

Институт молекулярной медицины  
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России  
(Сеченовский университет)  
Московская школа на Юго-Западе № 1543  
Кафедра биологии

**Оценка антиадгезивных свойств протеолитического фермента  
бромелаина при взаимодействии бактериального штамма  
*E. coli* с клеточными линиями CaCo2 и HaCaT**

И. Ермаков  
В. Омеляненко

Научный руководитель: к.х.н. Л.Н. Икрянникова  
Научный консультант: д.б.н. А.А. Замятнин

Москва 2019

## Содержание

1.	Введение	2
2.	Обзор литературы	4
3.	Материалы и методы	10
3.1.	Электрофорез	10
3.2.	Культивирование бактерий	11
3.3.	Культивирование эукариотических клеток	11
3.4.	Диско-диффузионный метод	12
3.5.	Оценка МИК бромелаина	12
3.6.	Окраска эукариотических клеток	13
3.7.	Оценка протеолитической активности бромелаина	13
3.8.	Оценка адгезии штамма <i>E. coli</i> DH5α к эукариотическим клеткам методом рассева	14
3.9.	Оценка адгезии GFP-продуцирующего штамма <i>E. coli</i> DH5α рBCEG1 к эукариотическим клеткам с использованием спектрофотометрического метода	15
4.	Результаты и обсуждение	16
4.1.	Состав водорастворимой белковой фракции препарата бромелаина по результатам электрофоретического разделения в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (SDS-PAAG)	16
4.2.	Оценка протеолитической активности препаратов бромелаина различных производителей в реакции расщепления флуорогенного пептидного субстрата PLVQ-AMC.	17
4.3.	Исследование влияния бромелаина на рост штамма <i>E. coli</i> DH5α	19
4.4.	Оценка МИК водного раствора бромелаина по отношению к <i>E. coli</i> (штамм DH5α).	20
4.5.	Отработка методики окраски и микроскопической визуализации адгезии бактериальных клеток к эукариотической культуре.	21

4.6.	Отработка методики оценки адгезии штамма <i>E. coli</i> DH5а к эукариотическим клеткам методом посева.	23
4.7.	Отработка методики оценки адгезии GFP-продуцирующего штамма <i>E. coli</i> DH5а рBCEG1 к эукариотическим клеткам с использованием спектрофотометрических методов.	24
5.	Выводы	27
6.	Благодарности	28
7.	Список литературы	29

## 1. Введение

Данная работа выполнялась в рамках научно-исследовательского проекта «Уточнение механизма взаимодействия фермента бромелаина с микрофлорой полости рта человека».

Бромелаин - цистеиновая протеаза растительного происхождения, добываемая из растений семейства бромелиевых, из которых наиболее распространён *Ananas comosus*.

Широко известны его противоопухолевое и антитромботическое действие, доказана эффективность применения бромелаина для заживления ран и предотвращения воспаления. Также выявлена его антибактериальная активность в области различных микроорганизмов, в частности, против микроорганизмов, обитающих в ротовой полости, что сделало возможным использование этого фермента в производстве некоторых зубных паст, например, производимых компанией R.O.C.S.

В последние годы популярность использования бромелаина, как и других растительных пептидаз, в медицине растёт, так как эти ферменты имеют самый разнообразный спектр действия, обладая при этом низкой цитотоксичностью и возможностью работы в широком диапазоне pH (от 4,5 до 9,5) и температур (20 - 60 °C).

Несмотря на значительный интерес к этому ферменту, механизм взаимодействия бромелаина с микроорганизмами так до конца и не прояснен. Высказывались

предположения, что помимо протеолитических свойств, один из компонентов смеси называемой бромелаином также обладает способностью уменьшать или полностью предотвращать адгезию бактериальных клеток на поверхностях полости рта. Однако по этому вопросу достаточно мало информации. **Целью** настоящего исследования являлась оценка антиадгезивных свойств протеолитического фермента бромелаина в модельной системе бромелаин – микроорганизм – культура эукариотических клеток.

Были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследовать состав водорастворимой белковой фракции препарата бромелаина фирмы Merck.
2. Измерить протеолитическую активность препарата бромелаина
3. Исследовать влияние бромелаина на рост бактериального штамма *E. coli* DH5 $\alpha$ .
4. Отработать методику микроскопической визуализации комплекса бактериальные клетки – эукариотические клетки.
5. Оценить влияние бромелаина на адгезию бактериальных клеток к эукариотическим в модельной системе бромелаин – микроорганизм – культура эукариотических клеток.

## 2. Литературный обзор.

Бромелаин – это смесь ферментов, получаемая из всех частей ананаса после их обработки. Обычно ее получают из стебля растения вида *Ananas comosus*. Сейчас бромелаин разделяют на два типа смесей ферментов: ферменты из сока стебля – стеблевой бромелаин и ферменты из плода – плодовой бромелаин.<sup>1</sup> Впервые бромелаин был описан венецианским химиком Винсенте Маркано после ферментации плода ананаса в 1891 году.

Молекулярный вес чистого стеблевого бромелаина – 23.8 КДа,<sup>2</sup> его изоэлектрическая точка равна 9.55 рН,<sup>3</sup> скорость седиментации – 2.73 S, коэффициент диффузии -  $7.77 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ , максимум абсорбции наблюдается на длине волны равной 2788, а минимум на длине 2503.<sup>4</sup> Бромелаин выглядит как порошок кремового цвета.

Фруктовый бромелаин, в отличие от стеблевого – кислый протеин,<sup>5</sup> его изоэлектрическая точка равна 4.6 рН.<sup>6</sup> Его точный вес пока не установлен, так как при измерении с помощью эксклюзионной хроматографии в Sephadex G-75 он равен 18 КДа, а при электрофорезе в полиакриламидном геле он равен 31 КДа.<sup>6</sup> Также в нем присутствуют углеводы, которые невозможно удалить при очистке.

Важным свойством вещества является его стабильность. Активность большинства ферментов при температуре выше 65 °С падает.<sup>7</sup> Бромелаин, с другой стороны довольно устойчив при высоких температурах вплоть до 60°С, так как при этой температуре протекает производство ананасового сока, в котором присутствует большое количество стабильного фермента.<sup>8</sup> На стабильность бромелаина очень сильно влияет кислотность среды.<sup>3</sup> При рН 7.0 гликолизированный бромелаин проявляет максимум активности при температуре 30°С, при 30-60°С активность понижается на 17%. При рН 7 – 9 оптимальная температура находится в районе 40°С. Но при рН 3.0 температура максимума активности понижается. Негликолизированная форма бромелаина еще более чувствительна к изменениям кислотности среды.<sup>9</sup> При нагревании до 70°С или выше происходит полная денатурация бромелаина.<sup>10</sup>

По аминокислотной последовательности понятно, что бромелаин принадлежит к семье папаиновых протеаз. Стеблевой бромелаин содержит метиониновый остаток и только один гистидиновый остаток, а папаин содержит два гистидиновых остатка.<sup>6</sup> Стеблевой бромелаин также содержит свободную сульфгидрильную группу, которая важна для каталитической активности.<sup>6</sup> С другой стороны у бромелаина широкий спектр

ферментативной активности в пределах рН 5.5-8.0. Более активно бромелаин расщепляет пептидные связи глицина, аланина и лейцина. Стеблевой бромелаин состоит из одной полипептидной цепи длиной 211 или 212 аминокислот. Одна олигосахаридная цепь прикреплена к полипептиду.<sup>2</sup> Ананаин и фруктовый бромелаин с точки зрения специфичности гидролиза амидных связей являются типичными представителями семейства папаинов, а стеблевой бромелаин от них отличается.<sup>11</sup> Обратимое ингибирование бромелаина происходит при его реакции с неорганической, органической ртутью, тетрационатом.<sup>12</sup> Необратимое ингибирование бромелаина вызывают N-Этилмалеимидом, N-(4-диметил-3,5-динитрофенил) малеимидом, монойодуксусной кислотой и 1,3-дибром ацетоном, они алкилируют сульфгидрильную группу.<sup>12</sup> Производные хлорметил ацетона тоже алкилируют сульфгидрильную группу. Частичная потеря ферментативной активности проявляется при окислении в присутствии метиленового синего.

Бромелаин всасывается в тонком кишечнике, где образует комплекс с анти-протеазами, преимущественно с  $\alpha 2$ -макроглобулином и  $\alpha 1$ -трипсином.  $\alpha 2$ -макроглобулин уменьшает протеолитическую активность бромелаина, но не убирает ее полностью.<sup>13</sup> Возможно, что бромелаин может проходить сквозь неповрежденную слизистую оболочку.

Но то, что обычно называют бромелаином – это грубый экстракт, состоящий из нескольких протеолитических ферментов, фосфотаз, пероксидаз, целлюлаз.<sup>6</sup> Также в этом экстракте содержится 2 компонента с одинаковой протеолитической активностью и молекулярные свойства.<sup>6</sup> Разделить эти два компонента можно по их электрофоретической мобильности.

Чтобы получить «чистый» бромелаин нужно коммерческий бромелаин подвергнуть многоступенчатой очистке. Стеблевой бромелаин очищают в 6 стадий. Все стадии очистки, кроме начальной экстракции фермента проводятся при температуре холодной комнаты.<sup>12</sup> Фруктовый бромелаин очищают в 2 стадии.<sup>12</sup>

Так как бромелаин – цистеиновая протеаза, его эффекты основаны на его протеолитическом действии, например ингибирование агрегации тромбоцитов или противовоспалительное действие. У всех цистеиновых протеаз сходный механизм работы, в основе которого лежат три аминокислотных остатка: Cys25, His159, Asn175. Тиолат-анион цистеина и аммоний-катион гистидина образуют ионную пару. При взаимодействии с субстратом тиолат-анион атакует карбонильный атом углерода разрываемой пептидной связи. Образуется тетраэдрическое производное, где оксианион стабилизируют

водородные связи с иминогруппой NH Cys25 и аминогруппой NH<sub>2</sub> боковой цепи Gln19. После происходит ацилирование производного с образованием пептида и тиоэфира. Тиоэфир гидролизуется до ацилфермента, который деацилируется с образованием пептида и активной формы бромелаина.

С другой стороны, некоторые эффекты бромелаина, такие как ингибирование роста клеток опухоли и метастаз или очистка ожоговой поверхности связаны с другими непротеолитическими компонентами бромелаина.

