

## ВПЛИВ ЛІПОПОЛІСАХАРИДІВ *PANTOEA AGGLOMERANS* НА АКТИВНІСТЬ ПРОТЕАЗ *BACILLUS*

Дзюблюк Н.А., Варбанець Л.Д., Булигіна Т.В.

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна  
e-mail: varbanets\_imv@ukr.net

**Метою** даної роботи було дослідження впливу ліпополісахаридів (ЛПС) ряду штамів *Pantoea agglomerans* на фібринолітичну, колагеназну та еластазну активності протеаз *Bacillus*. **Методи:** Еластазну активність визначали колориметрично, вимірюючи зміну інтенсивності забарвлення розчину при ферментативному гідролізі еластину. Для встановлення колагеназної активності вимірювали оптичну густину розчину після реакції продуктів розщеплення колагену із нінгідринним реактивом. Фібринолітичну активність ідентифікували за утворенням продуктів розщеплення фібрину. **Результати та висновки:** Отримані результати показали, що найбільш активними виявилися ЛПС двох штамів *P. agglomerans*: 8674 та П324. ЛПС *P. agglomerans* 8674 підвищував фібринолітичну активність пептидази 1 *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 майже в 4 рази, еластолітичну пептидази 1 *B. thuringiensis* ІМВ В-7465 – в 2 рази, а колагеназну активність пептидази 2 *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 – в 1.5 рази. ЛПС *P. agglomerans* П324 проявив більш вузький спектр стимулюючої дії на пептидазну активність: він більш, ніж в 4 рази підвищував фібринолітичну активність пептидази 1 *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 і в 3 рази – пептидази 2 *Bacillus* sp. ПЗ. Подальші дослідження будуть спрямовані на з'ясування деяких механізмів дії ЛПС грамнегативних бактерій на пептидазну активність бацил.

**Ключові слова:** пептидази з фібринолітичною, колагеназною та еластазною активностями, *Bacillus*, ліпополісахариди, *Pantoea agglomerans*.

Селективний внутрішньоклітинний протеоліз є важливим механізмом контролю якості функціональних білків, а також підтримки їх на такому рівні, який необхідний клітині. Як у прокариот, так і у еукариот цей процес здійснюють високомолекулярні пептидази (КФ 3.4), які представляють найбільшу групу промислових ензимів і застосовуються в різних галузях промисловості і медицини. Так, в світовій літературі накопичилося багато робіт щодо біохімії, фармакології та терапевтичного використання протеолітичних ферментів в різних галузях медицини. Терапія за допомогою протеаз, біологічно активних речовин, які властиві самому організму, дуже широко використовується на сьогодні для лікування різних захворювань, зокрема, при окремих ураженнях підшлункової залози, печінки та травного тракту, викликаних порушенням синтезу цих ферментів. Відомо [1], що протеолітичні ферменти різної специфічної дії підсилюють природні біологічні механізми організму людини і допомагають елементам захисної системи організму більш активно видаляти продукти запальної реакції й інші речовини, які накопичуються у разі виникнення патологічних станів. Представники роду *Bacillus* є продуцентами проте-

аз, що входять до складу пробіотичних препаратів, які вживає людина, а *Pantoea agglomerans* – фітопатогенний вид, представники якого разом з рослинною їжею або кормами постійно потрапляють в організм людини або сільськогосподарських тварин, відповідно, синтезують ліпополісахариди (ЛПС). Тому дуже важливо знати, як протеази та ЛПС можуть взаємодіяти між собою.

