжали инкубирование в течение 24 ч. Поскольку для существующих коммерческих препаратов ферментов для ранозаживления рекомендована концентрация до 10 мкг/мл (инструкции коммерческих препаратов), в наших экспериментах папаин и трипсин вносились до конечных концентраций 1, 10, 100 мкг/мл. Затем проводилось окрашивание остаточной биопленки кристаллическим фиолетовым.

Растворимый папаин наиболее эффективно разрушал биопленки *P. aeruginosa*, *E. coli* и *M. luteus* в концентрации 10 мкг/мл (рис. 1 А). При этом трипсин был значительно менее эффективен по сравнению с папаином (рис. 1 Б). Иммобилизованные формы ферментов были менее активны (рис. 1 В), однако биопленки *P. aeruginosa* и *M. luteus* разрушались на 30% при концентрации иммобилизованного папаина 10 мкг/мл (в пересчете на фермент). Иммобилизованный трипсин практически не вызывал достоверного разрушения биопленок (рис. 1 Г).

Несмотря на это, иммобилизованные ферменты более стабильны, что позволяет использовать их в течение большего времени и делает их удобными для практического применения при разрушении биопленок, образованных клетками микрококка и псевдомонады.

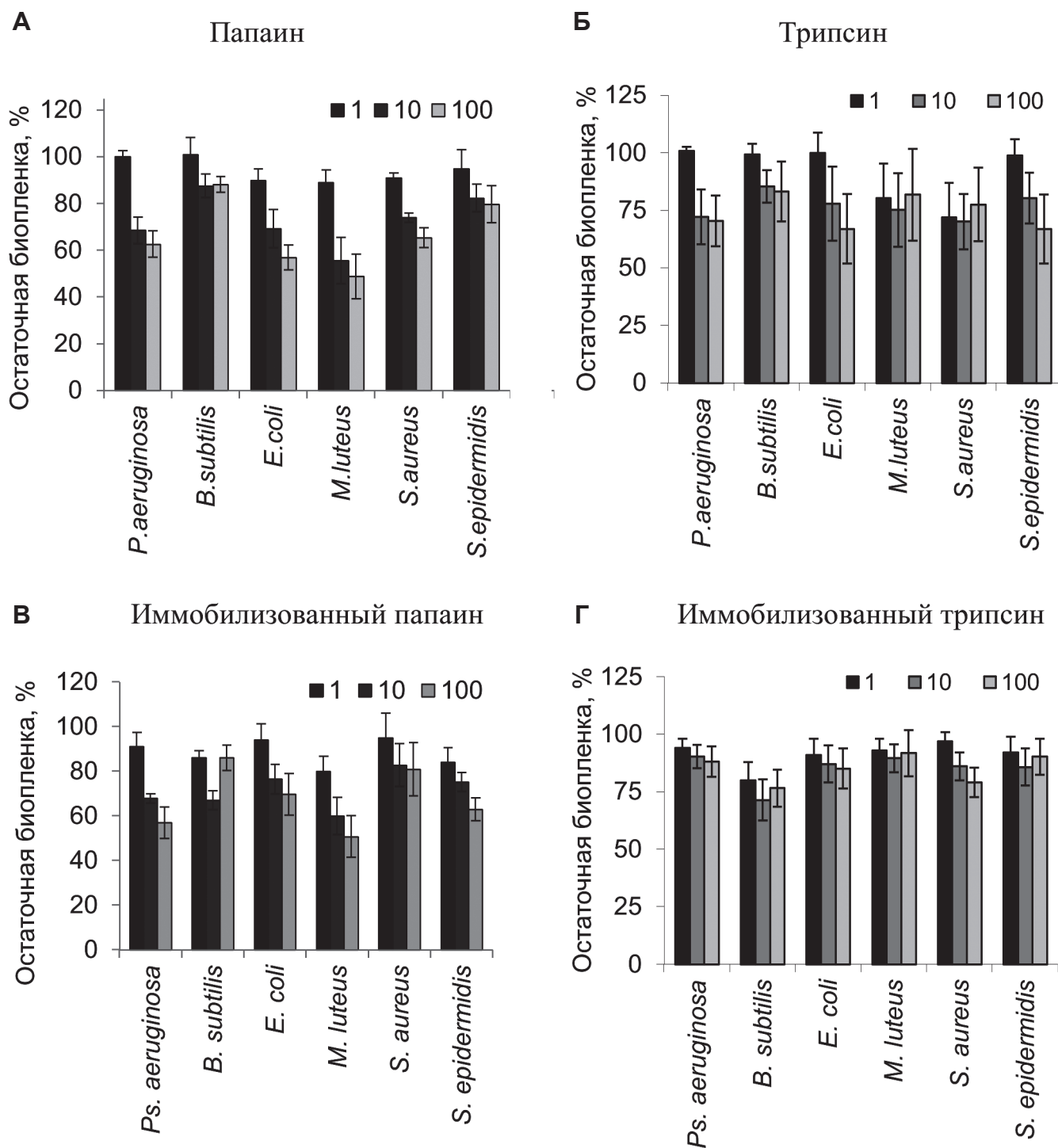


Рис. 1. Разрушение бактериальных биопленок растворимыми (А, Б) и иммобилизованными на хитозане (В, Г) фицином и трипсином

