

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2023.138.194>

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ЗИМОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Обзор

Козлов С.Н.^{1*}, Марков Е.Ю.², Николаев В.Б.³, Урбанович Л.Я.⁴¹ ORCID : 0000-0001-7343-1379;² ORCID : 0000-0002-3693-7407;⁴ ORCID : 0000-0001-7814-1944;^{1, 2, 3, 4} Иркутский научно-исследовательский противочумный институт, Иркутск, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (ejimei[at]mail.ru)

Аннотация

Гидролитические ферменты – это биологически активные вещества, основной функцией которых является разрыв внутримолекулярных связей в субстрате при участии молекул воды, позволяя тем самым расщеплять органические соединения до мономеров. Повсеместное распространение гидролаз в разнообразных биологических объектах, в том числе у всех микроорганизмов, указывает на их важную роль в метаболизме, адаптации, персистенции, накапливаются сведения о том, что они как наряду с основными, могут выступать в качестве дополнительных факторов патогенности (вирулентности) возбудителей многих инфекционных заболеваний. Протозойные, бактериальные, вирусные, грибковые инфекции продолжают оставаться серьёзной проблемой для мирового здравоохранения в связи с постоянно регистрируемыми высокими показателями заболеваемости как в России, так и мире. Наиболее подходящими для изучения гидролаз являются зимографические методы, отличающиеся наглядностью и простотой выполнения. Цель настоящего обзора – провести анализ и обобщить современные данные литературы по применению зимографических методов в исследовании гидролитических ферментов различных биологических объектов, в том числе микроорганизмов. В обзоре рассмотрены история, принципы, преимущества и недостатки основных методов зимографии, используемых в различных областях биомедицины. Зимографические методы являются одним из универсальных и высокочувствительных способов обнаружения и изучения ферментов в сложных комплексных смесях и подразделяются на электрофоретические (прямая и непрямая зимография в геле), неэлектрофоретические (радиальная энзимодиффузия в агарозном геле) и гистохимические (зимография *in situ* и *in vivo*) виды анализа, наиболее распространённым из которых в практике стал вариант субстратного электрофореза в полиакриламидном геле. Отличительной особенностью зимографии по сравнению с другими методами изучения энзимов является возможность визуализировать каталитическую активность и состав гидролаз без предварительной процедуры их выделения и очистки, что во многом упрощает и удешевляет, делает менее времязатратным сам процесс анализа. Важным аспектом применения зимографии является её пригодность для детекции и анализа наличия гидролитических ферментов разных подклассов в биологических образцах, включая бактерии-возбудители опасных инфекций, а также возможности сравнения по степени их продукции, активности и степени вирулентности. Дальнейшая разработка и усовершенствование этих методов будет способствовать их ещё более глубокому внедрению в арсенал молекулярно-биологических методов изучения гидролитических ферментов патогенных микроорганизмов.

Ключевые слова: зимография, полиакриламидный гель, субстраты, гидролитические ферменты, холерный вибрион.

PROSPECTS FOR THE APPLICATION OF ZYMOGRAPHIC METHODS FOR THE STUDY OF HYDROLYTIC ENZYMES OF MICROORGANISMS

Review article

Kozlov S.N.^{1*}, Markov Y.Y.², Nikolaev V.B.³, Urbanovich L.Y.⁴¹ ORCID : 0000-0001-7343-1379;² ORCID : 0000-0002-3693-7407;⁴ ORCID : 0000-0001-7814-1944;^{1, 2, 3, 4} Irkutsk Research Antiplaque Institute, Irkutsk, Russian Federation

* Corresponding author (ejimei[at]mail.ru)

Abstract

Hydrolytic enzymes are biologically active substances whose main function is to break intramolecular bonds in the substrate with the participation of water molecules, thereby allowing the cleavage of organic compounds to monomers. The widespread distribution of hydrolases in a variety of biological objects, including all microorganisms, indicates their important role in metabolism, adaptation, and persistence. Information is accumulating that they, along with the main ones, can act as additional factors of pathogenicity (virulence) of pathogens of many infectious diseases. Protozoal, bacterial, viral, and fungal infections continue to be a serious problem for global health due to the constantly recorded high incidence rates both in Russia and in the world. The most suitable methods for studying hydrolases are zymographic methods, which are characterized by clarity [clearness illustrativeness visualization] and simplicity of implementation. The aim of the review was to analyze the current literature data on the use of zymographic methods in for the study of hydrolytic enzymes of various biological objects, including bacteria. In this the review covers considers the history, principles, advantages and disadvantages of the main

zymography methods used in various fields of biomedicine. Zymographic methods are one of the universal and highly sensitive methods of detection and study of enzymes in compound complicated complex mixtures and are divided into electrophoretic (direct and indirect zymography in gel), nonelectrophoretic (the radial enzyme diffusion in agarose gel) and histochemical (zymography *in situ* and *in vivo*) types of analysis, the most common of which in practice has become a variant of substrate electrophoresis in polyacrylamide gel. A distinctive feature of zymography compared with other methods of studying enzymes is the ability to visualize the catalytic activity and composition of hydrolases without a prior procedure of their isolation and purification, which greatly simplifies and reduces the cost, makes the analysis process less time-consuming. An important aspect of the application of zymography is its suitability for the detection and analysis of the availability of bacterial enzymes of different subclasses, including bacteria – causative agents of dangerous infections, as well as the possibility of comparison by the degree of their production, activity and degree of virulence. Further development and improvement of these methods will contribute to their even deeper introduction into the arsenal of molecular biological methods for studying hydrolytic enzymes of pathogenic microorganisms.

Keywords: zymography, polyacrylamide gel, substrates, hydrolytic enzymes, *Vibrio cholerae*.

Введение

Гидролазы (ЕС 3) – это группа ферментов, катализирующих реакции распада сложных веществ на более мелкие фрагменты с участием молекул воды. Реакции гидролиза вызывают расщепление пептидных связей в белках, гликозидных связей в углеводах, сложноэфирных связей в липидах и т. д. [1]. В течение длительного времени их функции связывали исключительно с катаболизмом питательных веществ и образованием соответствующих мономеров, используемых в качестве пластического материала и источника энергии и электронов. Однако к настоящему времени установлено, что им свойственен более широкий диапазон биологических и физиологических функций. Полногеномное секвенирование показало, что свыше 2% всех человеческих генов кодируют синтез протеаз или их ингибиторов, а из известных протеомов на долю протеаз приходится свыше 2% белков [2]. Это отражает важность процессов протеолиза в человеческом организме. Согласно современным представлениям, они осуществляют посттрансляционную модификацию белков, участвуют в межклеточных взаимодействиях, синтезе новых биоактивных молекул, генерировании молекулярных сигналов и образовании биологических плёнок. Важно отметить, что нарушения различных протекающих в организме человека ферментативных процессов гидролиза лежат в основе многих патологических состояний. Известно, что гидролазы обладают терапевтическим эффектом, вследствие чего на их основе ведётся поиск, разработка и производство в фармацевтической промышленности антибактериальных и противовирусных (антиретровирусных) антиферментных препаратов. Кроме того, наличие у многих болезнетворных микроорганизмов целого каскада гидролитических ферментов, относящихся к разным подклассам, позволяет изучать как экологические взаимодействия, особенности метаболической активности, так и их патогенетическую роль в генезе различных инфекционных заболеваний [3], [4], [5], [6]. Секреция гидролаз в постоянно меняющихся условиях окружающей среды во многом определяет стратегию выживаемости микроорганизмов к тем или иным неблагоприятным факторам среды обитания [7]. Все существующее разнообразие гидролитических ферментов, обнаруженных у многих патогенных для человека микроорганизмов, обуславливает необходимость их обнаружения и дальнейшего всестороннего изучения. Для этой цели служат и специально разрабатываются зимографические методы (от *англ.* (en)zyme – (эн)зим и *греч.* γραφῶ – чертить, изображать, писать), позволяющие качественно и количественно проводить их изучение с визуализацией в полиакриламидных гелях. А применяющиеся в настоящее время лабораторные методы анализа ферментов в основном касаются количественного учёта и оценки активности (спектрофотометрия) и не позволяют в полной мере провести изучение их состава и свойств. Определение наличия, количества и уровня активности гидролаз широко применяют в практике клинических лабораторных исследований. В частности, установлено, что уровень гидролаз повышается при некоторых типах рака [8], сердечно-сосудистых [9], воспалительных [10], нейродегенеративных заболеваниях [11]. От степени продукции матричных металлопротеаз зависит также и прогноз этих заболеваний. Эти обстоятельства указывают на огромное биологическое значение гидролаз во всех живых системах, что обуславливает необходимость разработки, усовершенствования и внедрения методов изучения и анализа ферментов, среди которых зимография занимает одно из первых мест по частоте применения в практике. В связи с большим количеством материалов по зимографии гидролаз (протеиназ) в настоящей статье невозможно охватить все публикации по данной проблеме, цель настоящего обзора дать общее представление об этом перспективном направлении среди микробиологических методов исследований.

История зимографии и основные принципы

В широком смысле термин «зимография» (реже «энзимография») обозначает любую методику визуализации каталитической активности ферментов разных классов по исчезновению субстрата или появлению окрашенного продукта реакции [12]. Применительно к гидролазам зимография обозначает визуализацию их каталитической активности в содержащем специфический субстрат носителе – агарозном, крахмальном, полиакриламидном гелях, полимерных плёнках и мембранах с использованием гистохимических методов. В свою очередь зимографические методы исследования гидролаз подразделяются на электрофоретические (зимография в геле) и гистохимические (зимография *in situ* и *in vivo*) [13]. Термин «зимограмма» был впервые предложен R.L. Hunter и C.L. Markett в 1957 г. применительно к выявлению локализации эстераз в крахмальном геле гистохимическими методами [14].

Комплекс электрофоретических методик, применяемых для обнаружения различных гидролитических ферментов, основан на инкорпорировании специфического субстрата либо непосредственно в разделяющий полиакриламидный гель [15], либо постэлектрофоретической (или после изофокусирования) инкубацией полиакриламидных гелей (ПААГ) в соответствующем растворе субстрата [16], либо переносе ферментов с разделяющего ПААГ на субстратсодержащие полиакриламидный, агарозный гели или фотоплёнку [17].