Відомо [2, 3], що як ЛПС грамнегативних бактерій, так і протеази є одними з чинників мікробної агресії. Протеази забезпечують протеолітичне руйнування антимікробних факторів білкової природи (імуноглобулінів, лізоциму та ін.), а ЛПС, підвищуючи проникливість бар'єрів, їх транслокацію та знижуючи антимікробний потенціал, ймовірно, активують саме цей механізм інфекційного процесу. ЛПС і протеази є важливими факторами ініціації та розвитку захворювань пародонту людини [4]. За даними літератури [5] відомо, що на поверхні грамнегативних бактерій протеаза С активується саме під час взаємодії з ЛПС. Дослідження *in vitro* клітин крові одиночної асцидії *Ciona intestinalis* виявили здатність ЛПС індукувати протеолітичну активність [6]. Питання впливу ЛПС на активність протеаз грамполозитивних і негативних бактерій в світі майже не вивчено. Kramer R.A. та ін. [7] вперше встановили, що для активації інтегральної протеази OmpT зовнішньої мембрани *Escherichia coli* потрібний ліпополісахарид. Оскільки взаємодія різних мікроорганізмів між собою здійснюється постійно, то й вплив їх структур один на одного також може відбуватися. Тому метою даної роботи було вивчення впливу ліпополісахаридів *P. agglomerans*, які різняться за своїм складом та деякими видами біологічної активності, на ензиматичну активність протеаз бацил.

**Матеріали і методи.** Основним об'єктом досліджень були штами бактерій роду *Bacillus*: *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 [8] (отриманий шляхом хімічного мутагенезу [9]), *B. thuringiensis* var. *israelensis* ІМВ В-7465 [10] (виділений з Чорного моря в акваторії о. Зміїний і люб'язно наданий нам співробітниками кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету ім. І.І. Мечникова) і *Bacillus* sp. ПЗ (виділений з перифітону вольєрів з дельфінами в науково-дослідному центрі Збройних Сил України «Державний океанаріум»).

Для синтезу позаклітинних протеаз штами бацил культивували на рідкому поживному середовищі [11] такого складу (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1.6;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.75;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.25;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0.5; мальтоза – 1.0; желатин – 10.0; дріжджовий автолізат – 0.15; рН – 6.5-6.7. Культуру вирощували протягом 24 год у колбах Ерленмейера на качалках при 250 об/хв, за температури 28°C. Інокулом вирощували на відповідному середовищі упродовж 24 год, потім засівали в колби у кількості  $10^5$ - $10^6$  КУО/мл.

Протеази виділяли з супернатанту, отриманого центрифугуванням культуральної рідини при 5000 г впродовж 30 хв, осадженням сульфатом амонію 90% насичення (для *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 та *Bacillus* sp. ПЗ) і 60% насичення (для *B. thuringiensis* var. *israelensis* ІМВ В-7465). Осад збирали центрифугуванням при 5000 г, 30 хв, розчиняли в 0.01 М Трис-НСІ буфері (рН 7.5) та наносили на колонку (2.5×40 см) з аніонообмінником TSK DEAE 650 (M) (“Toyosoda”, Японія). Елюцію проводили 0.01 М Трис-НСІ буфером (рН 7.5) в градієнті хлориду натрію від

0 до 1 М зі швидкістю 0.5 мл/хв. Протеїнові фракції, які проявляли колагеназну, фібринолітичну і еластазну активності, відбирали, об'єднували та наносили на колонку (1.8×40 см) з нейтральним TSK-гелем – Toyopearl HW-55 (“Toyo Soda”, Японія). Елюцію проводили тим же буфером зі швидкістю витікання 0.85 мл/хв. Ступінь очищення ензимних препаратів характеризували за показниками питомої еластолітичної, фібринолітичної і колагеназної активності (од·мг протеїну<sup>-1</sup>).

На всіх етапах дослідження вміст протеїну реєстрували на спектрофотометрі СФ-26 при 280 нм. Кількість його визначали за методом Lowry та ін [12].

Під час вивчення колагеназної активності [13] інкубаційну суміш, яка містила 10 мг колагену, 2.5 мл 0.01 М Трис-НСІ буфера (рН 9.0-10.0) і 1 мл досліджуваного препарату, витримували на водяній бані 3 год за температури 37°C. Після цього реакційну суміш центрифугували при 10 000 g, 5 хв і 0.1 мл надосадової рідини переносили в пробірки, які містили 0.5 мл 4% розчину нінгідрину в ацетоні та рівний об'єм 0.2 М цитратного буфера. Інкубування проводили 20 хв на киплячій водяній бані, після чого в охолоджену суміш додавали 5 мл 50% розчину н-пропанолу і витримували 15 хв за кімнатної температури. Продукти розщеплення визначали на спектрофотометрі СФ-26 за довжини хвилі 600 нм. Зі стандартної кривої, побудованої для вільного L-лейцину, визначали еквівалентну кількість мкмолей, вивільнених в процесі гідролізу амінокислот. Одна одиниця активності еквівалентна 1 мкмолю L-лейцину, вивільненому з колагену за 3 год гідролізу за температури 37°C.

В основі методу визначення еластолітичної активності є колориметричне вимірювання інтенсивності забарвлення розчину, який містить конго-рот еластин як субстрат ензиму [14]. Інкубаційна суміш містила 2.5 мл 0.01 М Трис-НСІ буфера (рН 7.5), 5 мг еластину, забарвленого 0.002% розчином конго-рот, та 1 мл розчину ензиму. Суміш витримували протягом 3 год при 37 °С. Реакцію зупиняли, витримуючи пробірки з реакційною сумішшю на льодяній бані протягом 30 хв. Негідролізований еластин відділяли центрифугуванням при 10000g, 5 хв. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 за довжини хвилі 515 нм. За одиницю активності приймали таку кількість ензиму, яка каталізує гідроліз 1 мг еластину за 1 хв.

Фібринолітичну активність вимірювали методом Masada [15], як субстрат використовували фібрин, отриманий з плазми крові людини. Реакційна суміш містила 1 мг фібрину, 1.8 мл 0.01 М Tris-НСІ буфера (рН 7.5) при додаванні 0.005 М CaCl<sub>2</sub> і 0.2 мл розчину досліджуваного препарату. Інкубаційну суміш витримували 30 хв при 37°C. Утворення продуктів розщеплення визначали на спектрофотометрі СФ-26 при 275 нм. За одиницю фібринолітичної активності брали таку кількість ензиму, яка підвищує оптичну щільність реакційної суміші на 0.01 за 1 хв в умовах досліду.

Досліджували ЛПС, виділені із штамів *P. agglomerans* 7604, 8674, ПЗ24, 7969 із колекції відділу фітопатогенних бактерій ІМВ НАН України, ізольованих із жита (Київська обл., Україна), злаків (Канада), пшениці (Херсонська обл., Україна), яблуні (Мінськ, Білорусь) відповідно.

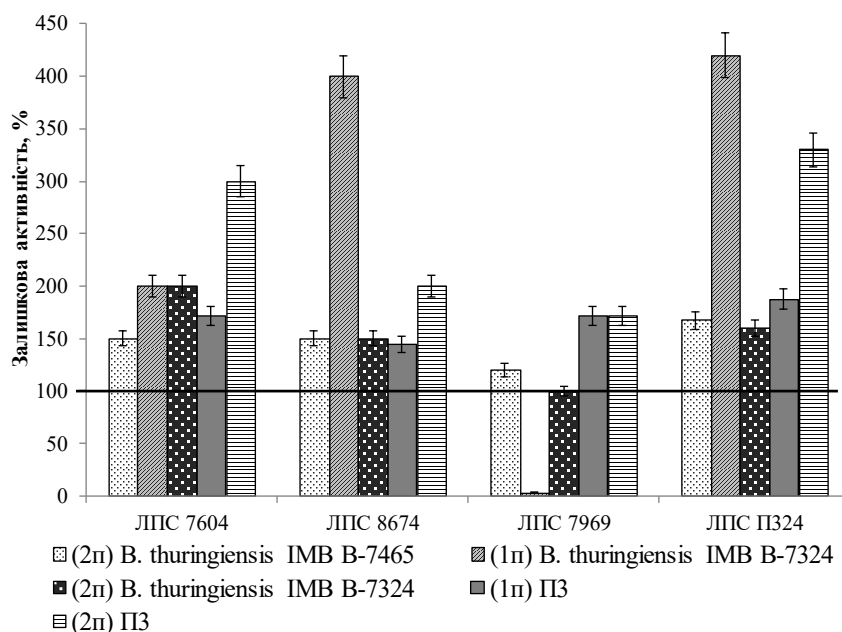
ЛПС екстрагували з висушених клітин 45% -м водним розчином фено-

лу за температури 65-68°C. Отримані водні фракції діалізували проти водопровідної, а потім дистильованої води для видалення фенолу [16]. ЛПС очищали від нуклеїнових кислот ультрацентрифуговуванням (104 000 g, 4 год), а також їх осадженням 50%-м розчином трихлороцтової кислоти.

Обробку протеаз штамів *Bacillus* ЛПС в кінцевій концентрації 0.01 % проводили протягом 60 хв за кімнатної температури.

Усі досліди проводили в 5 – 8 повторностях. Статистичну обробку експериментальних даних проводили з використанням критерію Ст'юдента (*t*) [17]. У роботі вираховували середні значення величин і стандартні похибки ( $M \pm m$ ). Обробку результатів, що подані графічно, здійснювали з використанням програми Microsoft Excel 2010. Значення при  $P < 0.05$  розглядали як достовірні [18].

**Результати.** Вивчення дії ЛПС бактерій на пептидази свідчить про можливість їх використання як активаторів, так і інгібіторів ензиматичної активності [19]. Показано (рис. 1), що більшість досліджуваних ЛПС проявляли стимулюючу дію на фібринолітичну активність пептидаз бацил, підвищуючи її на 20-320 %. Найбільший активуючий вплив мали ЛПС *P. agglomerans* 8674 та ПЗ24 на пептидазу 1 *B. thuringiensis* IMB B-7324, а також ЛПС *P. agglomerans* 7604 та ПЗ24 на пептидазу 2 *Bacillus* sp. ПЗ. Однак водночас було виявлено інгібуєчий ефект всіх досліджуваних ЛПС на фібринолітичну активність пептидази 1 *B. thuringiensis* IMB B-7465. Крім того, ЛПС *P. agglomerans* 7969 повністю інгібував фібринолітичну активність пептидази 1 *B. thuringiensis* IMB B-7324 і не впливав на пептидазу 2.



**Рис. 1.** Вплив ЛПС *P. agglomerans* на фібринолітичну активність протеаз *Bacillus*

При дослідженні впливу ЛПС *P. agglomerans* на еластолітичну активність протеаз бацил було встановлено (рис. 2), що всі ЛПС повністю інгібували протеазу 2 *B. thuringiensis* IMB B-7324. Водночас повне інгі-

бування еластолітичної активності пептидази 2 *Bacillus* sp. ПЗ і пептидази 1 *B. thuringiensis* IMB B-7324 відбувалося за умови їх інкубування з ЛПС *P. agglomerans* 7604, 8674 і *P. agglomerans* 7604 відповідно. Крім того, було виявлено часткове інгібування пептидази 1 *B. thuringiensis* IMB B-7465 ЛПС штамів 7604 та ПЗ24 (на 20 та 37.5% відповідно), пептидази 1 *B. thuringiensis* IMB B-7324 ЛПС *P. agglomerans* 7969 (на 33.3%) та пептидази 2 *Bacillus* sp. ПЗ ЛПС штаму ПЗ24 (на 50%). З іншого боку, був відмічений достатньо високий (майже на 100%) стимулюючий ефект ЛПС *P. agglomerans* 8674 на еластолітичну активність пептидази 1 *B. thuringiensis* IMB B-7465. Цікавим виявився той факт, що ЛПС *P. agglomerans* 7604, 7969, ПЗ24 підвищували активність пептидази 2 *B. thuringiensis* IMB B-7465 (на 9.5-53%), штамів 8674, 7969, ПЗ24 – пептидази 1 *Bacillus* sp. ПЗ (10-40%), а ЛПС *P. agglomerans* 8674 та 7604 не впливали на ці пептидази відповідно. Також ЛПС *P. agglomerans* 7969 підвищував еластолітичну активність пептидази 2 *Bacillus* sp. ПЗ та пептидази 1 *B. thuringiensis* IMB B-7465 на 33.3 та 50% відповідно.