Получение клеток сосудисто-стромальной фракции

Среди актуальных проблем в области имплантологии особое место занимает вопрос вертикальной аугментации в зонах сегментарных дефектов альвеолярных отростков челюстей. Одним из возможных способов решения данной задачи является комбинированный подход на основе биосовместимых

биоинертных пористых материалов и клеток сосудисто-стромальной фракции, получаемых из жировой ткани (ССФЖТ) [32, 33].

Установлено, что выделенные ССФЖТ имели фибробластоподобную морфологию, экспрессировали маркеры, характерные для мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) (Thy-1, CD 71, CD10) и не экспрессировали маркеры гематopoэтических клеток: CD14, CD34 and CD45 (рис. 2).

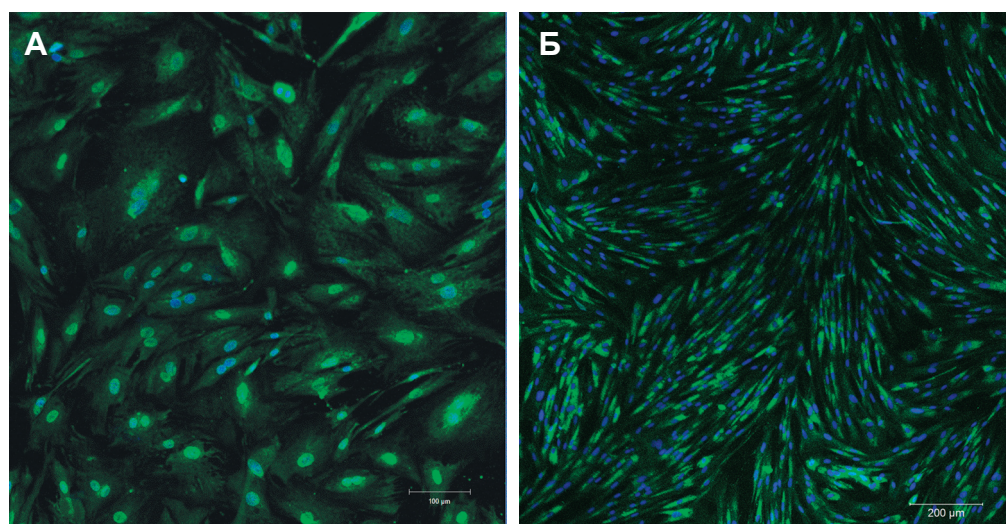


Рис. 2.
Иммунофлуоресцентное
окрашивание клеток
сосудисто-стромальной
фракции жировой ткани
(ММСК) собаки,
2 пассаж:
А – CD 71;
Б – Thy-1

Оценка генотоксичности веществ

Несмотря на то, что ранее было показано отсутствие гено- и цитотоксических эффектов ферментов на по отношению к клеткам эукариот [4, 9], в некоторых работах была установлен негативный эффект папаина при лечении ожогов и удаления некротизированных тканей [34, 35]. Поэтому на следующем этапе оценивали генотоксичность растворимых и иммобилизованных трипсина и папаина в тесте Эймса и SOS-хромотесте [24, 25].