Необходимо отметить, что зимографические методы используются в первую очередь для выявления и характеристики протеаз. Диск-электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПАГЭ) проводится в невосстанавливающих условиях – без кипячения и без использования восстанавливающего агента (β -меркаптоэтанола). После электрофореза для ренатурации исследуемых ферментов гели обрабатывают раствором неионного детергента (как правило, это Тритон X-100), инкубируют при определённой температуре в буфере для инкубации в течение суток, фиксируют и окрашивают красителем. После процедуры отмывки гелей от избытка красителя в местах локализации фермента выявляются бесцветные полосы на фоне окрашенного субстрата [15]. Чаще всего в качестве белкового субстрата при используют желатин (желатиновая зимография), поскольку он легко подвергается гидролизу и не мигрирует из полиакриламидного геля [18]. Дополнительно успешно в качестве субстрата используют такие белки, как казеин [19], азоказеин [20], бычий сывороточный альбумин, желатин [21], альбумин и т. д. Обнаружение гидролаз в полиакриламидном геле с сополимеризованным субстратом является одной из разновидностей зимографического анализа и обозначается как «*in gel zymography*» (IGZ) – зимография в геле или субстратная зимография. Этот способ впервые был применён в 1978 г. при изучении плазминоген-активатора путём постэлектрофоретического переноса белков с полиакриламидного геля на фибрин-агаровую пластину геля [22] и в последующем получил наиболее широкое распространение (зимография с переносом) [23].

Выбор ПААГ в качестве наиболее удобного носителя был обусловлен несколькими факторами:

- 1) сама композиция геля может быть легко изменена, в связи с чем можно контролировать процесс лучшего разделения изоферментов при использовании эффекта «молекулярного сита»;
- 2) матрица геля является высокоомогенной;
- 3) отсутствие адсорбции и эндоэлектроосмоса;
- 4) химическая инертность и стабильность;
- 5) возможность получения ПААГ различных концентраций и степеней сшивок;
- 6) ПААГ прозрачен, что обеспечивает эффективность его использования для количественного анализа полос, обладающих энзиматической активностью при денситометрии ПААГ;
- 7) высокая воспроизводимость результатов;
- 8) возможность анализа очень низкоконцентрированных растворов (включая разные биологические жидкости и экстракты тканей) на наличие ферментов после электрофореза;
- 9) возможность использования для анализа многих мембранных ферментов;
- 10) возможность высушивания и длительного хранения.

В настоящее время разработано несколько разновидностей зимографических методов: **одномерная (1D) и двумерная (2D) зимография в геле**. Общий принцип выявления гидролаз методом прямой IGZ состоит из следующих этапов:

- 1) нанесение нативных образцов на ПААГ с сополимеризованным субстратом;
- 2) проведение электрофореза в денатурирующих условиях;
- 3) удаление избытков детергента в растворе Тритона X-100;
- 4) фиксация ПААГ;
- 5) окраска ПААГ;
- 6) «отмывка» ПААГ от избытка красителя и визуализация;
- 7) консервация гелей;
- 8) высушивание гелей;
- 9) документирование результатов.

Несомненным достоинством такого подхода является возможность использования ПААГ с разной концентрацией акриламида и сшивающего агента (бисакриламида) с инкорпорацией субстрата до полимеризации геля. При этом молекулы субстрата проникают в матрицу геля и оказываются между нитями полимера, закрепляясь равномерно по всему ПААГ. Однако распределение субстрата по сетке геля чаще всего происходит неравномерно, вследствие чего существует риск «вымывания» молекул субстрата, поэтому для более прочного и равномерного связывания с матрицей геля его ковалентно «сшивают» с линейным полиакриламидом с помощью глутарового альдегида [24]. После нанесения образцов проводится электрофорез, после которого гель помещается в раствор Тритона X-100 и происходит рефолдинг гидролаз, инкубируется в течение при 37 °С, фиксируется и окрашивается. Для выявления гидролаз разных подклассов в IGZ-варианте энзим-электрофореза гели могут быть импрегнированы различными полимерными органическими субстратами (полипептиды, липиды, полисахариды, нуклеиновые кислоты, коллоидный хитин и т. п.) с постэлектрофоретическим окрашиванием соответствующими красителями. Техника проведения: в начале проводится подготовка раствора ПААГ, используемый, как правило, в 8% концентрации, в него добавляется раствор требуемого субстрата в 0,1% конечной концентрации, перемешивается, добавляются инициаторы полимеризации и раствор заливается в блоки. После его полимеризации на него наливается раствор концентрирующего ПААГ, вносятся в лунки нативные образцы и проводится электрофорез, по окончании которого гели обрабатываются Тритоном X-100, инкубируются в буфере 0,1 N глицин-NaOH pH 8,3 в течение 3 часов, фиксируются раствором 20% трихлоруксусной кислоты, окрашиваются 0,25% раствором Coomassie R-250, отмываются от избытка красителя и визуализируются. Паттерны активных ферментов проявятся как бесцветные полосы на тёмном фоне геля.

В качестве отдельной разновидности IGZ можно выделить двумерную зимографию с комбинацией изоэлектрического фокусирования и субстратного электрофореза [25], неоспоримым достоинством которой является анализ образцов, содержащих гидролазы со схожей молекулярной массой, но разной изоэлектрической точкой, с последующей масс-спектрометрической идентификацией обнаруженных ферментов [26]. Она состоит из нескольких этапов:

- 1) изоэлектрофокусирование нативных образцов;

- 2) нанесение образцов после изоэлектрофокусирования в виде стрипов на ПААГ с сополимеризованным субстратом и проведения ДСН-электрофореза в денатурирующих, но не в невосстанавливающих условиях;
- 3) инкубация гелей после электрофореза в растворе Тритона X-100;
- 4) инкубация гелей в реакционном буфере для проявления ферментативной активности;
- 5) фиксация гелей;
- 6) окраска гелей красителем;
- 7) отмывка гелей от избытка красителя;
- 8) консервация и сушка гелей.

В случае успешного проведения такого анализа и выявления ферментов последние формируют на гелях пятна, соответствующие какой-либо индивидуальной гидролазе.

Зимография с переносом (TGZ, от *англ. transfer gel zymography*) или оверлейная зимография (от *англ. overlay zymography*). В последние годы в связи с развитием энзимологии появилось довольно много вариаций IGZ. Одной из таких разновидностей является «*transfer-gel zymography*», она же «*overlay zymography*» – зимография с переносом (TGZ).

При ней исходный ПААГ используется для разделения образцов, который после проведения электрофореза накладывается на субстратсодержащий индикаторный гель, в котором и происходит выявление ферментативной активности по наличию зон гидролиза специфического субстрата. TGZ состоит из нескольких этапов:

- 1) нанесение нативных образцов на 10–13% ПААГ;
- 2) проведение обычного электрофореза в денатурирующих условиях;
- 3) наложение ПААГ после электрофореза на агарозный гель с субстратом с последующей суточной инкубацией при 37 °C во влажной камере;
- 4) визуализация полученных результатов.

Существенным положительным моментом использования данного подхода является то, что можно использовать небелковые субстраты (синтетические эфиры, крахмал, целлюлозу и т. д.) для изучения отличных от протеаз гидролаз, а исходный ПААГ после переноса можно зафиксировать и окрасить на белки, тем самым сравнить и сопоставив результаты белкового профиля и профиля изучаемых ферментов. Кроме того, она позволяет, используя несколько вторичных индикаторных гелей с разными субстратами, одновременно получать информацию о большом количестве ферментов. В частности, на технике TGZ основано обнаружение тканевых плазминоген-активаторов путём конверсии профермента плазминогена под их действием в обладающий фибринолитической активностью плазмин с последующим гидролизом нерастворимого в воде фибрина, инкорпорированного в индикаторный гель в качестве субстрата в виде смеси тромбина с фибриногеном с образованием зон просветления [27]. Позже техника переноса была оптимизирована путём прямого добавления белкового субстрата в полиакриламидный гель, что позволило выявлять протеазы. Инкорпорация в гель одновременно желатина и плазминогена позволяет локально судить о превращении плазминогена в плазмин по деградации желатина [15]. Эта модификация впоследствии получила название «вторичной прямой зимографии», которая часто ассоциируется с одnogелевой системой и превращением субстрата вторым ферментом в цепи. С помощью простой инкорпорации желатина в гель такие ферменты, как матриксные металлопротеиназы (ММП-2, ММП-9 и др. желатиназы) можно легко детектировать и оценивать уровень их очистки [28], экспрессии [29], ингибции [30] и процессы специфической деградации [31]. К модификациям TGZ также относится постэлектрофоретический перенос и электроперенос ферментов с разделяющих полиакриламидных гелей на субстратсодержащие полиакриламидные гели с определением от одной до трёх гидролаз (протеазы, липазы, целлюлазы) одновременно [32].

В целом IGZ применяется для обнаружения и идентификации ферментов или целого набора ферментов и их ингибиторного профиля, являясь основной техникой для изучения регуляции экспрессии и посттрансляционной модификации протеиназ.

Постэлектрофоретическая детекция является дополнительным вариантом зимографии, который может применяться для детекции гидролаз, первым этапом которого является подготовка и заливка в блоки ПААГ без субстрата. Вначале проводится обычный ДСН-электрофорез с предварительно нанесёнными нативными образцами в невосстанавливающих условиях, при добавлении в некоторых случаях β-меркаптоэтанола, когда имеется необходимость в изучении влияния восстанавливающих агентов на ферментативную активность. После электрофореза гели также обрабатывают раствором 2,5% Тритона X-100, инкубируют в буфере с субстратом, фиксируют в растворе 20% ТХУК, либо в растворе спирт:уксусная кислота:вода, окрашивают, отмывают от избытка красителя и фотодокументируют. О проявлении гидролазной активности судят по появлению прозрачных полос на окрашенном фоне геля.

Данный вид зимографии выявил β-лактамазы в периплазме клеток карбапенем-устойчивых изолятов *E. coli* с использованием хромогенного субстрата – нитроцефина – β-лактамной молекулы, продукт гидролиза которой под действием соответствующей β-лактамазы приобретает интенсивно-красный цвет [33].

Постэлектрофоретическая детекция является вариантом IGZ, поскольку предусматривает проведение обычного ДСН-электрофореза со стандартными режимами с последующей инкубацией геля в буфере с субстратом и отмывкой.

Зимография в «реальном времени» (RTZ, от *англ. real-time zymography*) представляет собой выявление протеазной активности в ПААГ с использованием меченых флуоресцентными красителями субстрата (казеин, меченый Техасским красным и ФИТЦ-меченый желатин) с визуализацией ферментативной активности с использованием УФ-трансиллюминатора с соответствующими оптическими фильтрами [34]. Этот метод отличается высокой чувствительностью при низкой концентрации субстрата по сравнению с другими методами, возможностью оптимизации времени инкубации, отсутствием необходимости окраски гелей. Особенностью является возможность фотографирования геля с различными временными интервалами, что позволяет проводить денситометрию и оценку

ферментативной активности в динамике, изучение влияния pH на активность, а после окончания максимального времени инкубации осуществлять окраску геля стандартным красителем с последующим его сравнением с гелем, сфотографированным в УФ-режиме [34].