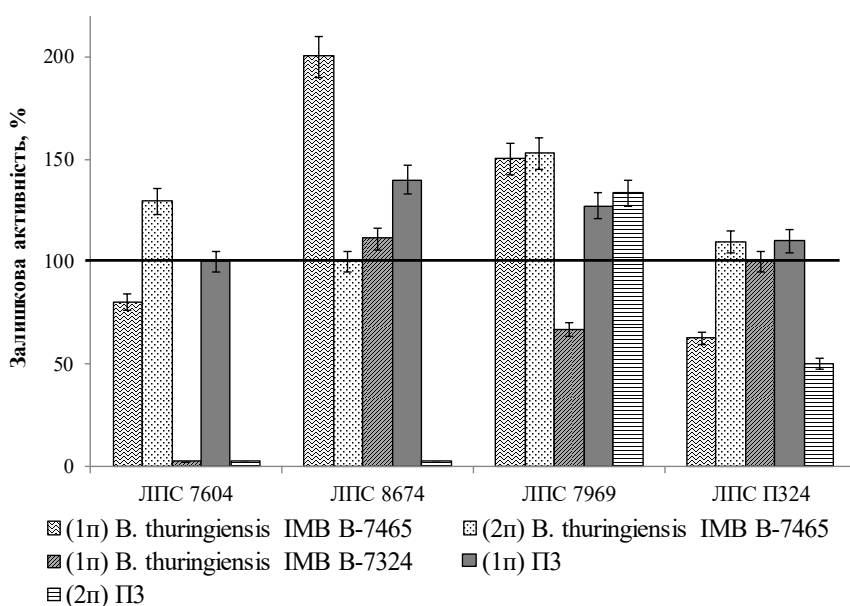


Рис. 2. Вплив ЛПС *P. agglomerans* на еластолітичну активність протеаз *Bacillus*

Дія ЛПС на колагеназну активність досліджуваних протеаз носила менш виражений характер (рис. 3) у порівнянні з іншими активностями. Було показано стимулюючий ефект на протеазу 2 *B. thuringiensis* IMB B-7324 ЛПС *P. agglomerans* 8674 (найбільша стимуляція активності – на 51%) та 7969 (на 30%), протеазу 1 *B. thuringiensis* IMB B-7324 ЛПС *P. agglomerans* 7604 (на 20%) та протеазу 1 *Bacillus* sp. ПЗ ЛПС штаму 7969 (на 30%). Також було відмічено, що всі ЛПС майже в однаковій мірі (на 16.7-26.5%) стимулювали колагеназну активність протеази 2 *B. thuringiensis* IMB B-7465.

Поряд з цим, ЛПС *P. agglomerans* 7604 та ПЗ24 інгібували колагеназну активність протеази 2 *B. thuringiensis* IMB B-7324 на 24 та 13.6% відповідно. Крім того, ЛПС *P. agglomerans* 7604 також інгібував колагеназну активність протеаз 1 та 2 *Bacillus* sp. ПЗ на 6 та 45% відповідно.

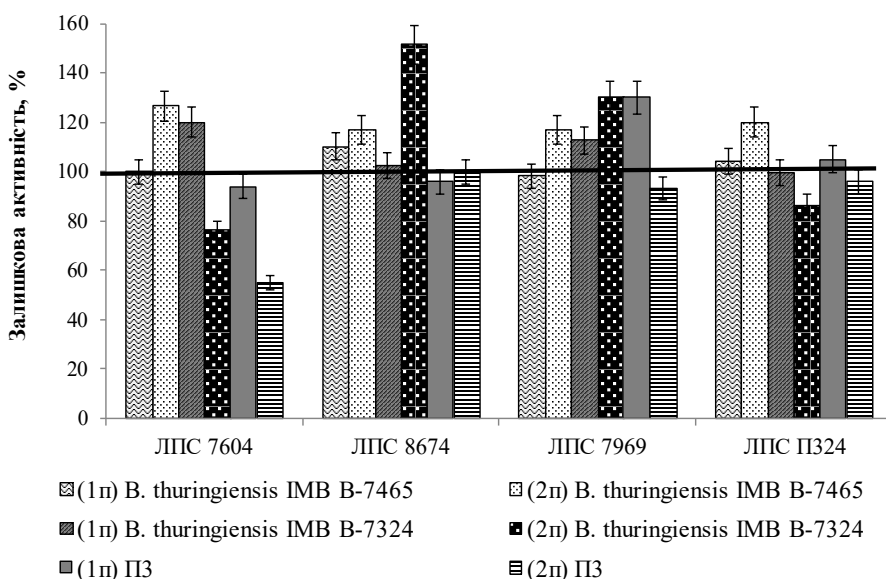


Рис. 3. Вплив ЛПС *P. agglomerans* на колагеназну активність протеаз *Bacillus*

Таким чином, аналізуючи одержані результати, ми встановили, що дія ЛПС на досліджувані види активності пептидаз, одержаних із різних штамів бацил, була дуже різноманітною. Тому на сьогодні ми ще не можемо встановити певні кореляційні взаємозв'язки між складом (моносахаридним та жирнокислотним), який був досліджений нами раніше [20], або штамом, з якого виділені ЛПС, та характером їх впливу на пептидазні активності бацил.

**Обговорення.** Оскільки ЛПС грамнегативних бактерій є одним із важливих факторів патогенності бактерій, їх вплив на різні види біологічної активності полімерів є необхідним для розуміння механізмів втручання в ці активності. Відомо, що протеолітична активність є дуже важливою для життєдіяльності як про-, так і еукаріотів. У еукаріотів вона бере участь у процесах переходу ензимів з неактивного стану (зимоген) в активний фермент. Основною функцією позаклітинних пептидаз прокаріотів є розщеплення білків, які містяться в навколишньому середовищі, і перетворення їх в форму, яка здатна легко проникати в клітину. Серед позаклітинних пептидаз мікроорганізмів особливе місце посідають ензими, які здатні розщеплювати нерозчинні або важкорозчинні білки, – колаген та еластин. Відомо [2], що незначні зміни в структурі активного центру ензимів впливають на їх стабільність і функціональну активність. Оскільки як в організмі людини, так і об'єктах навколишнього середовища і ЛПС, і протеази взаємодіють між собою, актуальним є виявлення результатів такої взаємодії. Наявні в літературі дані дуже фрагментарні і, головним чином, присвячені вивченню дії ЛПС на активацію плазміногену в організмі людини або одержанню ензиматично активної протеази *E. coli*, зокрема, Омр Т протеїнів за участю ЛПС. Автори [7] показали, що зв'язування ЛПС з протеїном призводить до його конформаційних змін, які є необхідними для одержання активної форми протеази. Це єдиний фермент, для активності якого встановлена необхідність ЛПС.

Тому актуальними є одержані нами результати щодо впливу ЛПС ряду штамів фітопатогенного виду *P. agglomerans* на активність пептидаз *Bacillus* з фібринолітичною, еластазною і колагеназною активностями. Найбільш активними виявилися ЛПС двох штамів *P. agglomerans* 8674 та ПЗ24. Так, ЛПС *P. agglomerans* 8674 підвищував фібринолітичну активність пептидази 1 *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 майже в 4 рази, еластолітичну пептидази 1 *B. thuringiensis* ІМВ В-7465 – в 2 рази та колагеназну активність пептидази 2 *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 – в 1.5 рази. ЛПС *P. agglomerans* ПЗ24 проявив більш вузький спектр стимулюючої дії на пептидазну активність. Він більш, ніж в 4 рази підвищував фібринолітичну активність пептидази 1 *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 і в 3 рази – пептидази 2 *Bacillus* sp. ПЗ. Відносно впливу ЛПС *P. agglomerans* 7969 та 7604 він був менш вираженим, за винятком повного інгібування ЛПС 7969 еластолітичної активності пептидази 2 *B. thuringiensis* ІМВ В-7324, фібринолітичної активності пептидаз 1 *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 та *B. thuringiensis* ІМВ В-7465, а ЛПС 7604 – еластолітичної активності пептидаз 1 і 2 *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 та пептидази 2 *Bacillus* sp. ПЗ. Поряд з тим, ЛПС *P. agglomerans* 7604 майже в 3 рази підвищував фібринолітичну активність пептидази 2 *Bacillus* sp. ПЗ.

На основі одержаних результатів подальші дослідження будуть спрямовані на з'ясування деяких механізмів дії ЛПС грамнегативних бактерій на пептидазну активність бацил, оскільки в літературі є вкрай обмежені дані.

Автори висловлюють подяку співробітникам відділу фітопатогенних бактерій ІМВ НАН України (докт. біол. наук, с.н.с. Л.А. Пасічник та пров. інж. Н.В. Житкевич), зав. кафедрою мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету ім. І.І. Мечникова проф. В.О. Іваниці, канд. біол. наук Науково-дослідного центру Збройних Сил України «Державний океанаріум» Н.О. Андреевій.

## ВЛИЯНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *PANTOEA AGGLOMERANS* НА АКТИВНОСТЬ ПРОТЕАЗЫ *BACILLUS*

*Дзюблюк Н.А., Варбанец Л.Д., Булыгина Т.В.*

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина*

### Резюме

**Целью** настоящей работы было исследование влияния липополисахаридов (ЛПС) ряда штаммов вида *Pantoea agglomerans* на фибринолитическую, колагеназную и эластазную активности протеаз *Bacillus*. **Методы:** Эластазную активность определяли колориметрически, измеряя изменение интенсивности окраски раствора при ферментативном гидролизе эластина. Для установления колагеназной активности измеряли оптическую плотность раствора после реакции продуктов расщепления коллагена с нингидриновым реактивом. Фибринолитическую активность идентифицировали по образованию продуктов расщепления фибрина. **Результаты и выводы:** Полученные результаты показали, что наиболее активными оказались ЛПС двух штаммов *P. agglomerans*: 8674 и ПЗ24. ЛПС *P. agglomerans* 8674 повышал фибрино-

литическую активность пептидазы 1 *B. thuringiensis* ИМВ В-7324 почти в 4 раза, эластолитическую пептидазы 1 *B. thuringiensis* ИМВ В-7465 – в 2 раза, а коллагеназную активность пептидазы 2 *B. thuringiensis* ИМВ В-7324 – в 1.5 раза. ЛПС *P. agglomerans* П324 проявил более узкий спектр стимулирующего действия на пептидазную активность: он более, чем в 4 раза повышал фибринолитическую активность пептидазы 1 *B. thuringiensis* ИМВ В-7324 и в 3 раза – пептидазы 2 *Bacillus sp.* П3. Дальнейшие исследования будут направлены на выяснение некоторых механизмов действия ЛПС грамотрицательных бактерий на пептидазную активность бацилл.

*Ключевые слова:* пептидазы с фибринолитической, коллагеназной и эластазной активностями, *Bacillus*, липополисахариды, *Pantoea agglomerans*.

## INFLUENCE OF *PANTOEA AGGLOMERANS* LIPOPOLISACCHARIDES ON THE ACTIVITY OF *BACILLUS* PROTEASES

*Dziubliuk N.A., Varbanets L.D., Bulyhina T.V.*

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine,  
154 Zabolotnogo str, Kyiv, 03143, Ukraine*

### Summary

**The aim** of this work was to investigate the influence of lipopolysaccharides (LPS) of a number of strains of the species *Pantoea agglomerans* on fibrinolytic, collagenase and elastase activity of *Bacillus* proteases. **Methods:** Elastase activity was determined colorimetrically by measuring of the change in the color intensity of the solution during enzymatic hydrolysis of elastin. To establish the collagenase activity the optical density of the solution was measured after the reaction of the collagen cleavage products with the ninhydrin reagent. Fibrinolytic activity was identified after the formation of fibrin cleavage products. **Results and conclusions:** The results obtained showed that the most active were LPS of two strains of *P. agglomerans*: 8674 and P324. LPS of *P. agglomerans* 8674 increased the fibrinolytic activity of peptidase 1 of *B. thuringiensis* IMV B-7324 by about 4 times, the elastolytic activity of *B. thuringiensis* IMV B-7465 peptidase 1 was doubled, and the collagenase activity of *B. thuringiensis* IMV B-7324 peptidase 2 was increased by 1.5 times. Whereas, *P. agglomerans* P324 LPS showed a narrower spectrum of stimulating effect on peptidase activity: it increased the fibrinolytic activity of peptidase 1 *B. thuringiensis* IMV B-7324 and 3 times peptidase 2 *Bacillus sp.* P3. Further research will be aimed on elucidation of some mechanisms of the action of gram-negative bacteria LPS on the activity of bacilli.

*Keywords:* peptidase, fibrinolytic, collagen and elastase activity, *Bacillus*, lipopolysaccharides, *Pantoea agglomerans*.

1. Varbanets LD, Matselukh OV. [Proteolytic enzymes of microorganisms and methods of their investigations]. Kyiv: 2008; 108 s. Ukrainian.
2. Novak VL, Oborin OM. [Endogenous intoxication syndrome, sepsis and multiple organ failure: pathophysiological and clinical aspects of the problem (literature review)]. Z. AMN Ukraine. 2009; 15(2):263-275. Ukrainian.



3. Dem'yanenko SA, Romanenko IG, Levitskii AP. [The influence of intestinal endotoxine on the level of biochemical markers of inflammation in mucous membrane of oral cavity in rats]. *Visnik stomatologii*. 2010; 3:3-6. Ukrainian.
4. Ekuni D, Yamamoto T, Yamanaka R, Tachibana K, Watanabe T. Proteases augment the effects of lipopolysaccharide in rat gingiva. *J Periodont Res*. 2003; 38(6):591–596.
5. Tagawa K, Yoshihara T, Shibata T, Kitazaki K, Endo Y, Fujita T, Koshiba T, Kawabata S. Microbe-specific C3b deposition in the horseshoe crab complement system in a C2/factor B-dependent or -independent manner. *PLoS One*. 2012;7(5): e36783. doi: 10.1371/journal.pone.0036783.
6. Jackson AD, Smith VJ. LPS-sensitive protease activity in the cells of the solitary ascidian, *Ciona intestinalis* (L). *Comp. Biochem. Physiol*. 1993; 106B(3):505-512.
7. Kramer RA, Brandenburg K, Vandeputte-Rutten L, Werkhoven M, Gros P, Dekker N, Egmond MR. Lipopolysaccharide regions involved in the activation of *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT. *Eur. J. Biochem*. 2002; 269:1746–1752.
8. Matselyukh OV, Varbanets' LD, Ivanitsa VO. Pat. 97906 Ukraina, MPK C 12N 1/20. [Strain *Bacillus thuringiensis* IMV B-7324 – producer of extracellular elastase] – UA 97906 C2; Publ. 26.03.2012. Byul. N6. Ukrainian.
9. Matselyukh OV. [Obtaining of mutants of *Bacillus* sp. with enhances elastase production]. *Biotekhnologiya*. 2010; 3(2):42-47. Ukrainian.
10. Nidialkova N.A., Varbanets L.D., Ivanitsa V.O. Pat. 96195UA. [Bacterial strain of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*– producer of the extracellular collagenase]. Publ. 26.01.2015, Byul. N2. Ukrainian.
11. Koltukova NV, Vaskivniuk VT. [Selection of methods for the isolation of the proteolytic complex from *Bacillus mesentericus* 316m at deep cultivation]. *Microbiol Z*. 1980; 42(2):245-248. Ukrainian.
12. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193(1):265-275.
13. Mandl I. Collagenase. *Science*. 1970; 169(3951):1234-1238.
14. Trombridg GO, Moon HD. Purification of human elastase. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1972; 141(3):928-931.
15. Masada M. Determination of the thrombolytic activity of Natto extract. *Food style*. 2004; 8(1):92-95.
16. Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharide – extraction with phenol. *Methods Carbohydr Chem*. 1965; 5:83-91.
17. Lakin GF. [Biometry]. M.: Vysshaya Shkola. 1990. 352 s. Russian.
18. Lapatch SN, Tchubenko AV, Babitch PH. [Statistical methods in biomedical research using “Excel”]. K.: Morion. 2001; 408 s. Ukrainian.
19. Dentovskaya SV, Platonov ME, Bakhteeva IV, Anisimov AP. [Presence of the full lipopolysaccharide core structure is necessary for activation of plasminogen by *Yersinia pestis*]. *Mikrobiol Problemy osobo opasnykh infektsyi*. 2007; 93:49-51. Russian.
20. Varbanets LD, Brovarskaya OS, Bulyhina TN, Garkavaya EG, Zhitkevich NV. Characterisation of *Pantoea agglomerans* lipopolysaccharide. *Microbiology*. 2014; 83(6):754-763.

Отримана 17.05.2017