Ни одно из тестируемых веществ не приводило к увеличению числа мутантов в тесте Эймса, что свидетельствует о отсутствии мутагенного

действия (табл. 2). Также, ни одно соединение в концентрациях 10 мкг/мл (планируемая фармацевтическая доза) и 100 мкг/мл не вызывало повышения SOS-ответа в UMU тесте, что говорит об отсутствии повреждения ДНК клеток.

Определение цитотоксичности веществ. Для проверки цитотоксичности использовали метаболический МТС-анализ на клетках MCF7 и полученных ММСК. Этот анализ основан на окислении субстрата МТС митохондриальной дегидрогеназой. Ни одно из соединений не снижало активности митохондриальной дегидрогеназы после 24 ч. инкубации с клетками, что свидетельствует об отсутствии цитотоксичности (табл. 3).

Таблица 2. Мутагенность и ДНК-повреждающая активность растворимых и иммобилизованных ферментов (отрицательный контроль принят за единицу)

Концентрация, мкг/мл	Мутагенность (тест Эймса)		ДНК-повреждающая активность	
	10	100	10	100
Папаин	0,9±0,25	0,7±0,13	0,5±0,07	0,4±0,02
Папаин иммобилизованный	1,3±0,34	1,1±0,55	0,7±0,36	0,6±0,04
Трипсин	0,4±0,08	0,3±0,05	1,3±0,56	1,2±0,29
Трипсин иммобилизованный	0,9±0,31	0,6±0,18	1,2±0,63	1,2±0,75
Хитозан	1,2±0,52	0,7±0,31	0,4±0,18	0,4±0,03
Положительный контроль	7,4±2,34	7,4±2,34	13,4±3,31	13,4±3,31

Таблица 3. Цитотоксичность растворимых и иммобилизованных ферментов в метаболическом МТС-тесте (остаточная активность, процент от контроля)

Соединения / конечная концентрация	MCF7			ММСК		
	1 мкг/мл	10 мкг/мл	100 мкг/мл	1 мкг/мл	10 мкг/мл	100 мкг/мл
Папаин	87±9,3	93±12,5	100±21,9	98±13,2	92±11,4	66±7,2
Иммобилизованный папаин	98±16,5	106±21,4	118,0±42,0	99±11,3	97±10,2	92±8,7
Трипсин	147±34,8	118±29,1	119,0±31,2	96±0,56	91±0,47	87±0,37
Иммобилизованный трипсин	96±18,4	83±11,7	78,0±1,26	93±0,39	85±0,27	82±14,7
Хитозан	104±6,9	130±11,6	127±5,5	101±8,5	104±12,7	117±8,5

За 100% принимали остаточную активность в клетках, пролиферирующих без внесения соединений.

Для оценки влияния ферментов на процесс дифференциации стволовых клеток из стромально-васкулярной фракции жировой ткани собак клетки культивировали в присутствии исследуемых ферментов в течение 72 ч. Каждые 24 ч. проводилась оценка дифференцировки клеток, а также учет некротических клеток по сравнению с контролем с помощью флуоресцентной микроскопии как описано в материалах и методах. Ни одно вещество не приводило к превышению количества погибших клеток в течение 72 ч. культивации по сравнению с контролем, что говорит об отсутствии цитотоксичности веществ (рис. 3). Также, несмотря на присутствие ферментов в среде, количество клеток перешедших к дифферен-

циации не отличалось от контроля. Кроме того, при увеличении концентрации ферментов до 100 мкг/мл не было отмечено доза-зависимого эффекта.