Реверсная (обратная) зимография – это такой вариант электрофореза в ПААГ, предназначенный для детекции ингибиторов гидролаз, преимущественно протеаз. Своё название этот вид зимографии получил из-за особенностей визуализации: при обычной зимографии активные ферменты видны как неокрашенные полосы на тёмном фоне субстрата, в случае реверсивной наоборот – ингибиторы протеаз белковой природы проявляются как тёмные окрашенные полосы на светлом фоне. После электрофореза и ренатурации белков, субстрат-содержащий ПААГ инкубируют в растворе исследуемой протеиназы, гидролизующей субстрат, инкорпорированный в гель. Ингибиторы белковой природы, присутствующие в исследуемом материале, проявляются как тёмные зоны на неокрашенном красителем геле [35].

Реверсная зимография используется для определения типа обнаруженного ингибитора фермента (ферментов). Кроме того, особенностью этого метода является использование ПААГ и образцов без ДСН вследствие известного его ингибирующего действия в отношении протеиназ, в котором отсутствует этап обработки гелей Тритоном X-100 для освобождения от него. Недостатком является сложность подбора времени инкубации гелей, вследствие чего в качестве субстрата часто используют флуоресцентно меченые субстраты, а процедура окрашивания гелей «останавливает» реакцию ингибирования, также сложно подобрать оптимальную концентрацию ингибитора и не всегда удаётся подтвердить присутствие ингибитора. Поэтому из-за сложностей отличия ингибитора протеаз от белка, устойчивого к действию протеолиза, полученные результаты необходимо подтверждать с помощью других методов ингибиторного анализа [36].

Антителная зимография позволяет определять протеазо-нейтрализующий потенциал специфичных антител и представляет собой модификацию традиционного субстратного электрофореза, которая позволяет идентифицировать антитела, способные нейтрализовать протеазы [37]. Введение очищенных специфических антител в ПААГ сохраняет их нейтрализующую гидролазную активность протеаз и существенно не влияет на электрофоретическую подвижность последних, что нашло применение для поиска антител, нейтрализующих действие протеаз змеиного яда [37].

Так, например, с помощью **иммунозимографии** выявлена в активной форме ММП-3 (стромелизин-1) в промывной жидкости височно-нижнечелюстного сустава субстратным электрофорезом иммунопреципитата стромелизина-1 с антителами против него [38]. Фракцию промывной жидкости инкубировали с антителами против стромелизина-1 и образовавшийся преципитат был далее зимографически анализирован.

К иммунозимографии отнесён и метод детекции эндогенно активной и тотально активной ММП-9, базирующийся на использовании стандартного твёрдофазного иммуноферментного анализа в 96-ти луночных планшетах и хромогенного субстрата с коммерческим набором реактивов, выпускаемых фирмой «QuickZyme BioSciences» (Leiden, Netherlands) [39]. В этом случае образец наносится в лунки, предварительно сенсibilизированных антителами, специфичными к ММП-9. После их иммобилизации добавляют специальный детектирующий профермент и после его активации происходит высвобождение красителя из хромогенного пептидного субстрата. Оптическую плотность образовавшегося раствора измеряют при 405 нм на планшетном спектрофотометре. Это позволяет детектировать и наличие в образцах *про*-ММП-9, превращающиеся с помощью *ацетата 1,4-аминофенил ртутти* (АРМА) в активную форму с последующим определением пептидазной активности как указано выше. Энзиматическая конверсия субстрата в окрашенный продукт прямо коррелирует с количеством активных ММП и позволяет определять их концентрацию с пределом чувствительности до 0,1 пг/мл с высокой степенью специфичности [39].

Микрофлюидная зимография (микрогидродинамическая) в градиентном геле представляет собой новое направление оценки молекулярной массы, количества и активности фермента в одном разделяющем канале микрочипа. На первом этапе гетерогенную белковую смесь, содержащую щелочную фосфатазу из кишечника телёнка, подвергают электрофорезу в гелях с градиентом концентрации полиакриламида в течение 20 мин. На втором этапе после электрофоретического внедрения в гель фосфатного субстрата DiFMUP (6,8-дифтор-4-метилубеллифелир фосфата) в место иммобилизованного фермента и остановки потока («stopped-flow») активность щелочной фосфатазы проявляется в виде поперечной (аксиальной) голубой полосы сильно флуоресцирующего продукта реакции DiFMU (6,8-дифтор-7-гидрокси-4-метилкумарин) [40], что позволяет получить количественную кинетику и информацию о размере мол. массы исследуемой гидролазы. Большим преимуществом микрофлюидных аналитических систем являются высокая чувствительность и малые количества исследуемых проб.

Зимография in situ (ISZ, от англ. *in situ* zymography) – это техника, позволяющая изучать и получать информацию об активности ферментов и их локализации в срезах тканей или клетках [41]. В её основе лежит использование геля с сополимеризованным белковым субстратом, контактирующего со срезом ткани, с последующим фотографированием ткани, содержащей флуоресцентно-меченый белковый субстрат [42]. При этом не используются жёсткие методы фиксации образцов тканей во избежание потери активности фермента, ткани должны быть свежими либо замороженными. Соответственно, срезы тканей могут быть предварительно обработаны специфическими ингибиторами и ISZ может быть дополнена данными по ингибированию изучаемых ферментов [43]. Чувствительность метода повышается в несколько раз с использованием меченого ФИТЦ желатина с погашенной флуоресценцией (dye quenched), и составляет несколько наногаммов на мл в тестируемых образцах [44]. После расщепления DQ-желатина под действием протеаз образуются флуоресцирующие пептиды, визуализируемые на фоне слабой флуоресценции.

Роль специфических протеиназ при различных физиологических и патологических состояниях может быть лучше изучена с использованием ISZ, особенно в её параллельном сочетании с другими методами – иммуноцитохимическими, «гибридизацией на месте» и Вестерн-блоттингом. Однако прямая зимография и вестерн-блоттинг применяются для анализа ферментов, активность которых находится в прямой зависимости от концентрации белка, но не дают информации о локализации ферментов (протеаз) в тканях [45]. ISZ позволяет обнаруживать

присутствие активных протеаз в тканях с возможностью связывания их активности с действием специфических протеаз, используя анти-желатиновые моноклональные антитела [42].

Относительно недавно была разработана новая модификация ISZ – «*film in situ zymography*» (FISZ), основанная на детекции активности тканевых ММП с использованием полиэфирных плёнок с тонко и равномерно нанесённым на их поверхность желатином. После инкубации на замороженном гистологическом срезе плёнки окрашиваются коллоидным красителем Viebrich scarlet, и неокрашенные зоны соответствуют областям активности ММП. Такой подход оказался простым и позволял определять ферментативную активность количественно, что нашло применение при изучении и анализе многих заболеваний человека, связанных с активностью ММП [46]. Однако их чувствительность во многом зависит от эффективности мечения субстрата и его расщепления, поскольку активность можно локализовать лишь в соответствии с исчезновением флуоресцентного сигнала. Только интенсивно меченый субстрат позволяет получить высокую чувствительность и стандартизированные данные, поэтому иногда ISZ может быть предпочтительна для изучения ферментов [47]. ISZ определяет активность ферментов, деградирующих выбранный субстрат (как правило, это протеазы), следовательно, определяемая активность в основном зависит от сродства фермента и субстрата. Так как большинство субстратов в той или иной степени расщепляются различными протеазами, то возникает сложность идентификации протеазы, ответственной за гидролиз данного субстрата. Поэтому для точного определения протеазы, ответственной за генерацию того или иного сигнала в ISZ, её часто комбинируют с гибридизацией *in situ*, либо с использованием ингибиторов [47].

Активография – это частный случай зимографии *in situ*, отличающийся тем, что при нём для полуквантитативного выявления уровней специфической протеолитической активности и её пространственной локализации используют флуоресцентные зонды (активированные пробы), внедряемые в биоптаты тканей и реагирующие с активными формами специфических ферментов, которые при изменении тканей вследствие разных заболеваний кожи дают специфическую флуоресценцию [48].

Зимография *in vivo* (IVZ, от англ. *in vivo zymography*). Для более детального и наглядного моделирования процессов изменений компонентов экстрацеллюлярного матрикса, являющегося основным компонентом соединительных тканей живых организмов во время эмбриогенеза, морфогенеза, остеогенеза, роста, ангиогенеза, метастазирования опухолей, преимущественно зависящих от уровня активности ММП, разработана так называемая «*in vivo zymography*» (IVZ), основанная на использовании флуорогенной пробы, активируемой протеазами [49]. Для проведения IVZ необходим флуорогенный субстрат, выявляемый после дезинтеграции в процессе протеолитического расщепления пептидной связи. В этом методе две молекулы донора (гасителя флуоресценции) и акцептора (флуорофора) присоединены к протеазо-чувствительным пептидам с двух противоположных сторон. При близком расположении этих двух молекул в интактном пептиде, флуоресценция минимальна из-за обмена энергией между флуорофором и гасителем. После расщепления пептида флуорофор и гаситель диффундируют, что позволяет фиксировать интенсивность флуоресценции во флуоресцентном микроскопе. Пептидный субстрат может быть выбран на основе известных консенсусных последовательностей для специфичной протеазы или класса протеаз. При этом в качестве субстратов используют активированные пептидные флуорофоры и пептиды с гасителем флуоресценции, а также с фототушением флуоресценции, каждый из которых чувствителен (специфичен) к определённому ферменту [50]. Удобной моделью в этом случае являются ткани эмбриона данио-рерио, находящиеся на стадии дифференцировки и в которые вводят субстраты. При действии соответствующих ММП происходят изменения экстрацеллюлярного матрикса, за которыми проводятся наблюдения в динамике (как правило, для эмбриональных тканей это трое суток) у опытной группы животных, от которых берутся срезы тканей, фиксируются в параформальдегиде и исследуются с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии при одновременном сравнении с образцами тканей, взятых у контрольной группы животных, которым была проведена коинъекция смесью разных субстратов для проверки гетерогенности продуктов деградации и их локализации в тканях. Анализ и последующая интерпретация оцифрованных снимков результатов микроскопии тканей проводится по учёту интенсивности флуоресцентных сигналов, линейно коррелирующее с энзиматической активностью и прямо пропорционально концентрации и удельной активности обнаруженных ферментов в зависимости от времени инкубации. В случае отсутствия ММП-зависимого протеолиза тканей флуоресцентный сигнал не детектируется и изменений в тканях не будет выявлено. С помощью этого вида зимографии можно сразу определить типы деградируемых субстратов и их локализацию, типы работающих ферментов и ингибиторов, уровень их активности не только в срезах, но и лизатах тканей, где уровень активности этих ферментов можно измерить *in vitro* в наномолярных количествах на разных этапах закладки тканей. Однако даже в случае использования зимографии *in vivo*, ЕСМ-деградация тканей обусловлена действием сразу целого комплекса ММП, в связи с чем эксперименты по изучению протеаз в опытах *in vivo* дополняются прямой гель-зимографией в ПААГ для разграничения действия ММП и их дальнейшей характеристики (определение молекулярной массы и др.), что нельзя провести в опытах *in vivo*. Одной из существенных проблем зимографии *in vivo* является то, что на силу флуоресцентного сигнала влияет количество субстрата (не весь субстрат связывается), степень фиксации срезов тканей, время и температура инкубации клеточного лизата, наличие либо отсутствие в тканях эндогенных ингибиторов. При оптимальных величинах и соотношениях указанных факторов достигается необходимая для улавливания флуоресценция, что в свою очередь позволяет правильно интерпретировать полученные данные.