Противоотечное действие: Бромелаин обладает, как уменьшающим отек действием, так и предотвращающим отек. Бромелаин в экспериментальных моделях на животных показывал уменьшение отека на 41-45%.<sup>14</sup> К тому же бромелаин показал более сильную эффективность, чем некоторые противовоспалительные препараты, в защите от отеков.<sup>15</sup> В животных моделях бромелаин проявлял противоотечное действие и при пероральном, и при внутрибрюшинном введении.<sup>16</sup> Заключено, что бромелаин повышает проницаемость ткани с помощью фибринолиза, что приводит к реабсорбции отечной жидкости в кровь. Бромелаин показывает более длительно противоотечное действие после приема перорально (следующие 12 часов), чем после внутрибрюшинной инъекции (первые часы после введения).<sup>15</sup>

Также бромелаин повышает абсорбцию антибиотиков групп тетрациклинов и пенициллинов после перорального приема, благодаря увеличению проницаемости ткани. Увеличивает диффузию после подкожного и внутримышечного введения антибиотиков.<sup>17,18</sup>

Бромелаин влияет на процесс свертывания крови. Он увеличивает протромбиновое время и частичное тромбопластиновое время (тесты на свертываемость крови),<sup>19</sup> понижает уровень фибриногена в крови. В животных моделях бромелаин повышал фибринолитическую активность<sup>20</sup> и понижал АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов.<sup>19</sup> Все эти эффекты зависели от дозы бромелаина и были связаны с его протеолитической активностью.<sup>21</sup> При инактивации фермента эти эффекты исчезали. При инкубировании тромбоцитов с бромелаином перед их активацией тромбином, агрегация тромбоцитов не начиналась даже после добавления тромбина.<sup>22</sup> *In vitro* бромелаин мог активировать плазминоген, что приводит к образованию плазмина, который расщепляет фибрин.<sup>23</sup> По этому свойству бромелаин схож со стрептокиназой. Также *in vitro*

бромелаин ингибировал тромбин-индуцированное образование фибрина. Но бромелаин, в отличие от стрептокиназы не может растворять фибриновые сгустки. Папаин на процесс свертывания крови влияет меньше, чем бромелаин.

Важно, что бромелаин после связывания с  $\alpha$ 2-макроглобулином в крови не полностью инактивируется и сохраняет возможность гидролизировать субстраты в малых количествах.<sup>24</sup>

Эксперименты на животных показали, что инъекции бромелаин понижает уровень плазмокининов,<sup>25</sup> брадикинина в центрах воспаления и прекалликреина в крови.<sup>26</sup> Пероральный прием бромелаина уменьшает количество простагландина E<sub>2</sub> и тромбосана B<sub>2</sub> в зависимости от дозы.<sup>27</sup> Бромелаин действует более избирательно, чем противовоспалительные нестероидные препараты. Он выборочно ингибирует синтез воспалительных агентов и усиливает синтез простагландина I<sub>2</sub>.<sup>28</sup>

Ингибирование бромелаином пролиферации опухолевых клеток не связано ни с его протеолитической, ни с пероксидазной активностью.<sup>29</sup> Было обнаружено, что бромелаин может индуцировать дифференциацию лейкозных клеток *in vitro*.<sup>30</sup> Это может приводить к апоптозу опухолевых клеток. Возможно поэтому бромелаин способен подавлять рост опухолевых клеток, так как механизм действия схож с цитостатическими препаратами.

Раковые клетки при контакте с тромбоцитами выделяют множество факторов (тромбоцитарный фактор роста, трансформирующий ростовой фактор- $\beta$ , тромбин, тромбоспондин, простагландины, катепсины и т.д.), которые повышают агрегацию тромбоцитов. Они также могут повреждать сосудистые стенки, что приводит к сгусткам тромбоцитов. Также тромбоциты могут формировать агрегаты с опухолевыми клетками, которые могут крепиться к эндотелию и запускать процесс образования метастаз.<sup>31-35</sup> Действие бромелаина как антикоагулянта также можно считать антиметастатическим действием.<sup>28</sup> Grabowska et al. Обнаружили, что мышинные клетки меланомы B16F10, преинкубированные *in vitro* с бромелаином давали в 3 раза меньше по весу метастатических опухолей в легких.<sup>36</sup> Несмотря на эти эффекты выживаемость не повышалась. Метастазные опухолевые клетки обладают молекулами клеточной адгезии CD44 на своей поверхности, которыми они связываются с гиалуроновой кислотой на поверхности эндотелиальных клеток. Бромелаин уменьшает экспрессию рецепторов к

урокиназе и активность урокиназы, что уменьшает способность раковых клеток проходить сквозь внеклеточный матрикс.

Бромелаин также оказывает влияние на иммунный ответ организма. Обработка человеческих лимфоцитов уменьшает экспрессию CD44 на поверхность клетки, но не затрагивает экспрессию CD11a. Адгезия лимфоцитов к эндотелию в пупочной вене также снижалась.<sup>37</sup> Eskert et al. получили данные, что пероральный прием бромелаина (3000 FIP единиц в день в течение 10 дней) вызывал умеренное снижение экспрессии CD44 на лимфоцитах объектов с раком молочной железы, а экспрессия CD11a и CD62L слегка повышалась; экспрессия CD16 не изменялась.<sup>38</sup> Бромелаин и папаин *in vitro* стимулируют мононуклеарные лейкоциты крови синтезировать TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6, особенно моноциты.<sup>39,40</sup> Производство тех же цитокинов наблюдается при пероральном приеме полиферментного препарата, содержащего бромелаин.<sup>41</sup> Гранулоциты реагируют на тот же препарат выделением реактивных кислородных радикалов, которые обладают противомикробным и противоопухолевым эффектом.<sup>42</sup> Фракция бромелаина с самой высокой ферментативной активностью, при нормальной концентрации IL-2, усиливает лимфоцит-опосредованное ингибирование пролиферации различных опухолевых клеток.

Бромелаиновая паста (35% растворено) полностью очищает ожоги на крысах в течение 2 дней, в сравнении с коллагеназой, которая справляется с той же задачей за 10 дней, без побочных эффектов и повреждений соседних с ожогом тканей.<sup>43</sup> Очищающий агент был выделен из коммерческого бромелаина и назван эсхаразой.<sup>44</sup> Вещество, по-видимому, не обладает протеолитической активностью. Бромелаин и эсхараза не оказывают воздействия на повреждения, вызванные холодом.<sup>45</sup>

Но сохраняет ли бромелаин свою активность при пероральном приеме? В 1992 Smyth et al.<sup>16</sup> Описали, что после перорального приема бромелаина у кроликов повышался уровень плазмينا и увеличивалось протромбиновое время. Позже установили, что бромелаин абсорбируется в высокомолекулярной форме из тонкой кишки. Бромелаин после попадания в кровь связывается с  $\alpha$ 2-макроглобулином. Антитела не атакуют бромелаин, так как его эпитопы закрыты  $\alpha$ 2-макроглобулином. Поэтому можно сказать, что бромелаин находится в крови в функциональной форме.

LD<sub>50</sub> дозы при пероральном приеме не смогли установить. LD<sub>50</sub> доза при внутрибрюшинной инъекции: мышь – 37 мг/кг, крыса – 85 мг/кг. LD<sub>50</sub> доза при

внутривенной инъекции: мышь – 30 мг/кг, кролик – 20 мг/кг. Такие дозы во много раз превышают обычно принимаемые человеком дозы. Промежуточных побочных эффектов не наблюдалось.

Но все вышеописанные свойства бромелаина устанавливались не на человеке, поэтому не могут считаться до конца подтвержденными.

Сейчас бромелаин используется как компонент зубных паст, входит в состав полиферментных препаратов и в кулинарии для размягчения мяса.<sup>46</sup>

В зубных пастах использования бромелаина обусловлено его возможным антибактериальным действием. Уже исследованы некоторые эффекты бромелаина на бактерии и на вещества, которые они выделяют. Но действие бромелаина на процесс адгезии бактерий пока не установлено. Например, Vishnu Priya V et al. в своей работе обнаружили, что бромелаин проявляет антибактериальную активность против *Streptococcus mutans*, который предположительно является возбудителем кариеса.<sup>47</sup> Также установлено, что бромелаин уменьшает секрецию энтеротоксинов *E. coli* и секрецию холерного токсина *Vibrio cholerae*. Было отмечено, что использование бромелаина совместно с антибиотиком ванкомицином против *S. sanguis* снижает его МИС в 2 раз.<sup>48</sup> Бромелаин усиливает активность антибиотиков против *E. faecalis* и *S. mutans*, ингибирует рост *A. Actinomycetemcomitans* и *P. gingivalis*, являющимися возбудителями пародонтита.<sup>49</sup> Известно, что бромелаин выборочно уменьшает количество молекул клеточной адгезии (CD44 и CD62-L) на поверхности Т-клеток и НК клеток. Из этих данных можно предположить, что бромелаин возможно влияет на адгезию бактерий и из-за этого на образование бактериальных пленок, но исследований по этой теме довольно мало, поэтому мы и собираемся в нашей работе проверить данный эффект бромелаина.<sup>50</sup>

### 3. Материалы и методы

#### 3.1. Определение состава водорастворимой белковой фракции препарата бромелаина методом электрофоретического разделения в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (SDS-PAAG)

В работе использовали коммерческий препарат бромелаина фирмы Merck. В некоторых экспериментах также использовали препараты бромелаина других производителей (условно обозначенные номерами 1, 2, 3 и 4).

Концентрацию белка в водорастворимой фракции препаратов бромелаина определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific). Для этого навеску образца массой 5 мг растворяли в 100 мкл воды, раствор центрифугировали на скорости 13000 об/мин, надосады переносили в чистые пробирки и использовали для спектрофотометрического анализа. Светопоглощение определяли на длине волны 280 нм, с учетом рассчитанного ранее для данного белка коэффициента экстинкции (13).

Для получения необходимой для электрофореза концентрации (5-15 мкг на пробу) исходный раствор разбавляли водой.

Электрофоретическое разделение проводилось в пластинах геля размером 7x8 см толщиной 0.75 мм в камере Mini-PROTEAN® Tetra (BioRad). Гели для фореза готовились непосредственно перед экспериментом. Разделяющий гель состоял из 2,5 мл 1,5 М Tris HCl (pH = 8.8), 2.7 мл воды, 4.7 мл 30%-ого акриламида, 0,1 мл 10%-ого SDS). Граница геля в пластине выравнивалась при помощи 70%-ого этилового спирта. Концентрирующий гель содержал акриламид (5 %), 0.125 М Tris-HCl (pH 6.8) и 0.1% SDS. Катализаторами полимеризации служили 0.06% персульфат аммония и TEMED (0.6 мкл на 1 мл геля).

Буфер для нанесения белковых проб содержал 3.125 мМ Tris-HCl (pH 6.8), 1 % SDS, 0.125 % глицерина, 0.005 % бромфенолового синего и 0.0025 % β-меркаптоэтанола. Пробы растворяли в буфере и нагревали в термостате при температуре 96°C в течение 5 минут, после чего заливали в гелевые карманы. Электродный буфер (25 мМ Tris HCl, 192 мМ глицина, 0,1% SDS, pH 8.8) заливали в камеру для электрофореза. Разделение

проводили в течение 0,5 часа при 100 В и 1 час при 180-200 В. После разделения гель фиксировали и окрашивали в растворе, содержащем 10% уксусной кислоты, 50% метанола и 5 М Кумасси R250 при комнатной температуре в течение часа. Фоновую окраску отмывали выдерживанием в растворе, содержащем 10% метанола и 10% ледяной уксусной кислоты.

### 3.2. Культивирование бактериального штамма *E. coli* DH5 $\alpha$ и GFP-продуцирующих штаммов *E. coli* DH5 $\alpha$ pBCMf-Pldh-EGFP и DH5 $\alpha$ pBCEG1

В исследовании использовались три штамма *E. coli* DH5 $\alpha$  и GFP-продуцирующие штаммы DH5 $\alpha$  pBCMf-Pldh-EGFP и DH5 $\alpha$  pBCEG1. Штаммы культивировали в жидкой или агаризованной среде LB. Для приготовления агаризованной среды LB, к компонентам среды добавляли агар (1,5%) и автоклавировали при 120 °С и давлении 1 атм. в течение 30 мин. После охлаждения до 40 °С среду стерильно (под ламинаром) разливали в чашки Петри диаметром 9 см. В случае GFP-продуцирующего штамма, в среду LB добавляли антибиотик хлорамфеникол в концентрации 10 мкг/мл.

Штамм микроорганизма наносили на поверхность агара при помощи стандартной стальной микробиологической петли. Готовые чашки с нанесенным штаммом помещали в термостат и инкубировали при 37 °С в течение 8-14 ч.

Чашки с выросшим штаммом хранили в холодильнике при 4 °С (не более месяца). Для более длительного хранения штамм собирали петлей с поверхности агара и суспендировали в специальной музейной среде (среда LB с добавлением 20% глицерина), после чего помещали в холодильник-морозильник на -80 °С.

Отработанные чашки и среды утилизировали, стерилизуя в автоклаве при 120 °С и давлении 1 атм. в течение 30 мин.

### 3.3. Культивирование эукариотических клеток

Для работы использовались линии эпителиальных клеток аденокарциномы толстого кишечника человека CaCo2 и кератиноциты кожи человека HaCaT. Образцы клеточных культур хранятся в сосудах Дьюара при температуре 77 К. Для начала работы с

клетками, пробирка с образцом размораживалась в водяной бане при 37 °С, содержимое пробирки быстро переносилось в питательную ростовую среду (DMEM (Gibco) с добавлением фетальной бычьей сыворотки (Fetal Bovine Serum, Gibco, 10%) и смеси антибиотиков Pen/Strep (1%), и инкубировалось при 37 °С в атмосфере CO<sub>2</sub>. Дальнейшее ведение клеточной линии включало в себя пересев клеток в свежую среду каждые 3-4 дня.

#### 3.4. Диско-диффузионный метод

На чашку Петри с нанесенным сплошным бактериальным газоном *E. coli* клали заранее вырезанные из фильтровальной бумаги и стерилизованные в автоклаве диски, пропитанные раствором бромелаина (Merck) в различных концентрациях, а также диск, пропитанный раствором ампициллина 10 мкг/мл (для контроля). Концентрация бромелаина варьировалась в пределах 6 мг/мл – 1.5 мг/мл. Чашки со штаммом помещали в термостат и инкубировали при 37 °С в течение 8-14 ч., после чего измеряли размер зоны подавления роста микроорганизма вокруг дисков.

#### 3.5. Оценка МИК водного раствора бромелаина по отношению к *E. coli* (штамм DH5a)

Эксперимент по ингибированию роста *E. coli* (штамм DH5a) водным раствором препарата бромелаина (Merck) проводили в 24-луночном культуральном планшете Costar. Общий объем реакционной смеси составлял 1 мл. Для приготовления инокулята 1-2 колонии суточного штамма *E. coli*, выросшего на поверхности агаризованной среды LB, вносились в 1 мл теплого стерильного физраствора. Концентрация клеток в суспензии контролировалась на спектрофотометре SmartSpec 3000 (BioRad) и составляла примерно  $5 \cdot 10^7$  КОЕ/мл. Инокулят добавляли в нужном объеме в стерильный бульон LB, предварительно разлитый по лункам планшета, финальная концентрация *E. coli* в лунке составляла  $1 \cdot 10^6$  КОЕ/мл. Водный раствор бромелаина стерилизовали при помощи 0.22 мкм фильтра (Flowfilters). Разные концентрации раствора фермента получали серией последовательных разведений. Добавляли раствор фермента в лунки культурального планшета, конечная концентрация бромелаина в лунке варьировалась от 10 до 0.15 мкг/мл. В качестве положительного контроля на рост микроорганизма использовалась среда LB, инокулированная штаммом *E. coli*, без добавления фермента, в качестве отрицательного контроля – среда LB.

Планшеты закрывали крышкой и переносили в термостатируемый шейкер. Культивирование бактериального штамма осуществлялось в течение 21 ч. при 37 °С. Светопоглощение измерялось каждый час на планшетном спектрофотометре ClarioStar (BMG Labtech) на длине волны 600 нм, в течение первых семи часов и в конечной точке 21 ч. Перед каждым измерением планшет встряхивали в автоматическом режиме. Измерения проводили в двух биологических и четырех технических повторах.

### 3.6. Окраска (метод гематоксилин-эозин) и микроскопическая визуализация адгезии бактериальных клеток к эукариотической культуре

Культуру клеток CaCo2 растили в среде DMEM с добавлением фетальной бычьей сыворотки (Fetal Bovine Serum, Gibco, 10%) и антибиотика Pen/Strep (1%) при 37 °С в атмосфере CO<sub>2</sub> до субконфлюэнтного монослоя. Для микроскопических экспериментов, культура клеток была выращена в 6-луночной планшете, на дно лунок которого клали специально обработанные 23-мм стекла маркировки «cell culture». Штамм *E. coli* DH5α pBCMf-Pldh-EGFP был культивирован в бульоне LB или, в некоторых случаях, в среде DMEM без добавления антибиотика. Для оценки адгезии бактериального штамма к CaCo2, к промытым PBS клеткам добавлялась свежая среда DMEM, содержащая примерно 10<sup>8</sup> КОЕ/мл бактериальных клеток, после чего клетки инкубировались при 37 °С в течение 1-2 ч. Далее среда сливалась, клетки дважды промывались PBS, фиксировались при помощи этанола и окрашивались по методу «гематоксилин – эозин». Стекла извлекались из лунок, переносились на предметное стекло и исследовались на флуоресцентном микроскопе Olympus BX53 (Olympus).

### 3.7. Оценка протеолитической активности препаратов бромелаина различных производителей в реакции расщепления флуорогенного пептидного субстрата PLVQ-AMC

В этом эксперименте мы сравнили протеолитическую активность нескольких коммерческих препаратов бромелаина различных производителей. Кинетика ферментативной активности препаратов бромелаина была исследована по отношению к синтетическому пептидному субстрату PLVQ-AMC (AMC – флуорогенная метка). Объем реакционной смеси составлял 100 мкл и включал 0.2 М натрий-фосфатный буфер (pH 6.5), 100 mM NaCl, 0.5% DMSO, 0.6 mM ЭДТА, фермент и субстрат в соответствующих

концентрациях. Концентрация субстрата в DMSO варьировалась от 10 до 50 мкМ с шагом в 5 мкМ. Концентрация фермента в воде составляла 20 нМ. Скорость накопления флуоресцентного сигнала измерялась на спектрофотометре ClarioStar (BMG) на длине волны 350-440 нм.

### 3.8. Оценка адгезии штамма *E. coli* DH5a к эукариотическим клеткам методом рассева

Культуры клеток CaCo2 и HaCaT растили в культуральной среде DMEM с добавлением фетальной бычьей сыворотки (Fetal Bovine Serum, Gibco, 10%) и смеси антибиотиков Pen/Strep (1%) при 37 °С в атмосфере CO<sub>2</sub> до субконфлюэнтного монослоя. Для экспериментов по оценке адгезии методом рассева культура клеток выращивалась в 24-луночной планшете. Штамм *E. coli* DH5a или GFP-продуцирующей *E. coli* был культивирован в бульоне LB при 37 °С при перемешивании в течение 12-18 ч. Число колониобразующих единиц (КОЕ) в бактериальной культуре определялось спектрофотометрически. Для бактериального заражения, культуры эукариотических клеток промывались теплым PBS, после чего добавлялась свежая среда DMEM, не содержащая FBS и антибиотиков. Клетки выдерживались при 37 °С в атмосфере CO<sub>2</sub> в течение часа, затем добавлялись аликвоты бактериальной культуры до конечной концентрации примерно 10<sup>7</sup> КОЕ/мл. Клеточные культуры, зараженные *E. coli*, инкубировались при 37 °С в течение 3 ч. Далее среда сливалась, клетки трижды промывались теплым PBS, и в каждую лунку добавляли по 100 мкл 1% раствора Triton X-100 для разрушения комплекса эукариотических клеток с бактериальными клетками. Планшет выдерживался 10 мин. на столе при комнатной температуре, после чего в каждую лунку добавляли по 900 мкл бульона LB. Полученную суспензию перемешивали пипетированием и делали серию 10-кратных разведений при помощи среды LB. По 50 мкл каждого из трех последних разведений (1:1000, 1:10 000 и 1:100 000) наносили на поверхность LB-агара и инкубировали при 37 °С в течение 12-18 ч., после чего производился подсчет колоний.

В случае использования GFP-продуцирующего штамма *E. coli* рассев производился на агар LB, содержащий хлорамфеникол в концентрации 10 мкг/мл.

Для оценки влияния бромелаина на адгезию бактериального штамма, раствор препарата (Merck) в концентрациях ниже (0.5 мг/мл) и выше (5 мг/мл) МИК добавлялся в часть лунок, содержащих клеточные культуры, вместе с бактериальными клетками.

Все эксперименты проводились в двух биологических повторах.

### 3.9. Оценка адгезии GFP-продуцирующего штамма *E. coli* DH5 $\alpha$ pVCEG1 к эукариотическим клеткам с использованием спектрофотометрического метода

Эксперимент по оценке адгезии при помощи измерения уровня флуоресценции прикрепившихся клеток GFP-продуцирующего штамма *E. coli* DH5 $\alpha$  pVCEG1 был оформлен таким же образом, как и в предыдущем пункте. Эксперимент проводился в 96-луночной планшете. После разрушения комплекса эукариотические клетки - бактериальные клетки добавлением 1 % раствора Triton X-100, в лунки планшета добавляли 100-200 мкл PBS, клетки тщательно суспендировали. 100 мкл полученной суспензии переносили в лунки специального (черного) планшета и измеряли уровень сигнала флуоресценции на длине волны, соответствующей светоиспусканию GFP (490 нм). Измерения проводились на спектрофотометре ClarioStar (BMG). Контролем служил буфер PBS.

Все эксперименты проводились в четырех биологических повторах, регистрация сигнала флуоресценции производилась не менее пяти раз в течение 20 минут.

Для учета результатов была проведена предварительная калибровка сигнала флуоресценции от концентрации GFP-продуцирующих бактериальных клеток.

#### 4. Результаты

##### 4.1. Состав водорастворимой белковой фракции препарата бромелаина по результатам электрофоретического разделения в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (SDS-PAAG)

Концентрация белка в водорастворимой фракции препарата бромелаина фирмы Merck, определенное с помощью спектрофотометра NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific), составило 19.97 мг/мл на исходную навеску вещества 50 мг/мл. Таким образом, содержание белковой фракции в коммерческом препарате не превышает 40%.

Для определения состава белковой фракции использовали метод электрофоретического разделения (SDS-PAAG). Суть данного метода заключается в перемещении белка в полиакриламидном геле в присутствии SDS (додецилсульфата натрия). SDS – крупная молекула с отрицательным зарядом, используется для нейтрализации заряда белка и разделение его на фракции по их молекулярному весу, поскольку количество молекул SDS, прикрепленных к белку пропорционально его молекулярной массе. Разделение фрагментов в сетке геля происходит за счет действия на комплексы белка с SDS электрического поля.

Результаты представлены на Рис. 1.

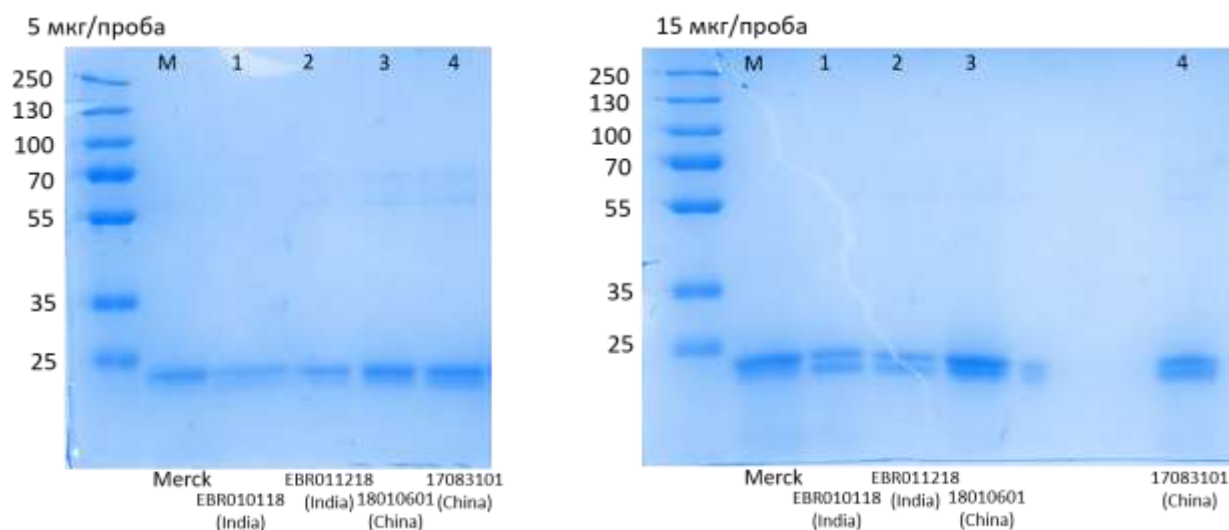


Рис.1. Электрофореграммы (14% SDS-PAAG) водорастворимой фракции препаратов бромелаина различных производителей.

SDS-PAAG анализ (Рис. 1) показал наличие для всех образцов двух интенсивных полос в интервале 23-24 кДа, и две слабые полосы в интервале 55-70 кДа (наиболее отчетливо видны в случае проб 3 и 4 и угадываются в случае остальных проб, включая препарат фирмы Merck). Полученный результат представляет собой «классическую» картину для «грубого экстракта» (crude extract) бромелаина из различных частей *Ananas comosus* в натрий-ацетатном буфере, представленную в ряде работ: две интенсивные полосы или одна широкая полоса при 23-24 кДа наблюдаются почти всегда, иногда на фоне более слабых полос различного молекулярного веса. Полосы при 55-70 кДа в статьях, как правило, не обсуждаются.

#### 4.2. Оценка протеолитической активности препаратов бромелаина различных производителей в реакции расщепления флуорогенного пептидного субстрата PLVQ-AMC.

Одной из задач настоящего исследования являлась отработка методики оценки протеазной активности бромелаина в реакции с синтетическим пептидным субстратом PLVQ-AMC, состоящим из 4 аминокислот (пролин, лейцин, валин, глутамин) и флуоресцентной метки.

Кривые скорости накопления флуоресцентного сигнала для различных образцов бромелаина приведены на Рис. 2

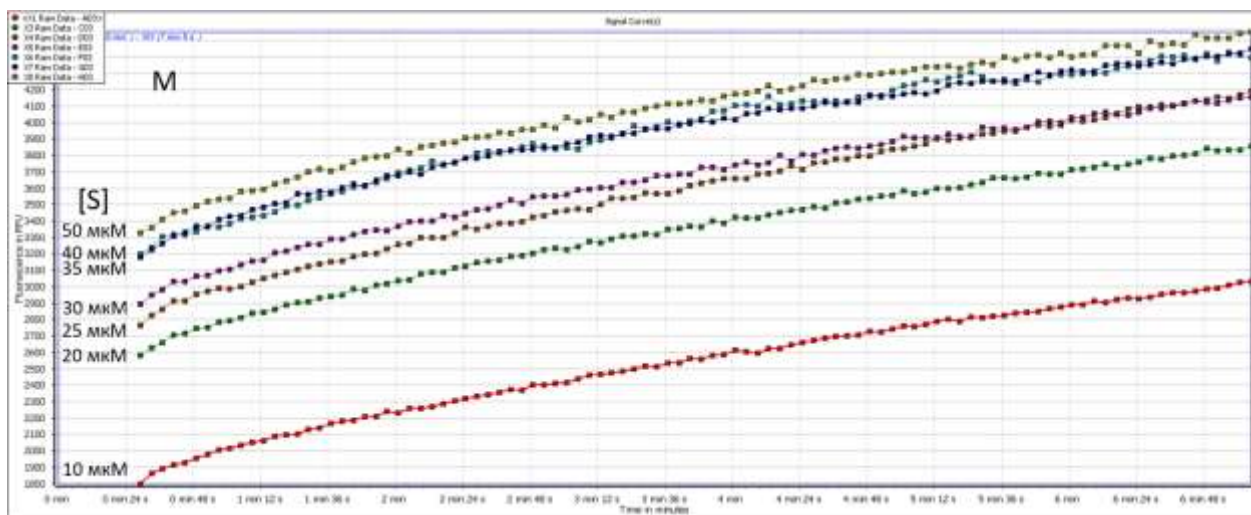
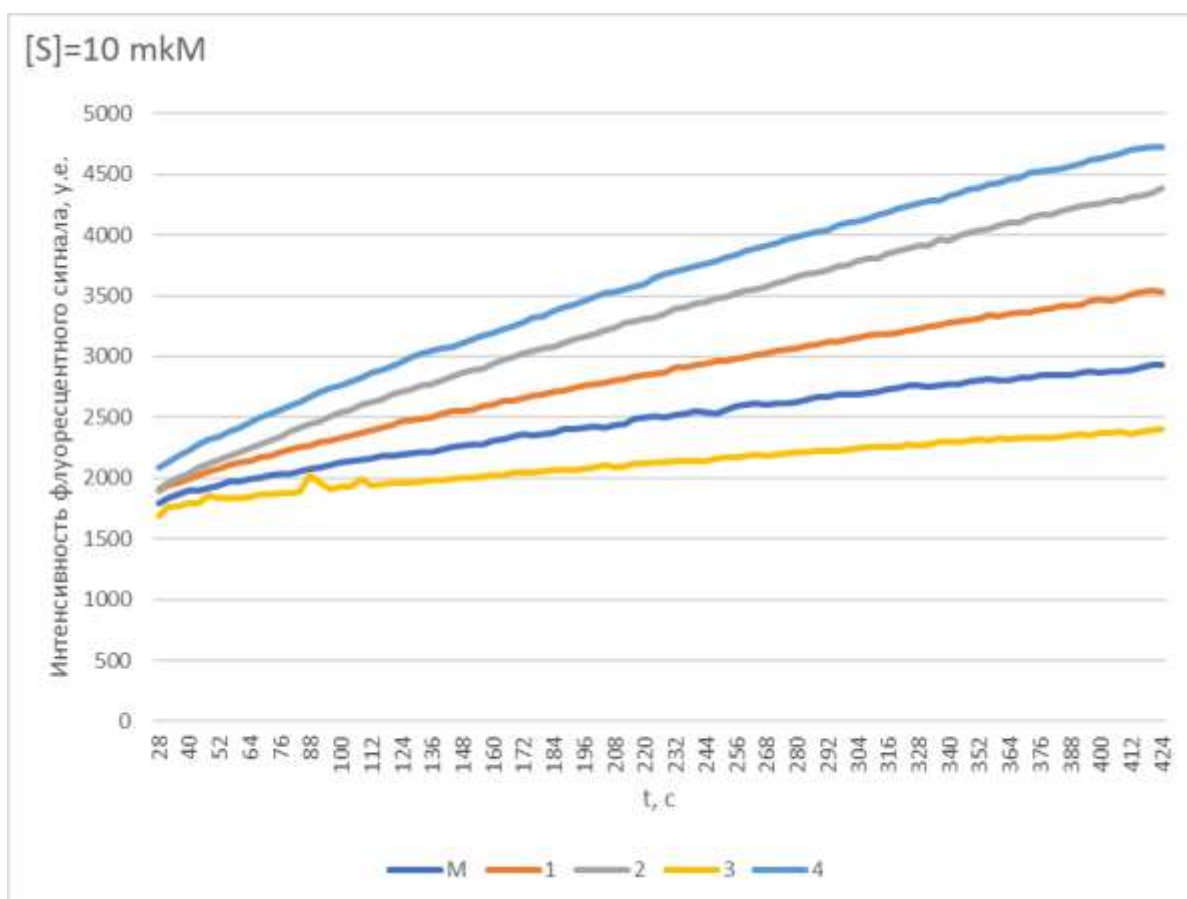


Рис. 2. Скорость накопления сигнала флуоресценции в реакции расщепления флуорогенного пептидного субстрата PLVQ-AMC образцом бромелаина фирмы Merck, при различных концентрациях субстрата.



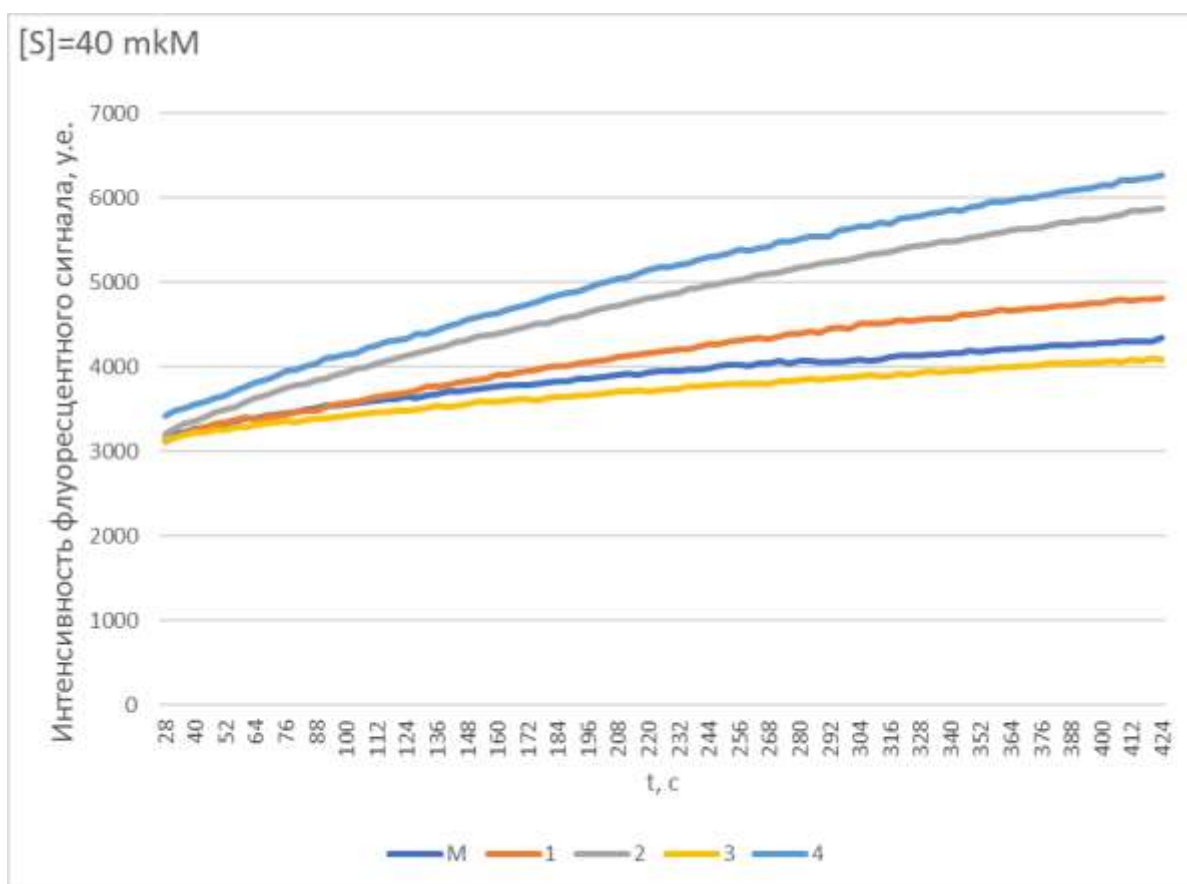


Рис. 3. Сравнение скоростей накопления сигнала флуоресценции в реакции расщепления флуорогенного пептидного субстрата PLVQ-AMC для образцов бромелаина разных производителей при концентрациях субстрата 10 и 40 мкМ.

Из приведенных данных следует, что все препараты бромелаина имеют различную протеолитическую активность: наиболее эффективны в расщеплении пептидного субстрата образцы фермента 4 и 2, наименее – образец 3. Полученные результаты могут быть объяснены различным соотношением ферментных компонентов в сложном составе водорастворимой фракции «грубого экстракта» бромелаина в препаратах разных производителей. Чтобы прояснить этот вопрос, предполагается в дальнейшем исследовать протеолитическую активность препаратов бромелаина при других значениях pH, а также по отношению к другим субстратам.

#### 4.3. Исследование влияния бромелаина на рост штамма *E. coli* DH5a

Для подавления роста штамма *E. coli* на чашке с агаризованной LB использовались стерильные бумажные диски, пропитанные раствором бромелаина в диапазоне концентраций (6 мг/мл, 3 мг/мл, 1.5 мг/мл). Спустя 12 ч. инкубирования вокруг дисков с бромелаином заметной зоны подавления роста бактерий, не наблюдалось (Рис. 4). Отчетливая зона ингибирования роста наблюдалась вокруг диска с антибиотиком ампициллином, взятым в качестве положительного контроля. Полученные результаты могут означать как то, что выбранных концентраций фермента недостаточно для эффективного подавления роста, так и то, что данное соединение плохо диффундирует в агар.

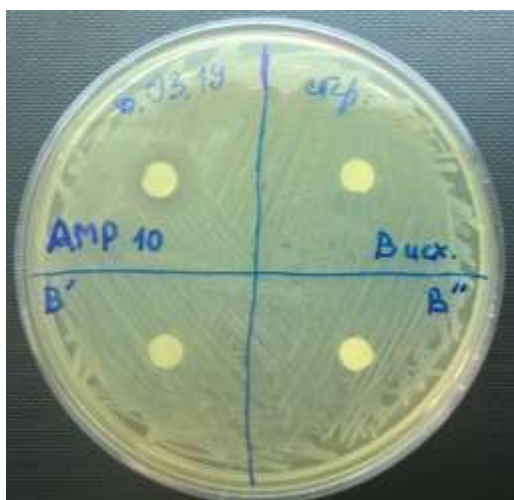


Рис. 4. Диско-диффузионный тест.

#### 4.4. Оценка МИК водного раствора бромелаина по отношению к *E. coli* (штамм DH5a).

Исследование влияния бромелаина на рост культуры *E. coli* было проведено также в жидкой среде, в соответствии с методикой 3.5. Кривые ингибирования роста штамма *E. coli* бромелаином на различных стадиях роста представлены на Рис. 5 и 6. Как следует из полученных данных, значительное подавление роста штамма начинается уже при концентрациях фермента 1 мкг/мкл, а полное подавление роста, вероятно, имеет место при концентрациях 10 мкг/мкл и выше, что, в целом, соответствует литературным данным.

Таким образом, для оценки антиадгезивных свойств бромелаина следует использовать концентрацию фермента 1 мкг/мкл и ниже.

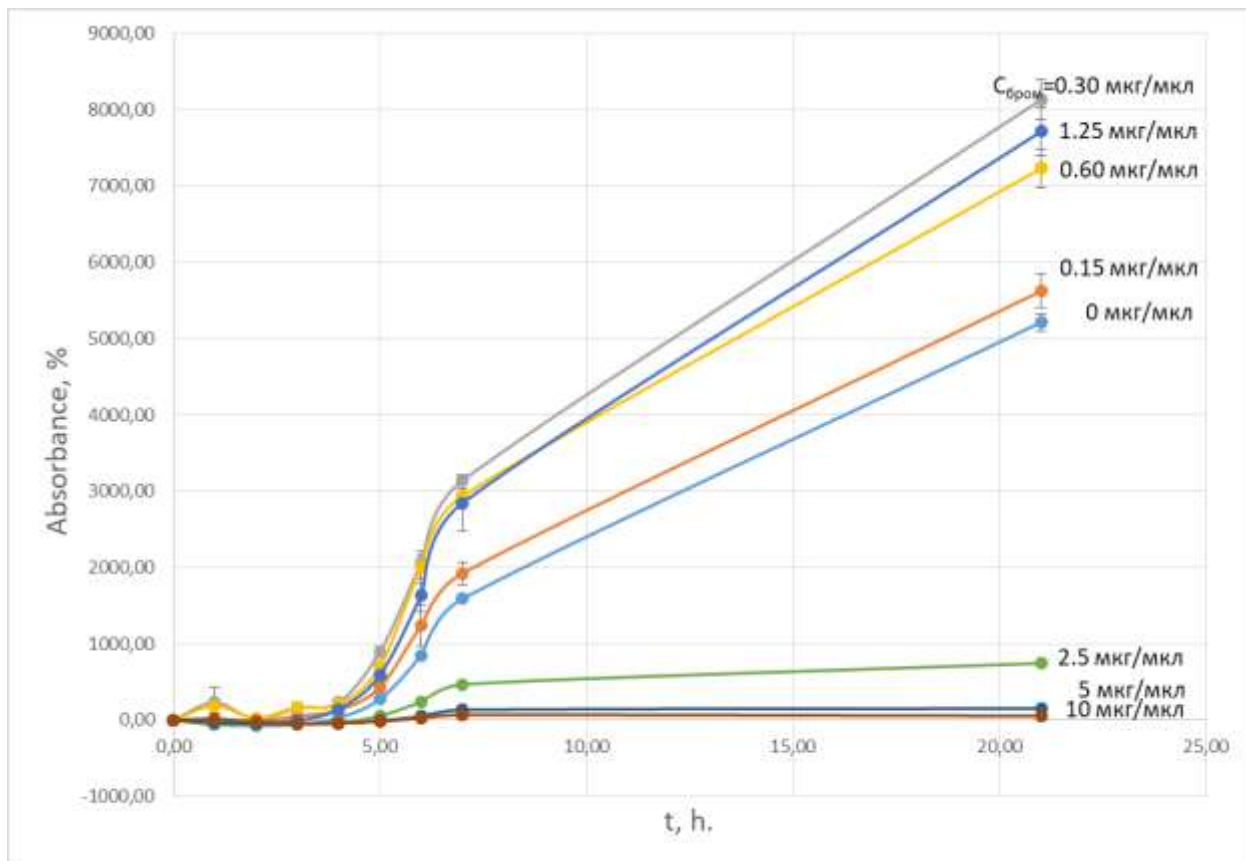


Рис. 5. Кривые роста штамма *E. coli* в зависимости от концентрации в среде бромелаина.

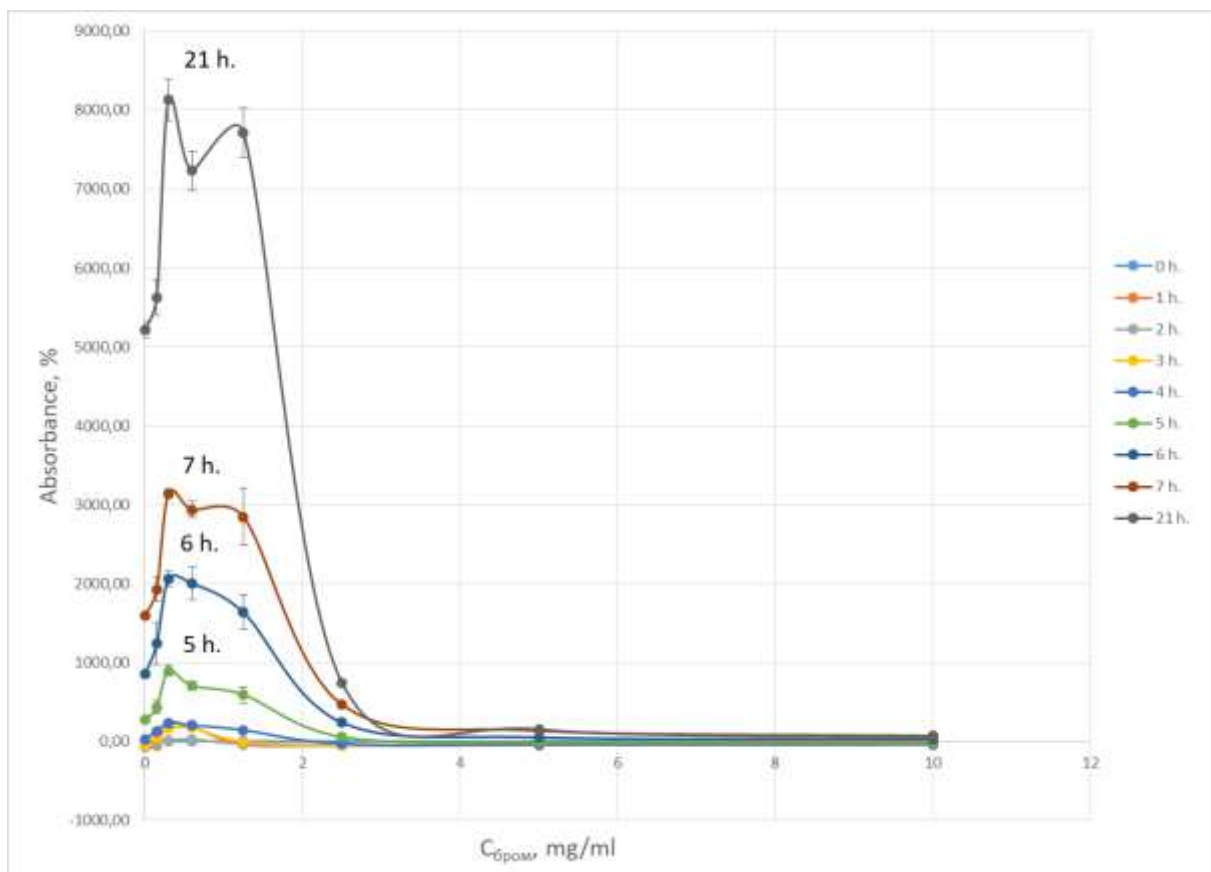
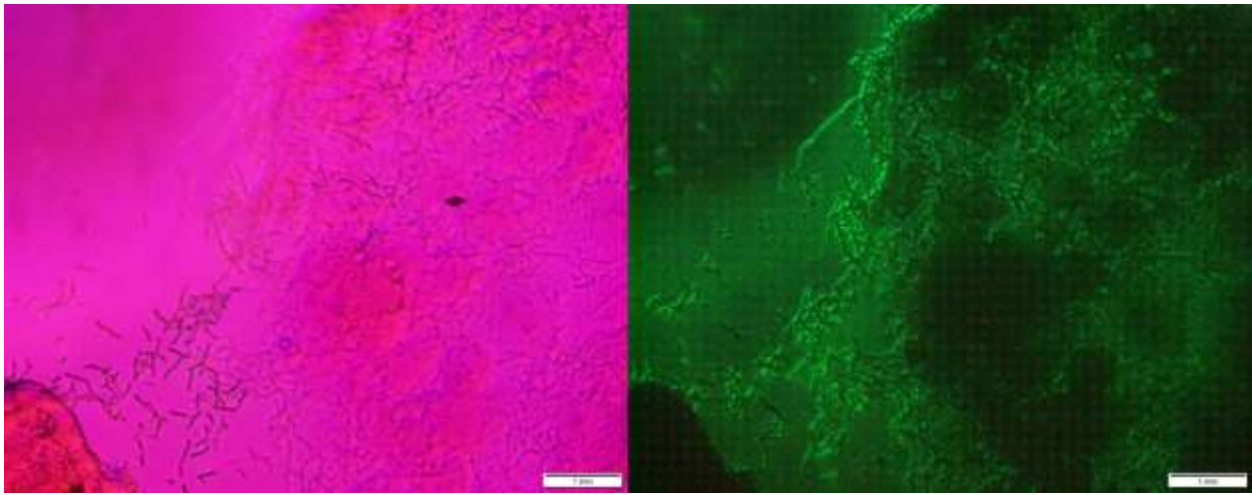


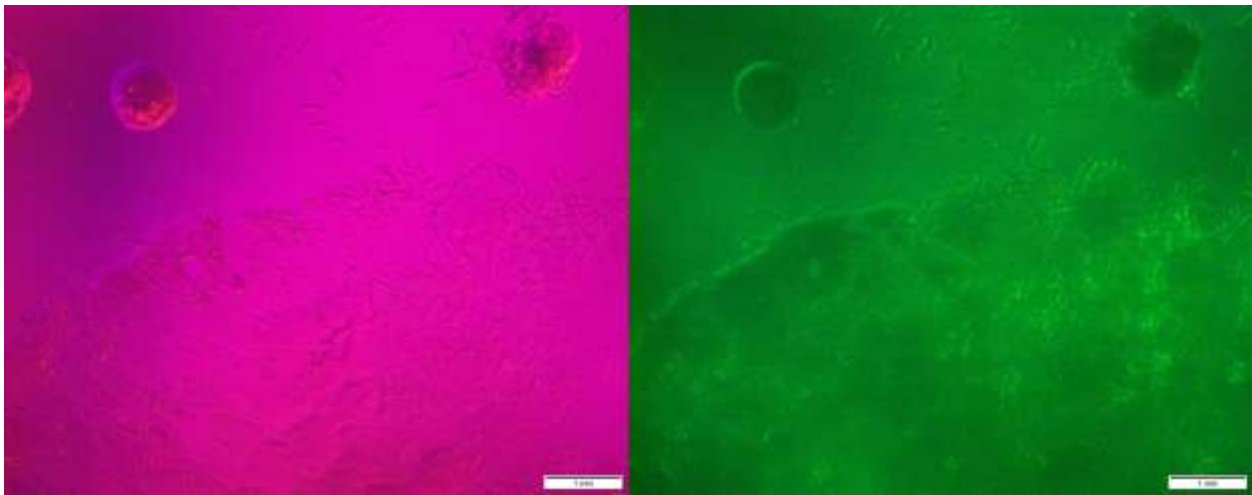
Рис. 6. Кривые ингибирования роста штамма *E. coli* бромелаином на разных стадиях культивирования.

#### 4.5. Отработка методики окраски и микроскопической визуализации адгезии бактериальных клеток к эукариотической культуре.

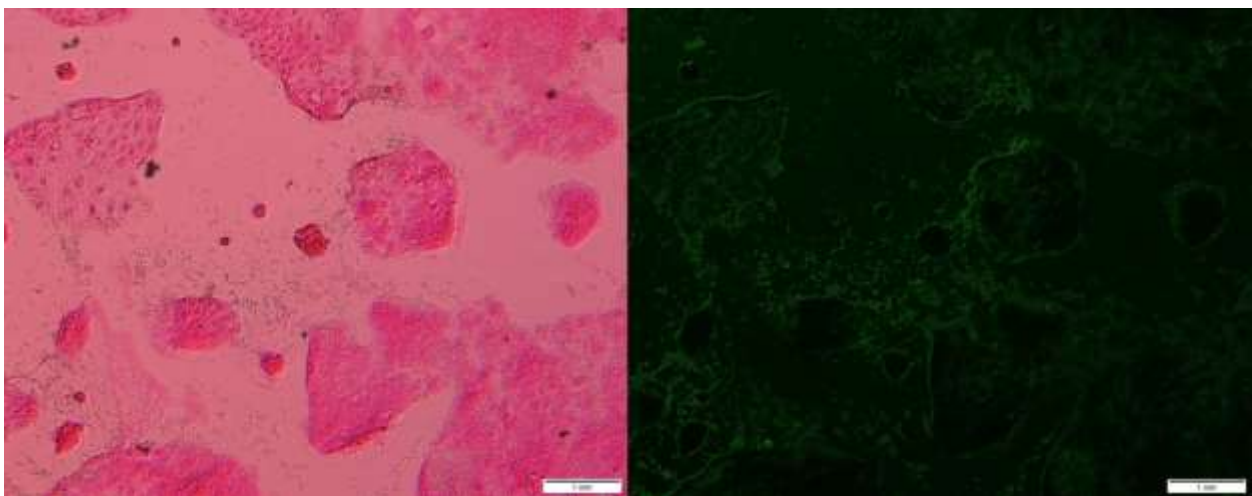
Чтобы визуализировать предполагаемые комплексы бактериальных клеток с эукариотическими, мы использовали микроскопическое исследование и окраску эукариотических клеток по методу гематоксилин-эозин. Предварительные эксперименты показали, что при данном способе окраски бактериальные клетки не видны на фоне эукариотических в диапазоне видимого света. Тогда мы попытались использовать GFP-продуцирующий штамм *E. coli* DH5 $\alpha$  pBCMf-Pldh-EGFP, чтобы наблюдать флуоресценцию в соответствующем диапазоне (490 нм). Результаты исследования приведены на Рис. 7



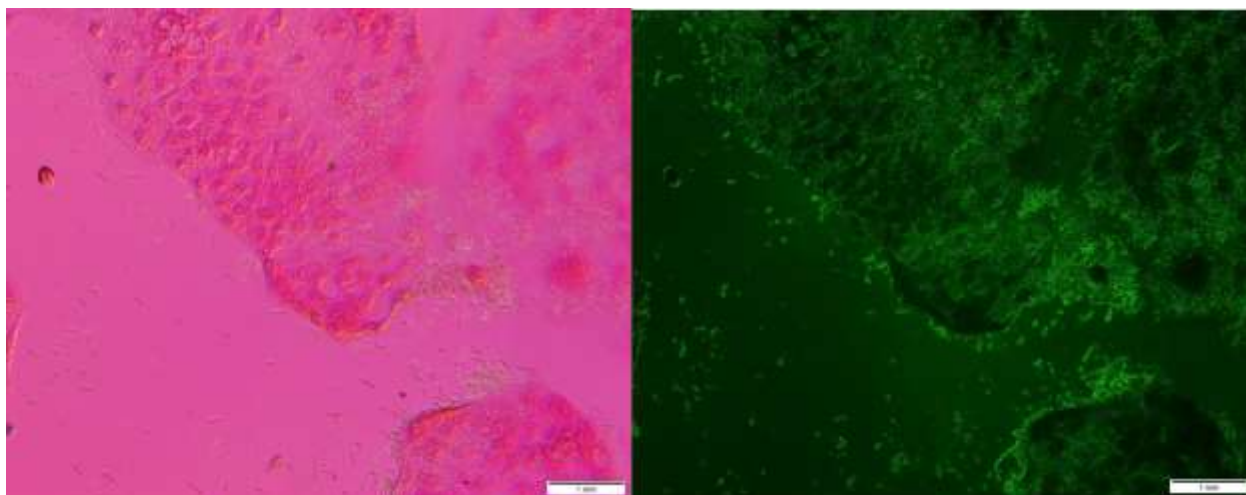
60x



40x



10x



20x

Рис. 7. Микроскопия клеточной культуры CaCo2, культивированной совместно с GFP-продуцирующим штаммом *E. coli*. Время культивирования – 2 ч., фиксация этанолом, окраска по методу «гематоксилин-эозин».

К сожалению, данным методом нам не удалось увидеть бактериальные клетки на поверхности эукариотических клеток. Причиной может быть как непригодность метода в целом, так и отсутствие адгезии данного бактериального штамма к данной клеточной линии.

4.6. Отработка методики оценки адгезии штамма *E. coli* DH5a к эукариотическим клеткам методом посева.

Результаты эксперимента представлены на Рис. 8

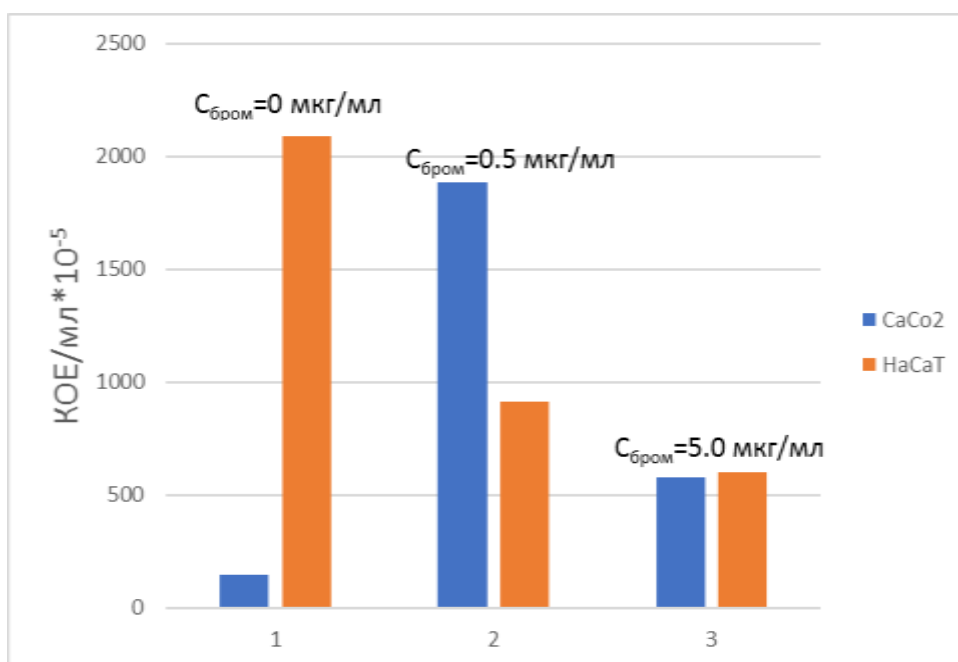


Рис. 8. Число колониеобразующих единиц, адгезированных на клеточных культурах CaCo2 и HaCaT, до и после обработки раствором бромелаяна в различных концентрациях.

Результаты данного эксперимента неоднозначны и требуют повтора. Можно предположить, что значение КОЕ для HaCaT при C(бром)=0 мкг/мл –  $2 \cdot 10^8$  КОЕ/мл - ошибочно, поскольку *исходная* концентрация бактериальных клеток, внесенных в лунку при заражении, не превышала  $5 \cdot 10^7 - 1 \cdot 10^8$  КОЕ/мл.

4.7. Отработка методики оценки адгезии GFP-продуцирующего штамма *E. coli* DH5 $\alpha$  pVCEG1 к эукариотическим клеткам с использованием спектрофотометрических методов.

Калибровка сигнала флуоресценции от концентрации клеток GFP-продуцирующего штамма *E. coli* DH5 $\alpha$  pVCEG1 приведена на Рис. 9

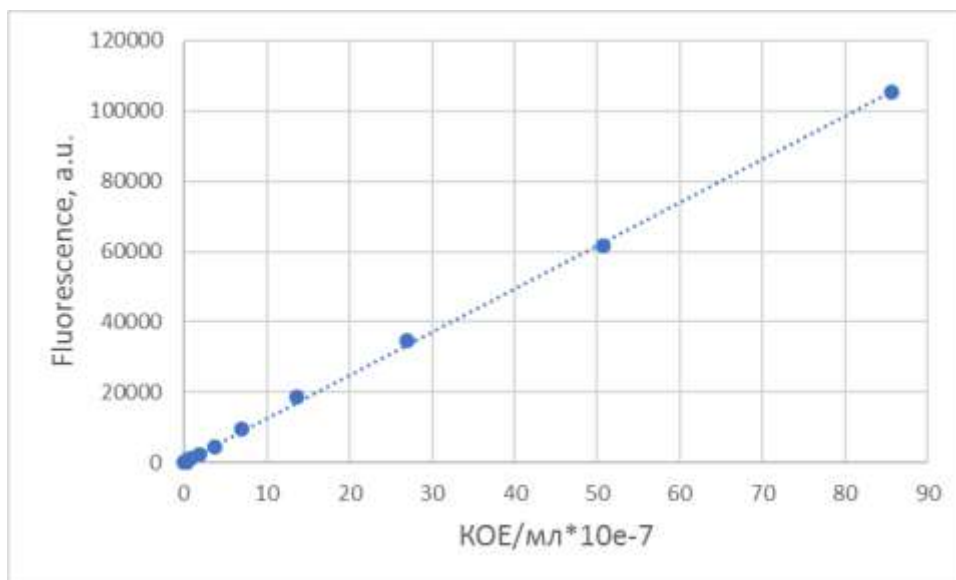


Рис. 9. Зависимость величины флуоресцентного сигнала от числа колониобразующих единиц в суспензии клеток GFP-продуцирующего штамма *E. coli* DH5α pVCEG1.

Результаты оценки адгезии данным методом приведены на Рис. 10

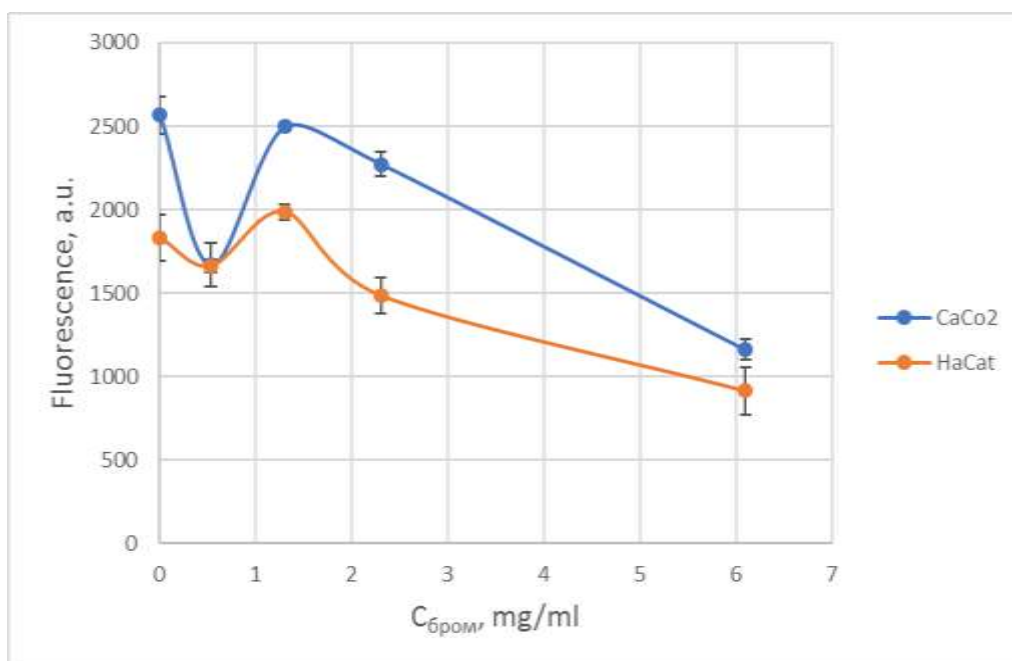


Рис. 10. Зависимость величины флуоресцентного сигнала от числа колониобразующих единиц GFP-продуцирующего штамма *E. coli* DH5α pVCEG1, адгезированных на клеточных культурах CaCo2 и HaCat до и после обработки раствором бромелаина в различных концентрациях, по данным спектрофотометрического исследования.

Согласно полученным данным, число бактериальных клеток, образовавших комплекс с эукариотическими клетками, в случае обеих клеточных культур составляет, в соответствии с калибровочной прямой,  $1.5-1.75 \cdot 10^7$  КОЕ/мл. По мере увеличения концентрации бромелаина степень адгезии для обеих культур несколько уменьшалась, однако в области концентраций фермента 0.5 – 1.5 мкг/мл снова повышалась, и далее плавно снижалась с последующем выходом на плато. Это снижение можно было бы объяснить деструктурирующим влиянием фермента на клеточные культуры.

## 5. Выводы

- 1) Все препараты – «грубые экстракты» с примерным весом 23-24 kDa. Содержание белковой фракции в препарате фирмы Merck – около 40 %.
- 2) Разные препараты бромелаина проявляет разную ферментативную активность
- 3) Подавление бромелаином фирмы Merck роста бактериального штамма *E. coli* DH5 $\alpha$  в жидкой среде наблюдается при концентрации 1-1,5 мг/мл
- 4) При окраске эукариотических клеток по методу гематоксилин-эозин мы не видим прикрепленные бактериальные клетки.
- 5) Бромелаин в концентрации 0,5 мг/мл уменьшает количество адгезированных бактериальных клеток *E. coli* DH5 $\alpha$  к эукариотическим клеткам линии HaCaT и CaCo2.

## 6. Благодарности

Мы благодарим Глаголева Сергея Менделевича за организацию практики, Кнорре Дмитрия Александровича за рецензирование работы, Икрянникову Ларису Николаевну за помощь и чуткое руководство и Замятина Андрея Александровича за возможность проведения исследования в лаборатории института молекулярной медицины.

## 7. Список литературы

1. R. M. Heinicke, W. A. Gortner. Stem bromelain—*A new protease preparation from pineapple plants*. *Econ. Bot.*, 1957, V. 11, № 3, p. 225-234.
2. Ritonja A, Rowan A. D., Buttle D. J., Rawlings N. D., Turk V., Barrett A. J. Stem bromelain: amino acid sequence and implications for weak binding of cystatin. *FEBS Lett.*, 1989, V. 247, № 2, p. 419-424.
3. De Lencastre Novaes L. C. Jozala, A. F. Lopes, A. M. de Carvalho, Santos-Ebinuma V. Mazzola P. G., Pessoa Junior A. Stability, purification, and applications of bromelain: A review. *Biotechnology Progress*, 2015, V. 32, № 1, p. 5–13.
4. Murachi T., Yasui M., Yasuda Y. Purification and Physical Characterization of Stem Bromelain. *Biochemistry*, 1964, V. 3, № 1, p. 48–55.
5. Ota S., Moore S., Stein W. H. Preparation and Chemical Properties of Purified Stem and Fruit Bromelains. *Biochemistry*, 1964, V. 3, № 2, p. 180–185.
6. Murachi, T. Bromelain enzymes. *Methods in Enzymology*, 1976, V. 45, p. 475–485.
7. Xue Y, Wu CY, Branford-White CJ, Ning X, Nie HL, Zhu LM. Chemical modification of stem bromelain with anhydride groups to enhance its stability and catalytic activity. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2010, V.63, № 3, p. 188-193.
8. Balls AK, Thompson RR, Kies MW. Bromelin. Properties and Commercial Production. *Ind. Eng. Chem.*, 1941, V. 33, № 7, p. 950-953.
9. Khan RH, Rasheedi S, Haq SK. Effect of pH, temperature and alcohols on the stability of glycosylated and deglycosylated stem bromelain. *J. Biosciences*, 2003, V. 28, № 6, p. 709-714.
10. Hale LP, Greer PK, Trinh CT, James CL. Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations. *Int. Immunopharmacol.*, 2005, V.5, № 4, p. 783-793.
11. Murachi, T. Bromelain enzymes. *Proteolytic Enzymes*, 1970, V. 19, p. 273–284.
12. Streichhan P., v. Schaik W., Stauder G. (1995) Bioavailability of therapeutically used hydrolytic enzymes. *Absorption of Orally Administered Enzymes*, Springer, Berlin, Heidelberg, p. 83–94.
13. Netti C, Bandi G, Pecile A (1972) Anti-inflammatory action of proteolytic enzymes of animal bacterial origin administered orally compared with antiphlogistic compounds. *Farmaco Prat*, 1972, V. 27, p. 453-466.
14. Uhlig G., Seifert I. Die Wirkung proteolytischer Enzyme auf das posttraumatische Syndrom. *Fortschritte der Medizin*, 1981, V. 15, p. 554–556.

15. Smyth R. D., Brennan R., Martin G. J. Systemic biochemical changes following the oral administration of a proteolytic enzyme, bromelain. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 1962, V. 136, p. 230–236.
16. Renzini G., Varengo M. Die Resorption von Tetrazyklin in Gegenwart von Bromelain bei oraler Applikation. *Arzneimittel-Forsch. (Drug Res.)*, 1972, V. 2, p. 410–412.
17. Tinozzi S., Venegoni A. Effect of bromelain on serum and tissue levels of amoxicillin. *Drug Exp. Clin. Res.*, 1978, V. 4, p. 39–44.
18. Livio M., De Gaetano G., Donati M. B. Effect of bromelain on fibrinogen level, prothrombin complex and platelet aggregation in the rat – a preliminary report. *Drugs Exp. Clin. Res.*, 1978, V. 1, p. 49–53.
19. Pirotta F., de Giuli-Morghen C. Bromelain: antiinflammatory and serum fibrinolytic activity after oral administration in the rat. *Drugs Exp. Clin. Res.*, 1978, V. 4, p. 1–20.
20. Morita A. H., Uchida D. A., Taussig S. J., Chon S. C., Hokama Y. Chromatographic fractionation and characterization of the active platelet aggregation inhibitory factor from bromelain. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 1979, V. 239, № 2, p. 340–350.
21. Metzigg C., Grabowska E., Eckert K., Rehse K., Maurer H. R. Bromelain proteases reduce human platelet aggregation in vitro, adhesion to bovine endothelial cells and thrombus formation in rat vessels in vivo. *In vivo*, 1999, V. 13, № 1, p. 7–12.
22. Maurer H. R., Eckert K., Grabowska E., Eschmann K. (2000) Use of bromelain proteases for inhibiting blood coagulation. Patent WO PCT/EP 98/04406.
23. Kolac C., Streichhan P., Lehr C.-M. Oral bioavailability of proteolytic enzymes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 1996, V. 42, № 4, p. 222–232.
24. Oh-Ishi S., Uchida Y., Meno A., Katori M. Bromelain, a thiolprotease from pineapple stem, depletes high molecular weight kininogen by activation of Hageman factor (Factor XIII). *Thrombosis res.*, 1979, V.14, № 4, p. 665–672.
25. Kumakura S., Yamashita M., Tsurufuii S. Effect of bromelain on kaolin – included inflammation in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 1988, V. 150, № 3, p. 295–301.
26. Vellini M., Desideri D., Milanese A., Omini C., Daffonchio L., Hernandez A. et al. Possible involvement of eicosanoids in the pharmacological action of bromelain. *Arzneimittelforschung*, 1986, V. 36, № 1, p. 110–112.
27. Taussig S.J., Batkin S. Bromelain, the enzyme complex of pineapple (*Ananas comosus*) and its clinical application. An update. *J. Ethnopharmacol.*, 1988, V. 22, № 2, p. 191–203.

28. Taussig S. J., Szekerczes J., Batkin, S. Inhibition of tumor growth in vitro by bromelain, an extract of the pineapple (*Ananas comosus*). *Planta medica*, 1985, V. 51, № 6, p. 538–539.
29. Maurer H. R., Hozumi M., Honma Y., Okabe-Kado J. Bromelain induces the differentiation of leukemic cells in vitro: an explanation for its cytostatic effects? *Planta Medica*, 1988, V. 54, № 5, p. 377–381.
30. Mehta P. Potential role of platelets in the pathogenesis of tumor metastasis. *Blood*, 1984, V. 63, № 1, p. 55–63.
31. Bastida E., Ordinas A. Platelet contribution to the formation of metastatic foci: The role of cancer cell-induced platelet activation. *Haemostasis*, 1988, V. 18, p. 29–36.
32. Honn K. V., Tang D. G., Chen Y. Q. Platelets and cancer metastasis: more than an epiphenomenon. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 1992, V. 18, p. 392–415.
33. Belloc C., Lu H., Soria C., Fridman R., Legrand Y., Menashi S. The effect of platelets on invasiveness and protease production of human mammary tumor cells. *Int. J. Cancer.*, 1995, V. 60, № 3, p. 413–417.
34. Jiang W. G., Mansel R. E. Progress in anti-invasion and anti-metastasis research and treatment (review). *Int. J. Oncol.*, 1996, V. 9, p. 1013–1028.
35. Grabowska E., Eckert K., Fichtner I., Schulze-Forster K., Maurer H. R. Bromelain proteases suppress growth, invasion and lung metastasis of B16F10 mouse melanoma cells. *Int. J. Oncol.*, 1997, V. 11, № 2, p. 243–248.
36. Munzig E., Eckert K., Harrach T., Graf H., Maurer H. R. Bromelain protease F9 reduces the CD44 mediated adhesion of human peripheral blood lymphocytes to human umbilical vein endothelial cells. *FEBS Lett.*, 1994, V. 351, p. 215–218.
37. Eckert K., Grabowska E., Stange R., Schneider U., Maurer H. R. Effects of oral bromelain administration on the impaired immunocytotoxicity of mononuclear cells from breast cancer patients. *Oncol. Rep.*, 1999, V. 6, № 6, p. 1191–1199.
38. Desser L., Rehberger A. Induction of tumor necrosis factor in human peripheral-blood mononuclear cells by proteolytic enzymes. *Oncology*, 1990, V. 47, № 6, p. 475–477.
39. Desser L., Rehberger A., Paukovits W. Proteolytic enzymes and amylase Induce Cytokine Production in human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Cancer Biother.*, 1994, V. 9, p. 253–263.
40. Desser L., Rehberger A., Kokron E., Paukovits W. Cytokine synthesis in human peripheral blood mononuclear cells after oral administration of polyenzyme preparations. *Oncology*, 1993, V. 50, p. 403–407.

41. Zavadova E., Desser L., Mohr T. Stimulation of reactive oxygen species production and cytotoxicity in human neutrophils in vitro and after oral administration of a polyenzyme preparation. *Cancer Biother.*, 1995, V. 10, № 2, p. 147–152.
42. Klaue P., Dilbert G., Hinke G. Tierexperimentelle Untersuchungen zur enzymatischen Lokalbehandlung subdermaler Verbrennungen mit Bromelain. *Therapiewoche*, 1979, V. 29, p. 796–799.
43. Houck I. C., Chang C. M., Klein G. Isolation of an effective debriding agent from the stems of pineapple plants. *Int. J. Tissue React.*, 1983, V. 5, № 2, p. 125–134.
44. Ahle N. W., Hamlet M. P. Enzymatic frostbite eschar debridement by bromelain. *Ann. Emerg. Med.*, 1987, V. 16, № 9, p. 1063–1065.
45. Chaurasiya R. S., Sakhare P. Z., Bhaskar N., & Hebbar H. U. Efficacy of reverse micellar extracted fruit bromelain in meat tenderization. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, V. 52, № 6, p. 3870–3880.
46. Vishnu Priya V., Gayathri R., Geetha R. V., Thanish Ahamed S. Evaluation of Anti Microbial Activity of Pineapple Extract against Selected Oral Pathogen. *J. Pharm. Sci. & Res.*, 2016, V. 8, № 6, p. 491-492.
47. Hengameh K., Abdollah B., Hooman E., Kimia E., Zahra E. and Samira E. Assessing the Effect of Pineapple Extract Alone and in Combination With Vancomycin on *Streptococcus sanguis*. *Jundishapur J Nat Pharm Prod.*, 2012, V. 7, №4, p. 140–143.
48. Aravind Krishnan V. and M. Gokulakrishnan. EXTRACTION, PURIFICATION OF BROMELAIN FROM PINEAPPLE AND DETERMINATION OF ITS EFFECT ON BACTERIA CAUSING PERIODONTITIS. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2015, V. 6, № 12, p. 5284-5294.
49. Kleef, R., Delohery, T. M., & Bovbjerg, D. H. Selective Modulation of Cell Adhesion Molecules on Lymphocytes by Bromelain Protease 5. *Pathobiology*, 1996, V. 64, № 6, p. 339–346.