Обсуждение

В составе биопленок клетки бактерий погружены в выделяемый ими полисахаридный матрикс [36, 37]. В этом виде они чрезвычайно устойчивы к обработке бактерицидными препаратами и иммунной системе человека [37]. Действие современных антибактериальных средств также обладает низкой эффективностью против подобных биопленок. Поэтому одной из актуальных проблем в фармакологии

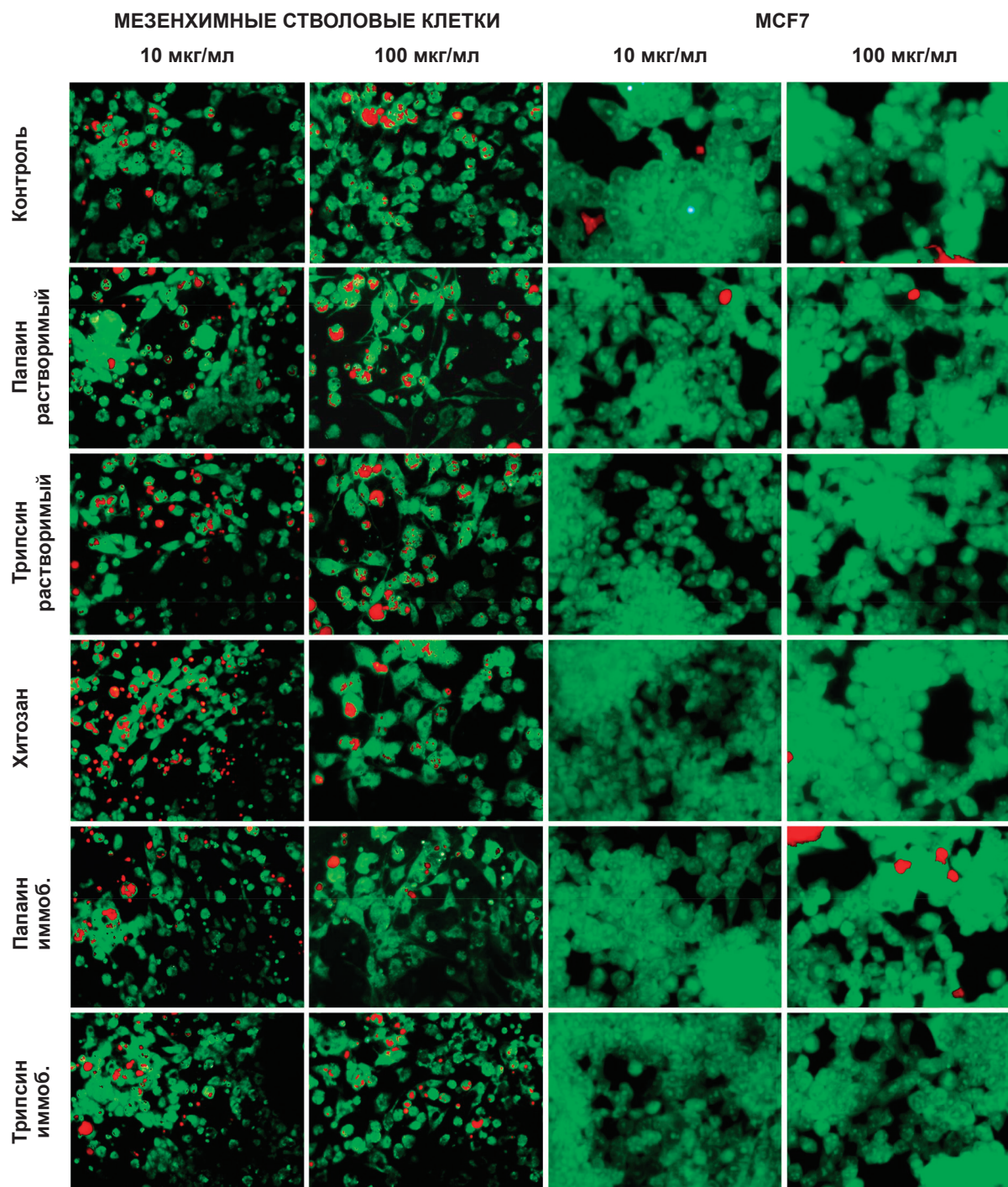


Рис. 3. Влияние протеолитических ферментов в концентрации 10 мкг/мл и 100 мкг/мл на жизнеспособность и дифференцировку ММСК и клеток MCF7. Окраска: бромистым этидием и акридином оранжевым