RED-месты (от англ. radial enzyme diffusion) являются ещё одним из вариантов зимографических методов (неэлектрофоретических). Существенным отличием их от других (электрофоретических) методов является использование агара/агарозы в качестве носителя субстрата на поверхности чашек Петри [51]. Сущность метода состоит в диффузии активных молекул фермента, содержащегося в анализе, равномерно по всей площади субстрата, импрегнированного в агар/агарозу. При этом в результате специфического взаимодействия фермента с субстратом происходит гидролиз субстрата при 37 °С во влажной камере (термостат) в течение 24–48 часов.

После окончания инкубации чашки (в случае с белковыми субстратами) заливаются 20% трихлоруксусной кислотой на полчаса, после чего в косопроходящем свете визуализируется результат – в случае наличия в образце активных ферментов активность будет видна в виде прозрачных колец просветления на мутном фоне агарозы с субстратом. Для оценки степени активности образцов измеряют радиусы зоны просветления в миллиметрах, и проводят дальнейшее сравнение образцов по стандартному положительному контролю. Однако в случае RED-тестов изучается и оценивается только наличие и общая (суммарная) энзиматическая активность.

Следует отметить, что в рутинной энзимологической практике RED-тесты обычно предшествуют электрофоретическим методикам и предназначены в первую очередь для качественного обнаружения наличия тех или иных гидролаз. При постановке RED-тестов используются как белковые, так и не белковые субстраты; в зависимости от размера (диаметра) чашек Петри можно проводить одновременно детекцию наличия ферментативной активности в нескольких десятках образцов; имеется возможность сразу провести анализ на определение гидролаз, относящихся к разным типам (используя несколько разных субстратов), можно проводить ингибиторный анализ благодаря отсутствию некоторых ограничений, присущих электрофоретическим методикам. Однако одной их особенностью является полуколичественный учёт результатов (определение размера гидролиза субстрата вокруг лунок с образцами), что делает RED-тесты вспомогательным дополнительным инструментом при проведении зимографического анализа.

В дополнение к основным имеющимся вариантам использования IGZ довольно часто этот метод применяют и в клинических исследованиях. IGZ широко применяется для обнаружения гидролаз у растений [52], и животных [53].

Основные преимущества и недостатки зимографии

С помощью IGZ можно получить информацию об уровне активности специфических форм изучаемых ферментов, молекулярной массе и присутствии ковалентных комплексов потенциально активных фрагментов фермента в биологических образцах. Однако она не даёт исчерпывающей информации об общей энзиматической активности (в частности, протеолитической) в исследуемых образцах вследствие частых ошибочных интерпретаций результатов экспериментов из-за появления артефактов. Так, например, большинство матриксных металлопротеиназ секретируется в виде неактивных форм, содержащих ингибиторный пропептидный домен. В естественных условиях их активация происходит посредством протеолиза пропептида, в условиях электрофореза он подвергается рефолдингу и ингибиторный фрагмент удаляется с каталитического сайта фермента с помощью ДСН. Постэлектрофоретическая обработка гелей приводит к частичному рефолдингу пропептидов, что приводит к визуализации каталитически активной формы фермента или частично инактивированных зимогенов. Вследствие того, что пропептиды ковалентно связаны с зимогеном, после электрофореза проформы фермента будут иметь больший молекулярный вес, чем активированная форма фермента без пропептида [54]. Более того, нековалентно связанные комплексы (ингибитор-фермент) диссоциируют в присутствии ДСН во время электрофореза [55]. Поэтому полосы активных ферментов не дают возможности измерить общую ферментативную активность в образце, так как там можно не увидеть потенциально ферментативно активных фрагментов [56]. Такие неудачно проведённые эксперименты по гель-зимографии часто неверно интерпретируются и могут быть приняты за «ферментативную активность», в то время как на самом деле детектируется либо активированная проформа фермента, либо в исследуемом образце недостаток ингибиторов. Для более точного определения тотальной (общей) энзиматической активности разработаны и внедрены альтернативные методики с использованием флуорогенных [57], биотилированных [58], меченных радиоактивными изотопами субстратов [59].

IGZ в целом позволяет оценить относительную молекулярную массу изучаемого фермента, используя гидролазы с известной молекулярной массой в качестве стандартов [60]. Однако при проведении TGZ вследствие диффузии белков при переносе на индикаторный гель неизбежно происходит распад белков на множество субъединиц, что может приниматься за проявление дополнительных белков с ферментативной активностью, и также образование «полос», которые ухудшают качество визуализации и фотодокументирования такого геля. Сопутствующими недостатками TGZ является длительное время инкубации гелей для достаточного переноса, оптимальное время инкубации подбирается эмпирически, метод полуколичественен и менее чувствителен, чем IGZ.

Комбинируя эти методы, появилась возможность изучать не только протеазы, а вообще весь набор гидролитических ферментов у исследуемого объекта («зимопротеом») [61], что позволяет параллельно проводить количественную оценку и профилирование большого набора ферментов из сложных белковых смесей из цельных белковых лизатов с помощью двумерного электрофореза. Он включает в себя разделение белков согласно их изоэлектрическим точкам, молекулярной массе, растворимости и относительной электрофоретической подвижности. 2D электрофорез, в соответствии с концентрацией геля и используемого pH-градиента, может обнаруживать свыше 5000 белков одновременно и обладать чувствительностью около 1 пикограмма белка на пятно, однако коллагеновая зимография обладает схожей чувствительностью [62]. В первом направлении, основанном на изоэлектрофокусировании, возможно разделение индивидуальных белков, что особенно подходит для изучения сложного биологического материала – экстрактов органов, тканевых экстрактов, или образцов крови. Белки с вариабельной структурой, такие как гликозилированные или фосфорилированные, тоже легко подвергаются разделению в первом направлении, после чего следует энзим-электрофорез (второе направление). Индивидуальные белки в гелях могут быть идентифицированы масс-спектрометрией после их вырезания из геля и трипсинолиза. Однако вследствие большого наличия в геле молекул субстрата дальнейший анализ и идентификация индивидуальных ферментов может быть затруднена.

Тем не менее с использованием только одного метода IGZ невозможно провести детальный анализ (с определением основных физико-химических характеристик и типа присутствующих в исследуемом объекте ферментов). Поэтому для решения этих задач целесообразно проведение полного зимографического анализа. Полный зимографический анализ включает в себя все основные зимографические (электрофоретические) приёмы: 1D-зимографию, 2D-зимографию, зимографию «на месте», «зимографию реального времени», иммунозимографию,

многослойную субстратную зимографию, зимографию *in vivo*, микрофлюидную зимографию, реверсивную зимографию, зимографию «с переносом» и позволяет изучить наличие, спектр различных как внеклеточных, так и внутриклеточных ферментов, ингибиторный профиль, ферментативные свойства отдельно взятого белка или смеси белков. В отдельных случаях, где требуется провести моделирование изменения тканей, вызванных действием матриксных протеаз, методом выбора будет зимография *in vivo*. Для точного количественного учёта и локализации ферментативной активности в практике клинических исследований в клеточных культурах или лизатах клеток используют метод *in vitro*. Их существенным преимуществом по сравнению с препаративными биохимическими методами является возможность изучения гидролитических ферментов без их хроматографического выделения, что во многом упрощает и удешевляет, делает менее времязатратным проведение подобных экспериментов, обеспечивая всю необходимую полноту и информативность получаемых результатов при работе с ферментами бактерий.

Наиболее часто в практике зимографического анализа применяются IGZ, ISZ, и IVZ, однако между ними имеются существенные различия, в зависимости от цели использования, материала для исследования, выбранного субстрата, чувствительности, степени разрешения, и, соответственно, стоимости.

Таким образом, методики, входящие в систему зимографического анализа, представляют собой весьма высокочувствительный и специфичный инструмент, который позволяет в полной мере изучать свойства, состав, и, в ряде случаев, локализацию ферментов без их выделения и очистки при низкой концентрации фермента в пробе. Эти преимущества особенно выражены при исследовании микробных ферментов, которые невозможно определять и тестировать химическими, титриметрическими и спектрофотометрическими методами. Этим объясняется применение IGZ в клинических лабораториях при диагностике инфекционных и неинфекционных заболеваний. В качестве одного из важных энзимологических направлений рассматривается применение IGZ как дополнительного экспресс-метода для исследования не только клинического материала, но и объектов окружающей среды при определении потенциальной загрязнённости водоёмов, а также для определения вирулентности возбудителя на основании предварительной детекции генов вирулентности [63]. Это становится всё более актуальным, поскольку в последнее время появилась возможность проведения количественного зимографического анализа исследуемого материала за счёт внедрения зимографии «в реальном времени» (RTZ) [34].

В рамках мониторинга и эпиднадзора за некоторыми возбудителями инфекционных заболеваний зимографические методы, в частности IGZ, находят применение как инструмент выявления микробных ферментов, которые могут рассматриваться как дополнительный критерий вирулентности изолятов возбудителя. При этом на начальном этапе использования IGZ разработан и внедрён как способ для обнаружения мембрансвязанных протеаз холерных вибрионов разного происхождения, предложен способ определения липолитической активности в субклеточных фракциях холерных вибрионов [64]. Перспективным является активное применение и внедрение зимографических методов (IGZ) в молекулярной эпидемиологии с целью выявления целого спектра гидролитических ферментов (хитиназ, нуклеаз и т. д.), ассоциированных с эпидзначимостью и вирулентностью штаммов патогенных бактерий при детекции соответствующих генов [65].

Заключение

Резюмируя вышесказанное, для определения, обнаружения и тестирования гидролитических ферментов существует множество методик. На современном этапе неоспоримым и очевидным преимуществом обладают зимографические методы анализа, ориентированные на прямую детекцию ферментативной активности гидролаз, играющих роль в вирулентности микроорганизмов, а также в патогенезе и клинике неинфекционных заболеваний. Их использование позволяет быстро и эффективно исследовать спектр и состав разных гидролаз.

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

Conflict of Interest

None declared.

Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

Список литературы / References

1. Gurung N. A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond / N. Gurung, S. Ray, S. Bose [et al.] // *Biomed. Res. Int.* — 2013. — Article ID 329121. — 18 p. — DOI: 10.1155/2013/329121.
2. Antalis T.M. Membrane-anchored Serine Proteases in Health and Disease / T.M. Antalis, T.H. Bugge, Q. Wu // *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* — 2011. — Vol. 99. — P. 1-50. — DOI: 10.1016/B978-0-12-385504-6.00001-4.
3. Báez-Santos Y. The SARS-coronavirus Papain-like Protease: Structure, Function, and Inhibition by Designed Antiviral Compounds / Y. Báez-Santos, S.E. John, A.D. Mesecar // *Antivir. Res.* — 2015. — Vol. 115. — P. 21-38. — DOI: 10.1016/j.antiviral.2014.12.015.
4. Siqueira-Neto J.L. Cysteine Proteases in Protozoan Parasites / J.L. Siqueira-Neto, A. Debnath, L.I. McCall [et al.] // *PLoS Negl. Trop. Dis.* — 2018. — Vol. 12, N 8: e0006512. — DOI: 10.1371/journal.pntd.0006512.
5. Kurnatowski P. The Hydrolytic Enzymes Produced by Fungi Strains Isolated from the Sand and Soil of Recreational Areas / P. Kurnatowski, A. Wójcik, J. Błaszczowska [et al.] // *Ann. Parasitol.* — 2016. — Vol. 62, N. 3. — P. 201—208. — DOI: 10.17420/ap6203.55.

6. Miyoshi S.I. Extracellular Proteolytic Enzymes Produced by Human Pathogenic *Vibrio* Species / S.I. Miyoshi // *Front. Microbiol.* — 2013. — Vol. 4, Article 339. — P 1.-8. — DOI: 10.3389/fmicb.2013. 00339.
7. Cunha A. Bacterial Extracellular Enzymatic Activity in Globally Changing Aquatic Ecosystems / A. Cunha, A. Almeida, F.J.R.C. Coelho [et al.] // *Current Research Technology and Rducation Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.* — 2010. — Vol.1. — P. 124-135.
8. Sliwowska I. Zymography-method for Quantitation of Activity on Gelatinase A (pro-MMP-2, 72 kDa) and Gelatinase B (pro-MMP-9, 92 kDa) in Serum of Patients with Breast Cancer / I. Sliwowska, Z. Kopczyński // *Wiad.Lek.* — 2007. — Vol. 60, N. (5-6). — P. 241-247.
9. Иртюга О.Б. Активность матричных металлопротеиназ у больных с аневризмой восходящего отдела аорты различной этиологии / О.Б. Иртюга, И.В. Воронкина, Л.В. Смагина [и др.] // *Артериальная гипертензия.* — 2010. — Т. 16, № 6. — С. 587-591.
10. Parks W.C. Matrix Metalloproteinases as Modulators of Inflammation and Innate Immunity / W.C. Parks, C.L. Wilson, Y.S. Lopez-Boado // *Nature Reviews Immunol.* — 2004. — Vol. 4, N 8. — P. 617-629. — DOI: 10.1038/nri1418.
11. Paemen L. Evaluation of Gelatinases and IL-6 in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Optic Neuritis, Multiple Sclerosis and Other Inflammatory Neurological Diseases / L. Paemen, T. Olsson, M. Soderstrom [et al.] // *Eur. J. Neurol.* — 1994. — Vol. 1, N. 1. — P. 55-63. — DOI: 10.1111/j.1468-1331.1994.tb00051.x.14.
12. Rothe G.M. Electrophoresis of Enzymes: Laboratory Methods / G.M. Rothe // — Berlin: Springer, 1994. — 141-179 p.
13. Vandooren J. Zymography Methods for Visualizing Hydrolytic Enzymes / J. Vandooren, N. Geurts, E. Martens [et al.] // *Nat. Methods.* — 2013. — Vol. 10, N. 3. — P. 211-220. — DOI: 10.1038/nmeth.2371.
14. Hunter R.L. Histochemical Demonstration of Enzymes Separated by Zone Electrophoresis in Starch Gels / R.L. Hunter, C.L. Markett // *Science.* — 1957. — Vol. 125, N. 3261. — P. 1294-1295.
15. Heussen C. Electrophoretic Analysis of Plasminogen Activators in Polyacrylamide Gels Containing Sodium Dodecyl Sulfate and Copolymerized Substrates / C. Heussen, E.B. Dowdle // *Anal. Biochem.* — 1980. — Vol. 102, N. 1. — P. 196-202. — DOI: 10.1016/0003-2697(80)90338-3.
16. Lundy F.T. A New Method for the Detection of Proteolytic Activity in *Pseudomonas Lundensis* after Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide Gel Electrophoresis / F.T. Lundy, A.C. Magee, I.S. Blair [et al.] // *Electrophoresis.* — 1995. — Vol. 16, N. 1. — P. 43-45. — DOI: 10.1002/elps.1150160110.
17. Paech C. Zymogram of Protease Made with Developed Film from Nondenaturing Polyacrylamide Gels after Electrophoresis / C. Paech, T. Christianson, K.H. Maurer // *Anal. Biochem.* — 1993. — Vol. 208, N 2. — P. 249-254. — DOI: 10.1006/abio.1993.1041.
18. Michaud D. Assessing the Stability of Cystatin/Cysteine Proteinase Complexes Using Mildly-denaturing Gelatin-polyacrylamide Gel Electrophoresis / D. Michaud, L. Cantin, D.A. Raworth [et al.] // *Electrophoresis.* — 1996. — Vol. 17, N. 1. — P. 74-79. — DOI: 10.1002/elps.1150170113.
19. Banik R.M. Purification and Characterization of Laundry Detergent Compatible Alkaline Protease from *Bacillus Cereus* / R.M. Banik, M. Prakash // *Ind. J. Biotechnol.* — 2006. — Vol. 5, N. 3. — P. 380-384.
20. Vazquez Peyronel D. A Simple and Rapid Technique for Postelectrophoretic Detection of Proteases Using Azocasein / D. Vazquez Peyronel, A.M. Cantera // *Electrophoresis.* — 1995. — Vol. 16, N. 10. — P. 1894-1897. — DOI: 10.1002/elps.11501601311.
21. Gonzalez-Paez G.E. Proteinases in Excretory-secretory Products of *Toxocara Canis* Second-stage Larvae: Zymography and Modeling Insights / G.E. Gonzalez-Paez, F. Alba-Hurtado, C.G. Garcia-Tovar [et al.] // *J. BioMed Research International.* — 2014. — P. 1-9. — DOI: 10.1155/2014/418708.
22. Granelli-Piperno A. A Study of Proteases and Protease-inhibitor Complexes in Biological Fluids / A. Granelli-Piperno, E. Reich // *J. Exp. Med.* — 1978. — Vol. 148, N. 1. — P. 223-234.
23. Curino A. Detection of Plasminogen Activators in Oral Cancer by Laser Capture Microdissection Combined with Zymography / A. Curino, V. Patel, B.S. Nielsen [et al.] // *Oral. Oncol.* 2004. — Vol. 40, N 10. — P. 1026-1032. — DOI: 10.1016/j.oraloncology.2004.05.011.
24. Kelleher P.J. Detection of Proteases in Polyacrylamide Gels Containing Covalently Bound Substrates / P.J. Kelleher, P.L. Juliano // *Anal. Biochem.* — 1984. — Vol. 136, N. 2. —P. 470-476. — DOI: 10.1016/0003-2697(84)90246-x.
25. Chen S. Two-dimensional Zymography Differentiates Gelatinase Isoforms in Stimulated Microglial Cells and in Brain Tissues of Acute Brain Injuries / S. Chen, F. Meng, Z. Chen [et al.] // *PLoS One.* — 2015. — Vol. 10, N. 4. — e023852. — DOI: 10.1371/journal.pone.012385291.
26. Ong K.L. Analysis of Proteins from Different Phase Variants of the Entomopathogenic Bacteria *Photobacterium luminescens* by Two-dimensional Zymography / K.L. Ong, F.N. Chang // *Electrophoresis.* — 1997. — Vol. 18, N. 5. — P. 834-839. — DOI: 10.1002/elps.115018053091.
27. Yoon B.K. Impact of Lysophosphatidylcholine on the Plasminogen Activator System in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells / B.K. Yoon, Y.H. Kang, W. J. Oh [et al.] // *J. Korean Med. Sci.* — 2012. — Vol. 27, N. 7. — P. 803-810. — DOI: 10.3346/jkms.2012.27.7.803.
28. Masure S. Purification and Identification of 91-kDa Neutrophil Gelatinase / S. Masure, G. Opdenakker, P. Proost [et al.] // *Eur. J. Biochem.* — 1991. — Vol. 198, N. 2. — P. 391-398. — DOI: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16027.x.
29. Masure S. Human Hepatoma Cells Produce an 85 kDa Gelatinase Regulated by Phorbol 12-myristate 13-acetate / S. Masure, A. Billiau, J. Van Damme [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1990. — Vol. 1054, N. 3. — P. 317-325. — DOI: 10.1016/0167-4889(90)90103-k.

30. Paemen L. The Gelatinase Inhibitory Activity of Tetracyclines and Chemically Modified Tetracycline Analogues as Measured by a Novel Microtiter Assay for Inhibitors / L. Paemen, E. Martens, K. Norga [et al.] // *Biochem. Pharmacol.* — 1996. — Vol. 52, N. 1. — P. 105-111. — DOI: 10.1016/0006-2952(96)00168-2.
31. Van den Steen P.E. Biochemistry and Molecular Biology of Gelatinase B or Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) / P.E. Van den Steen, B. Dubois, I. Nelissen [et al.] // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* — 2002. — Vol. 37, N. 6. — P. 375-536. — DOI: 10.1080/10409230290771546.
32. Pan D. Electrophoretic Transfer Protein Zymography / D. Pan, A.P. Hill, A. Kashou [et al.] // *Anal. Biochem.* — 2011. — Vol. 411, N. 2. — P. 277-283. — DOI: 10.1016/j.ab.2011.01.015.
33. Goessens W.H.F. Antibiotic Trapping by Plasmid-encoded CMY-2 β -lactamase Combined with Reduced Outer Membrane Permeability as a Mechanism of Carbapenem Resistance in *Escherichia Coli* / W.H.F. Goessens, A.K. van der Bij, R. van Boxtel [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2013. — Vol. 57, N. 8. — P. 3941-3949. — DOI: 10.1128/AAC.02459-12.
34. Watanabe K. Real-time Dual Zymographic Analysis of Matrix Metalloproteinases Using Fluorescein-isothiocyanate-labeled Gelatin and Texas-red-labeled Casein / K. Watanabe, S. Hattori // *Anal. Biochem.* — 2002. — Vol. 307. — P. 390-392. — DOI: 10.1016/S0003-2697(02)00054-4.
35. Hawkes S.P. Zymography and Reverse Zymography for Detecting MMPs and TIMPs / S.P. Hawkes, H. Li, G.T. Taniguchi // *Methods Mol Biol.* — 2010. — Vol. 622. — P. 257-269. — DOI: 10.1007/978-1-60327-299-5_16.
36. Sharma K. Reverse Zymography: Overview and Pitfalls / K. Sharma, D. Bhattacharyya // *Zymography: Methods and Protocols.* New York, NY: Springer New York, 2017. — P. 125-132. — DOI: 10.1007/978-1-4939-7111-4_11.
37. Hasson S.S. Antibody Zymography: A novel Adaptation of Zymography to Determine the Protease-neutralising Potential of Specific Antibodies and Snake Antivenoms / S.S. Hasson, R.D. Theakston, R.A. Harrison // *J. Immunol. Methods.* — 2004. — Vol. 292, N. (1-2). — P. 131-139. — DOI: 10.1016/j.jim.2004.06.004.
38. Zardeneta G. Detection and Preliminary Characterization of Matrix Metalloproteinase Activity in Temporomandibular Joint Lavage Fluid / G. Zardeneta, S.B. Milam, T. Lee [et al.] // *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* — 1998. — Vol. 27, N. 5. — P. 397-403. — DOI: 10.1016/s0901-5027(98)80072-6.
39. Grzela K. Matrix Metalloproteinases in Asthma-associated Airway Remodeling — Dr. Jekyll or Mr. Hyde? / K. Grzela, A. Strzelak, W. Zagórska [et al.] // *Asthma: From Childhood Asthma to ACOS Phenotypes* / C. Pereira ed. — InTechOpen, 2016. — Part 3. — P. 41-69. — DOI: 978-953-51-2441-2.
40. Hughes A.J. Quantitative Enzyme Activity Determination with Zeptomole Sensitivity by Microfluidic Gradient-gel Zymography / A.J. Hughes, A.E. Herr // *Anal. Biochem.* — 2010. — Vol. 82, N. 9. — P. 3803-3811. — DOI: 10.1021/ac100201z.
41. Nemori R. A Review for in Situ Zymography: Method for Localization of Protease Activities in a Tissue / R. Nemori, T.A. Tachikawa // *The Tissue Culture Engineering.* — 1999. — Vol. 25, N. 9. — P. 29-32.
42. Galis Z.S. Microscopic Localization of Active Proteases by in Situ Zymography: Detection of Matrix Metalloproteinase Activity in Vascular Tissue / Z.S. Galis, G.K. Sukhova, P. Libby // *FASEB J.* — 1995. — Vol. 9, N. 10. — P. 974-980. — DOI: 10.1096/fasebj.9.10.7615167.
43. Snoek-van Beurden P.A. Zymographic Techniques for the Analysis of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors / P.A. Snoek-van Beurden, J.W. Von den Hoff // *Biotechniques.* — 2005. — Vol. 38, N. 1. — P. 73-83.
44. Zhang J. In Vivo Evidence for Active Matrix Metalloproteinases in Human Endometrium Supports Their Role in Tissue Breakdown at Menstruation / J. Zhang, L.A. Salamonsen // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2002. — Vol. 87, N. 5. — P. 2346-2351. — DOI: 10.1210/jcem.87.5.8487.
45. Fredericks W.M. Metabolic Mapping of Proteinase Activity with Emphasis on in Situ Zymography of Gelatinases: review and protocols / W.M. Fredericks, O.R. Mook // *J. Histochem. Cytochem.* — 2004. — Vol. 52, N. 6. — P. 711-722. — DOI: 10.1369/jhc.4R6251.2004.
46. Malemud C.J. Matrix Metalloproteinases (MMPs) in Health and Disease: an overview / C.J. Malemud // *Front. Biosci.* — 2006. — Vol. 11. — P. 1696-1701. — DOI: 10.2741/1915.
47. Yan S.J. In Situ Zymography: a Molecular Pathology Technique to Localize Endogenous Protease Activity in Tissue Sections / S.J. Yan, E.A. Blomme // *Vet. Pathol.* — 2003. — Vol. 40, N. 3. — P. 227-236. — DOI: 10.1354/vp.40-3-227.
48. Pampalakis G. «Activography»: a Novel, Versatile and Easily Adaptable Method for Monitoring Enzymatic Activities in Situ / G. Pampalakis, E. Zingkou, K. Vekrellis [et al.] // *Chem Commun (Camb).* — 2017. — Vol. 53, N. 22. — P. 3246-3248. — DOI: 10.1039/c7cc01081h.
49. Crawford B.D. Ontogeny and Regulation of Matrix Metalloproteinase Activity in the Zebrafish Embryo by in Vitro and in Vivo Zymography / B.D. Crawford, D.B. Pilgrim // *Dev. Biol.* — 2005. — Vol. 286, N. 2. — P. 405-414. — DOI: 10.1016/j.ydbio.2005.06.035.
50. Keow J.Y. Differential in Vivo Zymography: a Method for Observing Matrix Metalloproteinase Activity in the Zebrafish Embryo / J.Y. Keow, K.M. Herrmann, B.D. Crawford // *Matrix Biol.* — 2011. — Vol. 30, N. 3. — P. 169-177. — DOI: 10.1016/j.matbio.2011.01.003.
51. Pringle J.R. Methods for Avoiding Proteolytic Artefacts in Studies of Enzymes and Other Proteins from Yeasts / J.R. Pringle // *Methods Cell Biol.* — 1975. — Vol. 12. — P. 149-184. — DOI: 10.1016/s0091-679x(08)60956-5.
52. Grudkowska M. Two-dimensional Zymography in Detection of Proteolytic Enzymes in Wheat Leaves / M. Grudkowska, P. Lisik, K. Rybka // *Acta Physiolog. Plant.* — 2013. — Vol. 35, N. 12. — P. 3477-3482. — DOI:10.1007/s11738-013-1371-1.
53. Velada I. Expression of Genes Encoding Extracellular Matrix Macromolecules and Metalloproteinases in Avian Tibial Dyschondroplasia / I. Velada, F. Capela-Silva, F. Reis [et al.] // *J. Comp. Pathol.* — 2011. — Vol. 145, N (2-3). — P. 174-186. — DOI: 10.1016/j.jcpa.2010.12.008.

54. Kupai K. Matrix Metalloproteinase Activity Assays: Importance of Zymography / K. Kupai, G. Szucs, S. Cseh [et al.] // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. — 2010. — Vol. 61, N. 2. — P. 205-209. — DOI: 10.1016/j.vascn.2010.02.011.
55. Hummel K.M. Anomalous Estimation of Protease Molecular Weights Using Gelatin-containing SDS-PAGE / K.M. Hummel, A.R. Penheiter, A.C. Gathman [et al.] // *Anal. Biochem.* — 1996. — Vol. 233, N. 1. — P. 140-142. — DOI: 10.1006/abio.1996.0019.
56. Ikeda M. Inhibition of Gelatinolytic Activity in Tumor Tissues by Synthetic Matrix Metalloproteinase Inhibitor: Application of Film in Situ Zymography / M. Ikeda, R. Maekawa, H. Tanaka [et al.] // *Clin. Cancer. Res.* — 2000. — Vol. 6, N. 8. — P. 3290-3296.
57. Le Q.T. Reverse Zymography Using Fluorogenic Substrates for Protease Inhibitor Detection / Q.T. Le, A. Ohashi, S. Hirose [et al.] // *Electrophoresis*. — 2003. — Vol. 26, N. 6. — P. 1038-1045. — DOI: 10.1002/elps.200306142.
58. Ratnikov B. Determination of Matrix Metalloproteinase Activity Using Biotinylated Gelatin / B. Ratnikov, E. Deryugina, J. Leng [et al.] // *Anal. Biochem.* — 2000. — Vol. 286, N. 1. — P. 149-155. — DOI: 10.1006/abio.2000.4798.
59. Irvine J.W. Electrophoretic Analysis of Proteinases in Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide Gels Containing Copolymerized Radiolabeled Protein Substrates: Application to Proenkephalin Processing Enzymes / J.W. Irvine, S.F. Roberts, I. Lindberg // *Anal. Biochem.* — 1990. — Vol. 190, N. 1. — P. 141-146. — DOI: 10.1016/0003-2697(90)90147-2.
60. Makowski G.S. Calibrating Gelatin Zymograms with Human Gelatinase Standards / G.S. Makowski, M.L. Ramsby // *Anal. Biochem.* — 1996. — Vol. 236, N. 2. — P. 353-356. — DOI: 10.1006/abio.1996.0179.
61. Tjalsma H. Proteomics of Protein Secretion by *Bacillus Subtilis*: Separating the «Secrets» of the Secretome / H. Tjalsma, H. Antelmann, J.D.H. Jongbloed [et al.] // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 2004. — Vol. 68, N. 2. — P. 207-233. — DOI: 10.1128/MMBR.68.2.207-233.2004120.
62. Gogly B. Collagen Zymography as a Sensitive and Specific Technique for the Determination of Subpicogram Levels of Interstitial Collagenase / B. Gogly, N. Groult, W. Hornebeck [et al.] // *Anal. Biochem.* — 1998. — Vol. 255, N. 2. — P. 211-216. — DOI: 10.1006/abio.1997.2318.
63. Andrejko M. Three *Pseudomonas Aeruginosa* Strains with Different Protease Profiles / M. Andrejko, A. Zdybicka-Barabas, M. Janczarek [et al.] // *Acta Biochimica Polonica*. — 2013. — Vol. 60, N. 1. — P. 83-90.
64. Козлов С.Н. Способ определения липолитической активности в субклеточных фракциях бактерий / С.Н. Козлов, Е.Ю. Марков, В.Б. Николаев [и др.] // Пат. 2501014 РФ. G01N 33/50, G01N 33/48. — 2013. — Бюлл. № 34. — 8 с.
65. Козлов С.Н. Выявление хитиноподобных ферментов *Vibrio cholerae* O1 и O139 в субстратном электрофорезе / С.Н. Козлов, Е.Ю. Марков, Л.Я. Урбанович [и др.] // *Медицинский академический журнал*. — 2016. — Т. 16, № 4. — С. 83-84.

Список литературы на английском языке / References in English

- Gurung N. A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond / N. Gurung, S. Ray, S. Bose [et al.] // *Biomed. Res. Int.* — 2013. — Article ID 329121. — 18 p. — DOI: 10.1155/2013/329121.
- Antalis T.M. Membrane-anchored Serine Proteases in Health and Disease / T.M. Antalis, T.H. Bugge, Q. Wu // *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. — 2011. — Vol. 99. — P. 1-50. — DOI: 10.1016/B978-0-12-385504-6.00001-4.
- Báez-Santos Y. The SARS-coronavirus Papain-like Protease: Structure, Function, and Inhibition by Designed Antiviral Compounds / Y. Báez-Santos, S.E. John, A.D. Mesecar // *Antivir. Res.* — 2015. — Vol. 115. — P. 21-38. — DOI: 10.1016/j.antiviral.2014.12.015.
- Siqueira-Neto J.L. Cysteine Proteases in Protozoan Parasites / J.L. Siqueira-Neto, A. Debnath, L.I. McCall [et al.] // *PLoS Negl. Trop. Dis.* — 2018. — Vol. 12, N 8: e0006512. — DOI: 10.1371/journal.pntd.0006512.
- Kurnatowski P. The Hydrolytic Enzymes Produced by Fungi Strains Isolated from the Sand and Soil of Recreational Areas / P. Kurnatowski, A. Wójcik, J. Błaszowska [et al.] // *Ann. Parasitol.* — 2016. — Vol. 62, N. 3. — P. 201-208. — DOI: 10.17420/ap6203.55.
- Miyoshi S.I. Extracellular Proteolytic Enzymes Produced by Human Pathogenic *Vibrio* Species / S.I. Miyoshi // *Front. Microbiol.* — 2013. — Vol. 4, Article 339. — P. 1-8. — DOI: 10.3389/fmicb.2013.00339.
- Cunha A. Bacterial Extracellular Enzymatic Activity in Globally Changing Aquatic Ecosystems / A. Cunha, A. Almeida, F.J.R.C. Coelho [et al.] // *Current Research Technology and Rducation Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. — 2010. — Vol.1. — P. 124-135.
- Sliwowska I. Zymography-method for Quantitation of Activity on Gelatinase A (pro-MMP-2, 72 kDa) and Gelatinase B (pro-MMP-9, 92 kDa) in Serum of Patients with Breast Cancer / I. Sliwowska, Z. Kopczynski // *Wiad.Lek.* — 2007. — Vol. 60, N. (5-6). — P. 241-247.
- Iryuga O.B. Aktivnost' matriksnyh metalloproteinaz u bol'nyh s anevrizmoj voskhodyashchego otdela aorty razlichnoj etiologii [Activity of Matrix Metalloproteinases in Patients with Ascending Aortic Aneurysm of Various etiologies] / O.B. Iryuga, I.V. Voronkina, L.V. Smagina [et al.] // *Arterial'naya gipertenziya [Arterial Hypertension]*. — 2010. — V. 16, № 6. — P. 587-591 [in Russian].
- Parks W.C. Matrix Metalloproteinases as Modulators of Inflammation and Innate Immunity / W.C. Parks, C.L. Wilson, Y.S. Lopez-Boado // *Nature Reviews Immunol.* — 2004. — Vol. 4, N 8. — P. 617-629. — DOI: 10.1038/nri1418.
- Paemen L. Evaluation of Gelatinases and IL-6 in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Optic Neuritis, Multiple Sclerosis and Other Inflammatory Neurological Diseases / L. Paemen, T. Olsson, M. Soderstrom [et al.] // *Eur. J. Neurol.* — 1994. — Vol. 1, N. 1. — P. 55-63. — DOI: 10.1111/j.1468-1331.1994.tb00051.x.14.
- Rothe G.M. *Electrophoresis of Enzymes: Laboratory Methods* / G.M. Rothe // — Berlin: Springer, 1994. — 141-179 p.

13. Vandooren J. Zymography Methods for Visualizing Hydrolytic Enzymes / J. Vandooren, N. Geurts, E. Martens [et al.] // *Nat. Methods*. — 2013. — Vol. 10, N. 3. — P. 211-220. — DOI: 10.1038/nmeth.2371.
14. Hunter R.L. Histochemical Demonstration of Enzymes Separated by Zone Electrophoresis in Starch Gels / R.L. Hunter, C.L. Markett // *Science*. — 1957. — Vol. 125, N. 3261. — P. 1294-1295.
15. Heussen C. Electrophoretic Analysis of Plasminogen Activators in Polyacrylamide Gels Containing Sodium Dodecyl Sulfate and Copolymerized Substrates / C. Heussen, E.B. Dowdle // *Anal. Biochem.* — 1980. — Vol. 102, N. 1. — P. 196-202. — DOI: 10.1016/0003-2697(80)90338-3.
16. Lundy F.T. A New Method for the Detection of Proteolytic Activity in *Pseudomonas Lundensis* after Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide Gel Electrophoresis / F.T. Lundy, A.C. Magee, I.S. Blair [et al.] // *Electrophoresis*. — 1995. — Vol. 16, N. 1. — P. 43-45. — DOI: 10.1002/elps.1150160110.
17. Paech C. Zymogram of Protease Made with Developed Film from Nondenaturing Polyacrylamide Gels after Electrophoresis / C. Paech, T. Christianson, K.H. Maurer // *Anal. Biochem.* — 1993. — Vol. 208, N. 2. — P. 249-254. — DOI: 10.1006/abio.1993.1041.
18. Michaud D. Assessing the Stability of Cystatin/Cysteine Proteinase Complexes Using Mildly-denaturing Gelatin-polyacrylamide Gel Electrophoresis / D. Michaud, L. Cantin, D.A. Raworth [et al.] // *Electrophoresis*. — 1996. — Vol. 17, N. 1. — P. 74-79. — DOI: 10.1002/elps.1150170113.
19. Banik R.M. Purification and Characterization of Laundry Detergent Compatible Alkaline Protease from *Bacillus Cereus* / R.M. Banik, M. Prakash // *Ind. J. Biotechnol.* — 2006. — Vol. 5, N. 3. — P. 380-384.
20. Vazquez Peyronel D. A Simple and Rapid Technique for Postelectrophoretic Detection of Proteases Using Azocasein / D. Vazquez Peyronel, A.M. Cantera // *Electrophoresis*. — 1995. — Vol. 16, N. 10. — P. 1894-1897. — DOI: 10.1002/elps.11501601311.
21. Gonzalez-Paez G.E. Proteinases in Excretory-secretory Products of *Toxocara Canis* Second-stage Larvae: Zymography and Modeling Insights / G.E. Gonzalez-Paez, F. Alba-Hurtado, C.G. Garcia-Tovar [et al.] // *J. BioMed Research International*. — 2014. — P. 1-9. — DOI: 10.1155/2014/418708.
22. Granelli-Piperno A. A Study of Proteases and Protease-inhibitor Complexes in Biological Fluids / A. Granelli-Piperno, E. Reich // *J. Exp. Med.* — 1978. — Vol. 148, N. 1. — P. 223-234.
23. Curino A. Detection of Plasminogen Activators in Oral Cancer by Laser Capture Microdissection Combined with Zymography / A. Curino, V. Patel, B.S. Nielsen [et al.] // *Oral. Oncol.* 2004. — Vol. 40, N. 10. — P. 1026-1032. — DOI: 10.1016/j.oraloncology.2004.05.011.
24. Kelleher P.J. Detection of Proteases in Polyacrylamide Gels Containing Covalently Bound Substrates / P.J. Kelleher, P.L. Juliano // *Anal. Biochem.* — 1984. — Vol. 136, N. 2. — P. 470-476. — DOI: 10.1016/0003-2697(84)90246-x.
25. Chen S. Two-dimensional Zymography Differentiates Gelatinase Isoforms in Stimulated Microglial Cells and in Brain Tissues of Acute Brain Injuries / S. Chen, F. Meng, Z. Chen [et al.] // *PLoS One*. — 2015. — Vol. 10, N. 4. — e023852. — DOI: 10.1371/journal.pone.012385291.
26. Ong K.L. Analysis of Proteins from Different Phase Variants of the Entomopathogenic Bacteria *Photobacterium luminescens* by Two-dimensional Zymography / K.L. Ong, F.N. Chang // *Electrophoresis*. — 1997. — Vol. 18, N. 5. — P. 834-839. — DOI: 10.1002/elps.115018053091.
27. Yoon B.K. Impact of Lysophosphatidylcholine on the Plasminogen Activator System in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells / B.K. Yoon, Y.H. Kang, W. J. Oh [et al.] // *J. Korean Med. Sci.* — 2012. — Vol. 27, N. 7. — P. 803-810. — DOI: 10.3346/jkms.2012.27.7.803.
28. Masure S. Purification and Identification of 91-kDa Neutrophil Gelatinase / S. Masure, G. Opendakker, P. Proost [et al.] // *Eur. J. Biochem.* — 1991. — Vol. 198, N. 2. — P. 391-398. — DOI: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16027.x.
29. Masure S. Human Hepatoma Cells Produce an 85 kDa Gelatinase Regulated by Phorbol 12-myristate 13-acetate / S. Masure, A. Billiau, J. Van Damme [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta*. — 1990. — Vol. 1054, N. 3. — P. 317-325. — DOI: 10.1016/0167-4889(90)90103-k.
30. Paemen L. The Gelatinase Inhibitory Activity of Tetracyclines and Chemically Modified Tetracycline Analogues as Measured by a Novel Microtiter Assay for Inhibitors / L. Paemen, E. Martens, K. Norga [et al.] // *Biochem. Pharmacol.* — 1996. — Vol. 52, N. 1. — P. 105-111. — DOI: 10.1016/0006-2952(96)00168-2.
31. Van den Steen P.E. Biochemistry and Molecular Biology of Gelatinase B or Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) / P.E. Van den Steen, B. Dubois, I. Nelissen [et al.] // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* — 2002. — Vol. 37, N. 6. — P. 375-536. — DOI: 10.1080/10409230290771546.
32. Pan D. Electrophoretic Transfer Protein Zymography / D. Pan, A.P. Hill, A. Kashou [et al.] // *Anal. Biochem.* — 2011. — Vol. 411, N. 2. — P. 277-283. — DOI: 10.1016/j.ab.2011.01.015.
33. Goessens W.H.F. Antibiotic Trapping by Plasmid-encoded CMY-2 β -lactamase Combined with Reduced Outer Membrane Permeability as a Mechanism of Carbapenem Resistance in *Escherichia coli* / W.H.F. Goessens, A.K. van der Bij, R. van Boxtel [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2013. — Vol. 57, N. 8. — P. 3941-3949. — DOI: 10.1128/AAC.02459-12.
34. Watanabe K. Real-time Dual Zymographic Analysis of Matrix Metalloproteinases Using Fluorescein-isothiocyanate-labeled Gelatin and Texas-red-labeled Casein / K. Watanabe, S. Hattori // *Anal. Biochem.* — 2002. — Vol. 307. — P. 390-392. — DOI: 10.1016/S0003-2697(02)00054-4.
35. Hawkes S.P. Zymography and Reverse Zymography for Detecting MMPs and TIMPs / S.P. Hawkes, H. Li, G.T. Taniguchi // *Methods Mol Biol.* — 2010. — Vol. 622. — P. 257-269. — DOI: 10.1007/978-1-60327-299-5_16.
36. Sharma K. Reverse Zymography: Overview and Pitfalls / K. Sharma, D. Bhattacharyya // *Zymography: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York, 2017. — P. 125-132. — DOI: 10.1007/978-1-4939-7111-4_11.

37. Hasson S.S. Antibody Zymography: A novel Adaptation of Zymography to Determine the Protease-neutralising Potential of Specific Antibodies and Snake Antivenoms / S.S. Hasson, R.D. Theakston, R.A. Harrison // *J. Immunol. Methods.* — 2004. — Vol. 292, N. (1-2). — P. 131-139. — DOI: 10.1016/j.jim.2004.06.004.
38. Zardeneta G. Detection and Preliminary Characterization of Matrix Metalloproteinase Activity in Temporomandibular Joint Lavage Fluid / G. Zardeneta, S.B. Milam, T. Lee [et al.] // *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* — 1998. — Vol. 27, N. 5. — P. 397-403. — DOI: 10.1016/s0901-5027(98)80072-6.
39. Grzela K. Matrix Metalloproteinases in Asthma-associated Airway Remodeling — Dr. Jekyll or Mr. Hyde? / K. Grzela, A. Strzelak, W. Zagórska [et al.] // *Asthma: From Childhood Asthma to ACOS Phenotypes* / C. Pereira ed. — InTechOpen, 2016. — Part 3. — P. 41-69. — DOI: 978-953-51-2441-2.
40. Hughes A.J. Quantitative Enzyme Activity Determination with Zeptomole Sensitivity by Microfluidic Gradient-gel Zymography / A.J. Hughes, A.E. Herr // *Anal. Biochem.* — 2010. — Vol. 82, N. 9. — P. 3803-3811. — DOI: 10.1021/ac100201z.
41. Nemori R. A Review for in Situ Zymography: Method for Localization of Protease Activities in a Tissue / R. Nemori, T.A. Tachikawa // *The Tissue Culture Engineering.* — 1999. — Vol. 25, N. 9. — P. 29-32.
42. Galis Z.S. Microscopic Localization of Active Proteases by in Situ Zymography: Detection of Matrix Metalloproteinase Activity in Vascular Tissue / Z.S. Galis, G.K. Sukhova, P. Libby // *FASEB J.* — 1995. — Vol. 9, N. 10. — P. 974-980. — DOI: 10.1096/fasebj.9.10.7615167.
43. Snoek-van Beurden P.A. Zymographic Techniques for the Analysis of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors / P.A. Snoek-van Beurden, J.W. Von den Hoff // *Biotechniques.* — 2005. — Vol. 38, N. 1. — P. 73-83.
44. Zhang J. In Vivo Evidence for Active Matrix Metalloproteinases in Human Endometrium Supports Their Role in Tissue Breakdown at Menstruation / J. Zhang, L.A. Salamonsen // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2002. — Vol. 87, N. 5. — P. 2346-2351. — DOI: 10.1210/jcem.87.5.8487.
45. Fredericks W.M. Metabolic Mapping of Proteinase Activity with Emphasis on in Situ Zymography of Gelatinases: review and protocols / W.M. Fredericks, O.R. Mook // *J. Histochem. Cytochem.* — 2004. — Vol. 52, N. 6. — P. 711-722. — DOI: 10.1369/jhc.4R6251.2004.
46. Malemud C.J. Matrix Metalloproteinases (MMPs) in Health and Disease: an overview / C.J. Malemud // *Front. Biosci.* — 2006. — Vol. 11. — P. 1696-1701. — DOI: 10.2741/1915.
47. Yan S.J. In Situ Zymography: a Molecular Pathology Technique to Localize Endogenous Protease Activity in Tissue Sections / S.J. Yan, E.A. Blomme // *Vet. Pathol.* — 2003. — Vol. 40, N. 3. — P. 227-236. — DOI: 10.1354/vp.40-3-227.
48. Pampalakis G. «Activography»: a Novel, Versatile and Easily Adaptable Method for Monitoring Enzymatic Activities in Situ / G. Pampalakis, E. Zingkou, K. Vekrellis [et al.] // *Chem Commun (Camb).* — 2017. — Vol. 53, N. 22. — P. 3246-3248. — DOI: 10.1039/c7cc01081h.
49. Crawford B.D. Ontogeny and Regulation of Matrix Metalloproteinase Activity in the Zebrafish Embryo by in Vitro and in Vivo Zymography / B.D. Crawford, D.B. Pilgrim // *Dev. Biol.* — 2005. — Vol. 286, N. 2. — P. 405-414. — DOI: 10.1016/j.ydbio.2005.06.035.
50. Keow J.Y. Differential in Vivo Zymography: a Method for Observing Matrix Metalloproteinase Activity in the Zebrafish Embryo / J.Y. Keow, K.M. Herrmann, B.D. Crawford // *Matrix Biol.* — 2011. — Vol. 30, N. 3. — P. 169-177. — DOI: 10.1016/j.matbio.2011.01.003.
51. Pringle J.R. Methods for Avoiding Proteolytic Artefacts in Studies of Enzymes and Other Proteins from Yeasts / J.R. Pringle // *Methods Cell Biol.* — 1975. — Vol. 12. — P. 149-184. — DOI: 10.1016/s0091-679x(08)60956-5.
52. Grudkowska M. Two-dimensional Zymography in Detection of Proteolytic Enzymes in Wheat Leaves / M. Grudkowska, P. Lisik, K. Rybka // *Acta Physiolog. Plant.* — 2013. — Vol. 35, N. 12. — P. 3477-3482. — DOI: 10.1007/s11738-013-1371-1.
53. Velada I. Expression of Genes Encoding Extracellular Matrix Macromolecules and Metalloproteinases in Avian Tibial Dyschondroplasia / I. Velada, F. Capela-Silva, F. Reis [et al.] // *J. Comp. Pathol.* — 2011. — Vol. 145, N (2-3). — P. 174-186. — DOI: 10.1016/j.jcpa.2010.12.008.
54. Kupai K. Matrix Metalloproteinase Activity Assays: Importance of Zymography / K. Kupai, G. Szucs, S. Cseh [et al.] // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* — 2010. — Vol. 61, N. 2. — P. 205-209. — DOI: 10.1016/j.vascn.2010.02.011.
55. Hummel K.M. Anomalous Estimation of Protease Molecular Weights Using Gelatin-containing SDS-PAGE / K.M. Hummel, A.R. Penheiter, A.C. Gathman [et al.] // *Anal. Biochem.* — 1996. — Vol. 233, N. 1. — P. 140-142. — DOI: 10.1006/abio.1996.0019.
56. Ikeda M. Inhibition of Gelatinolytic Activity in Tumor Tissues by Synthetic Matrix Metalloproteinase Inhibitor: Application of Film in Situ Zymography / M. Ikeda, R. Maekawa, H. Tanaka [et al.] // *Clin. Cancer. Res.* — 2000. — Vol. 6, N. 8. — P. 3290-3296.
57. Le Q.T. Reverse Zymography Using Fluorogenic Substrates for Protease Inhibitor Detection / Q.T. Le, A. Ohashi, S. Hirose [et al.] // *Electrophoresis.* — 2003. — Vol. 26, N. 6. — P. 1038-1045. — DOI: 10.1002/elps.200306142.
58. Ratnikov B. Determination of Matrix Metalloproteinase Activity Using Biotinylated Gelatin / B. Ratnikov, E. Deryugina, J. Leng [et al.] // *Anal. Biochem.* — 2000. — Vol. 286, N. 1. — P. 149-155. — DOI: 10.1006/abio.2000.4798.
59. Irvine J.W. Electrophoretic Analysis of Proteinases in Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide Gels Containing Copolymerized Radiolabeled Protein Substrates: Application to Proenkephalin Processing Enzymes / J.W. Irvine, S.F. Roberts, I. Lindberg // *Anal. Biochem.* — 1990. — Vol. 190, N. 1. — P. 141-146. — DOI: 10.1016/0003-2697(90)90147-2.
60. Makowski G.S. Calibrating Gelatin Zymograms with Human Gelatinase Standards / G.S. Makowski, M.L. Ramsby // *Anal. Biochem.* — 1996. — Vol. 236, N. 2. — P. 353-356. — DOI: 10.1006/abio.1996.0179.

61. Tjalsma H. Proteomics of Protein Secretion by *Bacillus Subtilis*: Separating the «Secrets» of the Secretome / H. Tjalsma, H. Antelmann, J.D.H. Jongbloed [et al.] // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 2004. — Vol. 68, N. 2. — P. 207-233. — DOI: 10.1128/MMBR.68.2.207-233.2004120.
62. Gogly B. Collagen Zymography as a Sensitive and Specific Technique for the Determination of Subpicogram Levels of Interstitial Collagenase / B. Gogly, N. Groult, W. Hornebeck [et al.] // *Anal. Biochem.* — 1998. — Vol. 255, N. 2. — P. 211-216. — DOI: 10.1006/abio.1997.2318.
63. Andrejko M. Three *Pseudomonas Aeruginosa* Strains with Different Protease Profiles / M. Andrejko, A. Zdybicka-Barabas, M. Janczarek [et al.] // *Acta Biochimica Polonica.* — 2013. — Vol. 60, N. 1. — P. 83-90.
64. Kozlov S.N. Sposob opredeleniya lipoliticheskoy aktivnosti v subkletочnyh frakciyah bakterij [A Method for Determining Lipolytic Activity in Subcellular Fractions of Bacteria] / S.N. Kozlov, E.YU. Markov, V.B. Nikolaev [et al.] // Pat. 2501014 RF. G01N 33/50, G01 N 33/48. — 2013. — Bull. № 34. — 8 p. [in Russian]
65. Kozlov S.N. Vyyavlenie hitinoliticheskikh fermentov *Vibrio cholerae* O1 i O139 v substratnom elektroforeze [Detection of Chitinolytic Enzymes *Vibrio Cholerae* O1 and O139 in Substrate Electrophoresis] / S.N. Kozlov, E.YU. Markov, L.YA. Urbanovich [et al.] // *Medicinskij akademicheskij zhurnal [Medical Academic Journal]*. — 2016. — V. 16, № 4. — P. 83-84 [in Russian].