является разработка препаратов, которые бы эффективно подавляли образование бактериальных биопленок или приводили к их разрушению [4, 7]. Полученные нами данные позволили предложить растворимый и иммобилизованный папаин для разрушения биопленок *P. aeruginosa* и *M. luteus* (см. рис. 1). Необходимо отметить, что эффективность иммобилизованного фермента значительно ниже чем у растворимого (см. рис. 1B). Однако в иммобилизованном виде имеется возможность его адресной доставки для удаления омертвевших тканей и бактериальных загрязнений, в том числе за счет антибактериального действия хитозана [12, 15–18]. Следовательно, папаин можно рассматривать в качестве препарата для удаления как некротических масс, так и бактериальной биопленки с поверхности ран [12, 13, 34, 35].

Поскольку препараты, предполагаемые использовать в медицинских и ветеринарных целях, не должны оказывать мутагенного и цитотоксического действия, была исследована цитотоксичность растворимых и иммобилизованных апаина и трипсина. Наши результаты показали, что ни одно из

соединений не приводило к снижению активности дегидрогеназы (см. табл. 3) и не нарушало процесс дифференцировки ММСК. Также не было выявлено мутагенного действия ферментов в тесте Эймс и SOS-хроматесте (табл. 2). Таким образом, иммобилизованные протеазы представляются безопасными средствами для обработки поверхностей тканей и снижения бактериальной загрязнённости в процессе остеointеграции имплантов, однако требуют дальнейших исследований на вивальных моделях.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (Проект №15-14-00046) и в рамках программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров с использованием оборудования Междисциплинарного центра коллективного пользования Казанского федерального университета при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (ID RFMEFI59414X0003).

ЛИТЕРАТУРА:

- Janzekovic Z. A new concept in the early excision and immediate grafting of burns. *J. Trauma* 1970; 10: 1103-8.
- Klasen H.J. A review on the non-operative removal of necrotic tissue from burn wounds. *Burns* 2000; 26: 207-22.
- Thallinger B., Prasetyo E.N., Nyanhongo G.S. et al. Antimicrobial enzymes: An emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms. *Biotechnol. J.* 2013; 8: 97-109.
- Silverstein P., Maxwell P.L.D. Enzymatic débridement. In: Boswick J.A., editor. *The art and science of burn care*. Rockville: Aspen Publishers; 1987. p. 75-81.
- McCarty S.M., Cochrane C.A., Clegg P.D. et al. The role of endogenous and exogenous enzymes in chronic wounds: A focus on the implications of aberrant levels of both host and bacterial proteases in wound healing. *Wound Repair and Regeneration* 2012; 20(2): 125-36.
- McCallon S.K., Weir D., Lantis J.C. Optimizing wound bed preparation with collagenase enzymatic debridement. *J. Am. Coll. Clin. Wound. Spec.* 2015; 6(1-2): 14-23.
- Sinclair R.D., Ryan T.J. Proteolytic enzymes in wound healing: the role of enzymatic debridement. *Australas J. Dermatol.* 1994; 35(1): 35-41.
- Alvarez O.M., Fernandez-Obregon A., Rogers R.S. et al. Chemical debridement of pressure ulcers: a prospective, randomized, comparative trial of collagenase, and papain-urea formulations. *Wounds*. 2002; 14: 293-301.
- Gudmundsdóttir Á., Hilmarsson H., Stefansson B. Potential Use of Atlantic Cod Trypsin in Biomedicine. *Biomed. Res. Int.* 2013; 749078: 1-11.
- Garcia-Galan C., Berenguer-Murcia Á., Fernandez-Lafuente R. et al. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Adv. Synth. Catal.* 2011; 353: 2885-904.
- Sheldon R.A. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Adv. Synthesis Catalysis*. 2007; 349: 1289-307.
- Gorecka E., Jastrzebska M. Immobilization techniques and biopolymer carriers. *Biotechnol.* 2011; 75: 65-86.
- Mogoşanu G.D., Grumezescu A.M. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *Int. J. Pharmaceutics* 2014; 463(2): 127-36.
- Bezerra C.S., de Farias Lemos C.M.G., de Sousa M., Gonçalves L.R.B. *J. Appl. Polym. Sci.* 2015; 132:42125.
- Tang Z.X., Qian J.Q., Shi L.E. Characterizations of immobilized neutral proteinase on chitosan nano-particles. *Process Biochem.* 2006; 41: 1193-7.
- Younes I., Rinaudo M. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Mar. Drugs*. 2015; 13(3): 1133-74.
- Dai T., Tanaka M., Huang Y.Y. et al. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* 2011; 9: 857-79.
- Oester D.A., Wochter R., Gates J.A. USA patent 6451773. МПК7: A OIN 43/04. 2002 Sept17.
- Игнатов Г.Г., Писаренко Л.В., Хрупкий В.И. Заживляющее средство. Патент РФ на изобр. №2271814. 20 марта 2006.
- Логонова О.О., Холявка М.Г., Артюхов В.Г. и др. Разработка методики получения гетерогенного биокатализатора на основе трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана. *Фундаментальные исследования* 2013; 11(3): 484-7.
- Сливкин А.И., Беленова А.С., Холявка М.Г. и др. Разработка биокатализатора на основе трипсина, иммобилизованного на хитозане. *Сорбционные и хроматографические процессы* 2013; 13(1): 53-9.
- Логонова О.О., Холявка М.Г., Артюхов В.Г. Физико-химические и кинетические свойства гетерогенного биокатализатора на основе трипсина, иммобилизованного на матрице хитозана. *Биофармацевтический журнал* 2015; 7(2): 13-6.
- Ames B.N., McCann J., Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 1971; 347-64.
- Oda Y., Nakamura S., Oki I. et al. Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutat. Res.* 1985; 147: 219-29.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., editors. *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press; 1989.
- Закирова Е.Ю., Журавлева М.Н., Масгутов Р.Ф. и др. Выделение, анализ и применение аутогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани собаки для лечения ложного сустава большеберцовой кости. *Гены и Клетки* 2014; 9(3): 70-5.
- Miller J.H., editor. *Experiment in molecular genetics*. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press; 1972.
- Fedorova K., Kayumov A., Woyda K. et al. Transcription factor TnrA inhibits the biosynthetic activity of glutamine synthetase in *Bacillus subtilis*. *FEBS Lett.* 2013; 587: 1293-8.
- Liu K., Liu P.-C., Liu R. et al. Dual AO/EB Staining to Detect Apoptosis in Osteosarcoma Cells Compared with Flow Cytometry. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* 2015; 21: 15-20.
- Elchinger P.H., Delattre C., Faure S. et al. Immobilization of proteases on chitosan for the development of films with anti-biofilm properties. *Int. J. Biol. Macromol.* 2015; 72: 1063-8.
- Harris L.G., Nigam Y., Sawyer J. et al. *Lucilia sericata* chymotrypsin disrupts protein adhesion-mediated staphylococcal biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79: 1393-5.
- Миргазизов М.З., Миргазизов А.М., Миргазизов Р.М. и др. Способ адресной доставки остеопластических материалов, содержащих факторы роста и регенерации костной ткани. Патент РФ на изобр. №2469676. 31 мая 2011.
- Хафизов Р.Г., Миргазизов М.З., Гюнтер В.Э. и др. Пористая никелид-титановая мембрана для направленной тканевой регенерации. Патент РФ на полезную модель. №113147. 21 июня 2011.
- Langer V., Bhandari P.S., Mukherjee M.K. Enzymatic debridement of large burn wounds with papain-urea: Is it safe? *Medical Journal Armed Forces India* 2013; 69(2): 144-50.
- Sieggreen M., Maklebust J. Debridement: choices and challenges. *Adv. Wound Care.* 1997; 10: 32-7.
- Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2: 95-108.
- Percival S.L., Hill K.E., Williams D.W. et al. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound Repair Regen.* 2012; 20: 647-57.

Поступила: