

На правах рукописи

Алиева Анна Александровна

**АДГЕЗИЯ *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*:
РОЛЬ В ПАТОЛОГИИ И СПОСОБЫ ПОДАВЛЕНИЯ**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Оболенск

2020

Работа выполнена на кафедре микробиологии и вирусологии №2 федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Харсеева Галина Георгиевна, доктор медицинских наук (03.02.03 - микробиология), профессор, зав. кафедрой микробиологии и вирусологии № 2 федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Официальные оппоненты: Краева Людмила Александровна, доктор медицинских наук (03.02.03 - микробиология), Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заведующая лабораторией медицинской бактериологии, г. Санкт-Петербург

Червинец Вячеслав Михайлович, доктор медицинских наук (03.02.03 - микробиология), профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии, г. Тверь

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения России, г. Москва

Защита состоится «25» сентября 2020 г. в 13 ч на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по защите прав потребителей и благополучию человека Российской Федерации по адресу: Территория «Квартал А», д. 24, р.п. Оболенск, г. Серпухов, Московская область, 142279, ФБУН ГНЦ ПМБ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по защите прав потребителей и благополучию человека Российской Федерации по адресу: Территория «Квартал А», д. 24, р.п. Оболенск, г. Серпухов, Московская область, 142279, ФБУН ГНЦ ПМБ.

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Учёный секретарь

диссертационного совета Д 350.002.01
кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Возбудитель дифтерии *Corynebacterium diphtheriae* характеризуется наличием широкого спектра факторов патогенности, главным из которых является экзотоксин. Характер и механизм воздействия дифтерийного токсина на органы и ткани человека хорошо изучены. Однако исследование начального этапа инфекционного процесса - адгезии возбудителя дифтерии на эпителии входных ворот инфекции - в последние годы вызывает все больший интерес (Pizarro-Cerda J., 2006; Ott L., 2018; Weerasekera D., 2019). Адгезия *C. diphtheriae* играет главную роль в колонизации возбудителем эпителия верхних дыхательных путей, что лежит в основе формирования дифтерийного бактерионосительства, без искоренения которого невозможна полная эрадикация дифтерии (Костюкова Н.Н., 2018). Вакцинопрофилактика дифтерии, проводимая в настоящее время во всем мире дифтерийным анатоксином, не предотвращает формирования бактерионосительства, так как способствует формированию в организме антитоксических антител, которые не препятствуют адгезии возбудителя на эпителии входных ворот инфекции (Костюкова Н.Н., 2018). Способность к адгезии в настоящее время рассматривается как один из ведущих факторов патогенности *C. diphtheriae* (Ott L., 2017, 2018).

Прикрепление *C. diphtheriae* к слизистой оболочке зева является необходимым условием для дальнейшего развития инфекционного процесса (Tauch A., 2015; Sandal V., 2015; Ott L., 2017). Адгезивность токсигенных штаммов *C. diphtheriae* обуславливают поверхностные структуры бактериальной клетки: пили (фимбрии), ковалентно связанные с пептидогликаном; нефимбриальный поверхностный белок 67-72p (или DIP0733), распознающий и специфически связывающийся с рецепторами эритроцитов человека; поверхностный белок DIP1281, способствующий адгезии возбудителя дифтерии на эпителиальных клетках хозяина и инвазии в них; CdiLAM (липоарабиноманнан), локализующийся на поверхности клеточной оболочки *C. diphtheriae* и способствующий связыванию с эпителиоцитами хозяина (Sandal V., 2015; Ott L., 2017; Peixoto R.S., 2017; Weerasekera D., 2019). Начальный этап инфекционного процесса при заболевании дифтерией и персистенция *C. diphtheriae* в организме при бактерионосительстве связаны с поверхностными белками – адгезинами, которые могут способствовать и инвазии возбудителя в эпителиальные клетки (Burkovski A., 2013; Ott L., 2018). Для борьбы с дифтерийным бактерионосительством в настоящее время используется антибактериальная терапия, которая не всегда успешна из-за появления штаммов коринебактерий, обладающих резистентностью к антибактериальным препаратам (Воронина Н.А., 2017; Харсеева Г.Г., 2017). Помимо этого, известно, что возбудитель дифтерии обладает способностью формировать биопленку (Mandlik A., 2008), что также осложняет борьбу с носительством. Это говорит о необходимости поиска новых средств, предотвращающих циркуляцию *C. diphtheriae* в

популяции, а также в организме бактерионосителей. Антиадгезивная терапия, направленная на прерывание начального этапа инфекционного процесса за счет блокады адгезии и, как следствие, колонизации бактерий на слизистой оболочке входных ворот инфекции, может явиться одним из таких средств.

Существуют различные подходы к ингибированию адгезии микроорганизмов на человеческих клетках. С одной стороны, это создание конкурентных взаимоотношений между рецепторами для адгезинов патогенных бактерий на человеческих клетках и аналогов этих рецепторов, в роли которых могут выступать сахараиды. Так, известен антиадгезивный эффект маннозы в отношении энтеропатогенной *Escherichia coli*, сиалил-3Р-лактозы – *Helicobacter pylori*, смеси галактозы, маннозы и N-ацетилнейраминовой кислоты – *Pseudomonas aeruginosa* (Cusumano Z., 2016; Zundler S., 2017; Peron G., 2017). С другой стороны, для ингибирования адгезии могут применяться аналоги адгезинов – синтетические низкомолекулярные пептиды, гиалуроновая кислота, липотейхоевые кислоты, которые имитируют структуру поверхностных адгезинов бактерий (Zundler S., 2017).

Однако необходимо указать и на определенные проблемы, связанные с использованием антиадгезивных средств. Так, большинство патогенных бактерий во время инфекционного процесса экспрессирует на своей поверхности сразу несколько различных типов адгезинов. При этом процесс адгезии, помимо адгезинов, может быть обусловлен и другими факторами, такими как гидрофобность и липофильность клеточной поверхности, сила механических взаимодействий (Sandal V., 2015). В связи с этим, в качестве эффективных средств антиадгезивной терапии необходимо использовать вещества с широким спектром блокирующей активности относительно всех факторов адгезии инфицирующего микроорганизма. В этом отношении интерес представляет иммуномодулятор азоксимера бромид, обладающий разнообразной фармакологической активностью, в том числе, иммуномодулирующей, мембранопротекторной, детоксицирующей, антиоксидантной (Хаитов Р.М., Харит С.М., 2017).

Степень разработанности темы исследования. Основные механизмы процессов адгезии и инвазии и их роль при дифтерийной инфекции недостаточно исследованы как в России, так и за рубежом. Так, в России имеются только единичные работы (Костюкова Н.Н., 1991; Брилис В.И., 1987), посвященные изучению адгезии дифтерийного микроба, а процессы инвазии коринебактерий не рассматривались вообще. В Германии (Ott L., 2018) и США (Tauch A., 2015; Pansegrau W., 2017; Peixoto R.S., 2017) исследована структура адгезинов – поверхностных белков и пилей *C. diphtheriae*, но не исследованы механизмы их взаимодействия с клетками человеческого организма. Процессы инвазии практически не изучены, не известны механизмы проникновения *C. diphtheriae* в клетку. Нет данных о влиянии факторов врожденного и

адаптивного иммунитета на эти процессы. Недостаточно изучено воздействие различных веществ, в том числе и лекарственных, на адгезивность и инвазивность *C. diphtheriae*.

Цель работы – определение роли адгезии токсигенных штаммов *C. diphtheriae* в патологическом процессе при дифтерии и способов ее подавления.

Задачи исследования

1. Провести исследование адгезивных и инвазивных свойств планктонных и биопленочных (120- и 720-часовых) культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* на клеточной линии Нер-2.

2. Охарактеризовать роль адгезивно-инвазивного потенциала токсигенных штаммов *C. diphtheriae* в развитии патологического процесса при дифтерии.

3. Определить уровень и характер цитопатического действия планктонных и биопленочных (120- и 720-часовых) культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* на клеточной линии СНО-К1.

4. Определить характер воздействия факторов врожденного и адаптивного иммунитета на адгезивные и инвазивные свойства планктонных и биопленочных (120- и 720-часовых) культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae*.

5. Изучить воздействие азоксимера бромида на адгезивную активность планктонных и биопленочных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* по отношению к клеткам карциномы фарингеального эпителия человека Нер-2.

Научная новизна. Впервые дана характеристика адгезивно-инвазивного потенциала планктонных и биопленочных (120- и 720-часовых) культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* и его роли в формировании патологического процесса: на ранних стадиях *C. diphtheriae*, обладая высокой адгезивной и инвазивной активностью, прикрепляется к эпителиальным клеткам, проникает в них, а на более поздних, при сохранении выраженной способности к адгезии и постепенном снижении инвазивности, выходит из клеток и формирует биопленку.

Впервые установлено, что высокий адгезивно-инвазивный потенциал не продуцирующих токсины штаммов коринебактерий способствует развитию острого воспалительного процесса в респираторном тракте (патент на изобретение РФ «Способ отбора пациентов в группу риска по развитию фолликулярной ангины» № 2672862 от 20 ноября 2018 г.).

Впервые установлено, что уровень и характер цитопатического действия планктонных и биопленочных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* на культуре клеток СНО-К1 различен: у планктонных культур цитопатическое действие более выражено ($p \leq 0,05$) и проявляется истончением и удлинением клеток, у биопленочных – менее выражено и характеризуется округлением клеток.

Впервые установлено, что под воздействием факторов врожденного и адаптивного иммунитета у больных с манифестированными формами дифтерии адгезивная активность токсигенных штаммов *C. diphtheriae* понижается ($p \leq 0,05$), тогда как у бактерионосителей,

напротив, повышается (в 1,5-2 раза), что предрасполагает к формированию биопленки и уменьшению выделения токсина за ее пределы.

Впервые установлен подавляющий (в десятки и сотни раз) дозозависимый эффект азоксимера бромида на адгезивные и инвазивные свойства планктонных и биопленочных (120- и 720-часовых) культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae*.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Полученные результаты позволяют расширить представления о роли адгезивно-инвазивного потенциала *C. diphtheriae* в развитии патологического процесса. В лаборатории клинической микробиологии МБУЗ «Городская больница № 20 города Ростова-на-Дону» используются сведения о факторах патогенности коринебактерий (адгезивность, инвазивность, цитопатическое действие) для характеристики патогенных свойств коринебактерий (Акт внедрения МБУЗ «Городская больница № 20 города Ростова-на-Дону» от 18.06.2020г.) – Межведомственный уровень внедрения.

В бактериологической лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» используются данные, характеризующие адгезивно-инвазивный потенциал нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae* и недифтерийных коринебактерий для установления их этиологической значимости в развитии патологического процесса (Акт внедрения ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» от 15.06.2020 г.) – Межведомственный уровень внедрения.

Установленный факт выраженной антиадгезивной активности азоксимера бромида в отношении не только планктонных, но и биопленочных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* на клетках карциномы фарингеального эпителия Нер-2 позволяет рассматривать его как препарат для неспецифической профилактики и терапии дифтерии на ранних стадиях патологического процесса.

Личное участие соискателя. Все результаты экспериментальных исследований, представленные в диссертационной работе, получены лично автором или при его непосредственном участии во всех этапах проведенного исследования, включая планирование и проведение экспериментов, аналитическую и статистическую обработку данных, научное обоснование и обобщение полученных результатов, а также их оформление и публикацию.

Достоверность результатов исследования. Экспериментальные исследования проведены в достаточном объеме с использованием современных бактериологических, физико-химических, молекулярно-биологических, культуральных, микроскопических, иммунологических и статистических методов. Использовано сертифицированное оборудование и современные методы статистической обработки полученных данных. Выводы диссертационной работы

имеют теоретическое и практическое обоснование, соответствуют целям и задачам проведенного исследования.

Апробация работы. Материалы и результаты исследований были представлены на 8 научных мероприятиях: XIX форуме «Национальные дни лабораторной медицины России - 2015» (Общероссийская научно-практическая конференция «Консолидация лабораторной медицины и клинической практики. Традиции и инновации», 23-25 сентября 2015г., г. Москва), Международной научно-практической конференции, посвященной 125-летию со дня рождения Б.Я. Эльберта «90 лет в авангарде микробиологической науки Беларуси» (18 декабря 2015г., г. Минск), Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные проблемы диагностики инфекционных заболеваний (Микробиология, биотехнология, эпидемиология, паразитология)» (13-15 мая 2015г., г. Ростов-на-Дону), Российско-Китайской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии XIX Кашкинские чтения (14-16 июня 2016г., г. Санкт-Петербург), XXI форуме «Национальные дни лабораторной медицины России» (Общероссийская междисциплинарная научно-практическая конференция с международным участием «Консолидация лабораторной медицины и клинической практики», 20-22 сентября 2017г., г. Москва), Региональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы эпидемиологии, микробиологии и диагностики инфекционных и паразитарных заболеваний в Ростовской области», посвященной 95-летию санитарно-эпидемиологической службы Российской Федерации (24 октября 2017г., г. Ростов-на-Дону), V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации» (30 ноября 2018г., Московская область, г. Электрогорск), Всероссийском конгрессе по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии «Российско-Китайский конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии» (XXII Кашкинские чтения) (12-15 июня 2019г., г. Санкт-Петербург).

Связь работы с научными программами. Тема диссертационного исследования включена в план научно-исследовательской работы ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России с 2016г. Исследования выполнены в рамках двухстороннего договора о совместном сотрудничестве с ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (договор № 18177 от 01.03.2015 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано всего 19 научных работ, из них – 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, включая 3 статьи в журналах, входящих в международную реферативную базу данных и системы цитирования Scopus, 1 – в переводном Российском журнале. Получен патент на изобретение РФ № 2672862 от 20 ноября 2018г. (Бюл. № 32).

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, изложения полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, приложения, списка цитируемой литературы, содержащего 190 источников, в том числе – 150 зарубежных. Работа изложена на 156 страницах печатного текста, содержит 19 таблиц, 21 рисунок.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. Адгезивные и инвазивные свойства планктонных и биопленочных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* имеют различный характер изменений в динамике культивирования на клеточной линии Нер-2.

2. Токсигенные штаммы *C. diphtheriae* на ранних стадиях патологического процесса при дифтерии обладают выраженной адгезивной и инвазивной активностью. В дальнейшем, при образовании биопленки, их адгезивность сохраняется на высоком уровне, а инвазивность снижается.

3. Выделение токсина штаммами *C. diphtheriae* протекает интенсивно на ранних стадиях патологического процесса при дифтерии, а в дальнейшем, при формировании биопленки, замедляется. Планктонные и биопленочные культуры токсигенных штаммов *C. diphtheriae* отличаются по уровню и характеру цитопатического действия на клеточной линии СНО-К1.

4. Воздействие факторов врожденного и приобретенного иммунитета у больных с манифестированными формами дифтерии приводит к понижению, у бактерионосителей – к повышению адгезивного потенциала токсигенных штаммов *C. diphtheriae*.

5. Препарат АЗБ оказывает подавляющий дозозависимый эффект на адгезивную активность планктонных и биопленочных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae*.

МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследований. В работе использовали штаммы токсигенных коринебактерий (*C. diphtheriae gravis tox*⁺№ 665, *C. diphtheriae gravis tox*⁺№ 6765, *C. diphtheriae mitis tox* № 269, полученные из ГИСК им. Л. А. Тарасевича; *C. diphtheriae gravis tox*⁺, выделенный от больного с диагнозом «дифтерия ротоглотки локализованная»; *C. diphtheriae gravis* с «молчащим» токсигеном) и штаммы недифтерийных коринебактерий (*C. pseudodiphtheriticum* - 49 шт.). Использовали образцы сыворотки крови больных дифтерией ротоглотки локализованной (30 чел.) и токсической (30 чел.), бактерионосителей токсигенных штаммов *C. diphtheriae* (30 чел.), здоровых не привитых (30 чел.) и привитых АКДС- и АДС-М-препаратами (30 чел.) в соответствии с Национальным календарем прививок. Образцы сыворотки крови больных дифтерией и бактерионосителей взяты в период эпидемии дифтерии в г. Ростове-на-Дону (1997 - 1999 г.г.) и хранились при -20°С.

Бактериологические методы. Основные биологические свойства (морфологические,

культуральные, ферментативные, токсигенные и др.) *C. diphtheriae* исследовали в соответствии с МУК «Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции: методические указания», 2013. Моделирование процесса биопленкообразования штаммами *C. diphtheriae* проводили по методу (Watnick P., 2000).

Физико-химические методы. Образцы сыворотки крови исследовали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле по методу Laemmli U. K. (1970г.) и масс-спектрометрическим методом с использованием масс-спектрометра Autoflex («BrukerDaltonics», Германия). Идентификацию белков проводили по наборам значений масс пептидов (программа Mascot Search Results, www.matrixscience.com, «Matrix Science», США), базы данных SwissProt 2014_04.

Молекулярно-биологические методы. Наличие гена токсигенности определяли методом ПЦР (ДНК-Технология, Россия).

Культуральные методы. Адгезивные и инвазивные свойства планктонных и биопленочных культур штаммов коринебактерий определяли на культуре клеток карциномы фарингеального эпителия Her-2 (Ott L., 2010), цитопатического действия - на клеточной линии СНО-К1 (Данченко Е.О., 2012; Фрешни Р., 2010). Влияние факторов естественного и искусственного происхождения на адгезивность и инвазивность *C. diphtheriae* исследовали в опытах по прерыванию адгезии и инвазии на клеточной линии Her-2 с использованием препаратов комплемента и антитоксина дифтерийного диагностического (ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России, Россия), лактоферрина (Sigma-Aldrich, США), исследованных образцов сыворотки крови, азоксимера бромида (НПО Петровакс Фарм, Россия).

Микроскопические методы. Использовали световую микроскопию (окраска по Романовскому-Гимзе), флуоресцентную - с помощью люминесцентного микроскопа Nikon Eclipse Ni-U (Япония), электронную - в электронном микроскопе JEM-1011 (Jeol, Япония).

Иммунологические методы. Использовали ИФА для определения противодифтерийных антибактериальных и антитоксических антител (Лабушкина А.В., 2009; Лабушкина А.В., 2010), лактоферрина (Нусcult Biotechnology (НТВ) BV, Нидерланды), антител к лактоферрину - (Organtec Diagnostika GmbH, Германия). Определение количества С3- и С4-компонентов системы комплемента проводили иммунохимическим методом (Beckman Coulter, США).

Статистические методы. Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием программы Statistica 12.0 (StatSoft, США) с использованием параметрических и непараметрических методов.

Результаты исследования

При исследовании адгезивности штаммов *C. diphtheriae* на клеточной линии Her-2, не чувствительной к действию экзотоксина (табл.1) обнаружили, что адгезивность как

планктонных, так и биопленочных культур всех исследованных штаммов *C. diphtheriae* постепенно увеличивалась ($p \leq 0,05$) от 2 ч культивирования ($0,003 \pm 0,003 - 0,26 \pm 0,01$ КОЕ/мл) до 8 ч ($13,03 \pm 0,1 - 34,12 \pm 0,1$ КОЕ/мл) и 18 ч ($18,9 \pm 0,03 - 203,3 \pm 3,3$ КОЕ/мл). Наиболее выраженными адгезивными свойствами обладал штамм *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий). Известно, что адгезия *C. diphtheriae* на клетках человека обусловлена такими поверхностными структурами, как пили, белки DIP0733 (67-72p), DIP1281. Однако в последнее время установлено, что возбудитель дифтерии, считавшейся ранее не инвазивной инфекцией, способен и к проникновению внутрь клеток с помощью тех же белков-адгезинов (Ott L., 2017; Weerasekera D., 2018, 2019). В соответствии с этим, возникает интерес, в какие периоды и при каких условиях развития инфекционного процесса поверхностные белки коринебактерий выступают в роли адгезинов и/или инвазинов.

По результатам исследования планктонных культур коринебактерий (табл.2), процессы инвазии к 18-му ч культивирования на клеточной линии Hep-2 доминировали над адгезией у штаммов *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий) и *C. diphtheriae gravis tox+* № 665. У штаммов *C. diphtheriae gravis tox+* № 6765, *C. diphtheriae gravis* (с «молчащим» *tox*-геном) и *C. diphtheriae mitis tox+* № 269 напротив, адгезивная активность превышала ($p \leq 0,05$) инвазивную. Такие же результаты обнаружили и при исследовании 120-часовых биопленочных культур штаммов коринебактерий. У 720-часовых биопленочных культур исследованных штаммов *C. diphtheriae* адгезивность не отличалась от таковой по сравнению с планктонными и 120-часовыми биопленочными культурами. В то же время показатели инвазивной активности 720-часовых биопленочных культур всех исследованных штаммов коринебактерий были существенно (в 50-120 раз) ниже ($p \leq 0,05$) адгезивных. Динамика их инвазивности характеризовалась низкими значениями при экспозиции культивирования 2 ч ($0,01 \pm 0,01 - 0,25 \pm 0,002$ КОЕ/мл), незначительным увеличением к 8 ч культивирования ($0,35 \pm 0,01 - 5,62 \pm 0,47$ КОЕ/мл) и снижением к 18 ч ($0 - 3,54 \pm 0,07$ КОЕ/мл). Наиболее выраженные адгезивно-инвазивные свойства обнаружены у токсигенного штамма *C. diphtheriae* (циркулирующий). Полученные данные позволяют предположить, что на ранних стадиях патологического процесса при дифтерии возбудитель, придерживаясь стратегии выживания, проникает внутрь клеток, избегая, таким образом, воздействия иммунной системы хозяина и антибиотиков. В дальнейшем, при формировании биопленки, способность к адгезии коринебактерий сохраняется на высоком уровне, а инвазивность постепенно снижается. Наиболее выраженное снижение инвазивных свойств (более чем в 50 раз) наблюдали у циркулирующего штамма коринебактерий, как наиболее приспособленного к условиям существования в организме. Это свидетельствует о том, что на более поздних стадиях патологического процесса при дифтерии возбудитель, адаптировавшись, выходит из эпителиальных

Таблица 1. - Показатели адгезии планктонных и биопленочных (120- и 720-часовых) культур штаммов *C. diphtheriae* ((КОЕ±m) x 10²)

Штаммы	Планктонная культура			120-час. биопленочная			720-час. биопленочная		
	2 ч	8 ч	18 ч	2 ч	8 ч	18 ч	2 ч	8 ч	18 ч
<i>C. diphtheriae gravis</i> <i>tox+</i> (циркулирующий)	0,26±0,01	33,3±3,3**	193,3±3,3**	0,24±0,01	32,3±3,3**	203,3±3,3*,**	0,26±0,01	34,1±0,1**	201,4±0,3*,**
<i>C. diphtheriae gravis</i> <i>tox+</i> №665	0,13±0,01	26,8±0,4**	113,3±3,3**	0,14±0,01	27,8±0,36**	120,0±0,01*,**	0,17±0,02	20,7±0,2*,**	112,0±0,1**
<i>C. diphtheriae gravis</i> <i>tox+</i> №6765	0,03±0,003	20,2±2,7**	60,0±5,8**	0,096±0,01	20,2±2,9**	61,0±0,6**	0,05±0,05	19,9±0,2**	60,6±0,6**
<i>C. diphtheriae gravis</i> (с «молчащим» <i>tox</i> - геном)	0,20±0,01	14,5±0,1**	27,7±0,3**	0,21±0,01	13,7±0,1**	26,7±0,3**	0,19±0,01	15,9±0,08**	18,0±0,01*,**
<i>C. diphtheriae mitis</i> <i>tox+</i> №269	0,17±0,01	18,02±0,04**	18,9±0,3**	0,22±0,09	17,8±0,04**	19,6±0,2**	0,23±0,01	13,03±0,1*,**	25,0±0,01*,**

Примечание:

*- достоверность отличий ($p \leq 0,05$) между планктонными и биопленочными культурами внутри каждой временной экспозиции

** - достоверность отличий ($p \leq 0,05$) между экспозициями 2 ч и 8 ч, 2 ч и 18 ч для каждой культуры (планктонной и биопленочной)

Таблица 2. - Показатели инвазии планктонных и биопленочных (120- и 720-часовых) культур штаммов *C. diphtheriae* ((КОЕ±m) x 10²)

Штаммы	Планктонная культура			120-час. биопленочная			720-час. биопленочная		
	2 ч	8 ч	18 ч	2 ч	8 ч	18 ч	2 ч	8 ч	18 ч
<i>C. diphtheriae gravis</i> <i>tox+</i> (циркулирующий)	0,19±0,07	23,3±3,3**	216,7±6,7**	0,19±0,7	24,3±3,3**	206,6±6,6**	0,17±0,01	5,62±0,5*,**	3,54±0,07*,**
<i>C. diphtheriae gravis</i> <i>tox+</i> №665	0,06±0,01	14,7±0,3**	140,0±9,9**	0,06±0,01	13,6±0,3**	133,3±3,3**	0,053±0,02	3,23±0,09*,**	1,53±0,01*,**
<i>C. diphtheriae gravis</i> <i>tox+</i> №6765	0	1,2±0,5	40,0±5,7**	0	1,2±0,5	40,0±5,6**	0,01±0,01	1,41±2,6	0,44±0,02*
<i>C. diphtheriae gravis</i> <i>tox+</i> (с «молчащим» геном)	0,37±0,01	0,4±0,01	0,75±0,01	0,39±0,01	0,4±0,01	0,72±0,01	0,22±0,002	0,35±0,01	0
<i>C. diphtheriae mitis</i> <i>tox+</i> №269	0,31±0,003	0,8±0,03	1,37±0,01**	0,33±0,3	0,8±0,03	1,35±0,01**	0,25±0,002	0,50±0,02	0,31±0,001*

Примечание:

*- достоверность отличий ($p \leq 0,05$) между планктонными и биопленочными культурами внутри каждой временной экспозиции

** - достоверность отличий ($p \leq 0,05$) между экспозициями 2 ч и 8 ч, 2 ч и 18 ч для каждой культуры (планктонной и биопленочной)

клеток и формирует биопленку. Межмикробный матрикс биопленки коринебактерий имеет, преимущественно, белковую природу (Харсеева Г.Г., 2013), что может быть обусловлено участием в его формировании адгезинов белковой природы.

Способностью к адгезии и инвазии обладали и штаммы *C. pseudodiphtheriticum*. Известно, что несмотря на отсутствие способности продуцировать токсин штаммы недифтерийных коринебактерий могут быть связаны с развитием гнойно-септических процессов различной локализации, а также воспалительных заболеваний респираторного и урогенитального тракта, кожи и др. (Тауч А., 2015). Установлено, что штаммы *C. pseudodiphtheriticum*, выделенные от обследованных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта, обладали более высокой адгезивной активностью по сравнению с таковыми, выделенными от практически здоровых лиц. Исследованные штаммы *C. pseudodiphtheriticum*, помимо выраженной адгезивной активности имели и способность к инвазии, что представлено на электронограмме (рис. 1), где видна электронно-прозрачная клетка коринебактерий, внедрившаяся в цитоплазму клетки фарингеального эпителия Нер-2. Это подтверждает предположение о роли адгезивно-инвазивного потенциала не продуцирующих токсин штаммов коринебактерий в развитии острого воспалительного процесса в респираторном тракте. Внутриклеточное расположение создает этим микроорганизмам определенные преимущества, позволяя избежать защитного действия иммунной системы организма, а также антибактериальных препаратов.

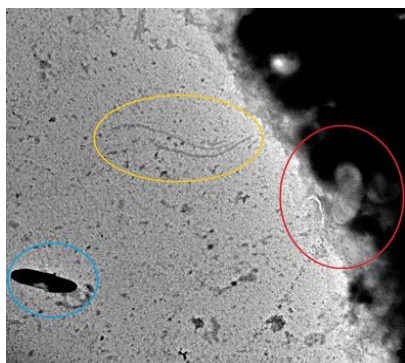


Рис. 1. Электронно-микроскопическое исследование инвазии штамма *C. pseudodiphtheriticum*, на культуре клеток карциномы фарингеального эпителия Нер-2. (Увеличение $\times 20\,000$), контрастирование по методу Luft J.H. и тетраоксидом осмия (VIII)
На электронограмме представлены: клетка коринебактерий, внедрившаяся в цитоплазму (обведена красным); клетка коринебактерий, расположенная внеклеточно (обведена синим); контурированные микроворсинки клетки Нер-2 (обведены желтым)

При колонизации носоглотки токсигенными штаммами возбудителя дифтерии происходит выделение токсина, способствующего гибели эпителиальных клеток. Это приводит к развитию как манифестированных форм инфекции, так и бессимптомных. В межэпидемический период, когда клинически выраженные формы дифтерии не регистрируются, эпидемический процесс поддерживается за счет бактерионосителей, у которых процесс колонизации носоглотки сопровождается формированием биопленки. По нашим данным (табл.3), цитопатический эффект на клетки СНО-К1 оказывали как токсигенные штаммы *C. diphtheriae*, так и штамм *C. diphtheriae* с «молчащим» *tox*-геном и недифтерийные коринебактерии, выделенные от практически здоровых лиц. При этом ЦПД штаммов *C. diphtheriae* более выражено, чем

недифтерийных коринебактерий. При исследовании биопленочных культур коринебактерий и, особенно, 720-часовых, интенсивность ЦПД ($p \leq 0,05$) значительно снижалось.

Таблица 3. Динамика цитопатического действия фильтратов планктонных и биопленочных культур штаммов коринебактерий

Исследованные штаммы	Культура	Количество живых клеток СНО-К1 (%)		
		24 ч	48 ч	72 ч
1. Токсигенные штаммы (<i>C. diphtheriae gravis tox+</i> (циркулирующий), <i>C. diphtheriae gravis tox+</i> № 665, <i>C. diphtheriae gravis tox+</i> № 6765, <i>C. diphtheriae mitis tox+</i> № 269)	Планктонная	25,3±1,2	10,0±3,2	2,5±1,0
	120-час. биопленочная	86,6±2,2*	17,5±5,0	2,5±1,2
	720-час. биопленочная	82,5±2,2*	52,5±2,6*	25,0±3,0*
2. <i>C. diphtheriae gravis</i> (с «молчащим» tox-геном)	Планктонная	7,5±1,2	0	0
	120-час. биопленочная	85,0±5,3*	91,7±5,0*	0
	720-час. биопленочная	82,1±3,4*	79,3±4,5*	83,2±4,3*
3. Недифтерийные коринебактерии (n=11)	Планктонная	57,3±3,3	32,2±2,1	23,6±2,3

Условные обозначения:

*- достоверность различий ($p \leq 0,05$) между планктонными и биопленочными культурами штаммов коринебактерий при каждой экспозиции культивирования

Обращает на себя внимание факт обнаружения существенных отличий характера ЦПД различных культур и штаммов коринебактерий (рис. 2). Так, ЦПД планктонных и 120-часовых биопленочных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* проявлялось истончением и удлинением клеток СНО-К1, что, по всей видимости, обусловлено действием дифтерийного экзотоксина. У 720-часовых биопленочных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* при некотором снижении уровня выделения токсина, что показали результаты реакции флоккуляции, наблюдали, в основном, округление клеток, а также истончение и удлинение. Данный факт свидетельствовал о снижении интенсивности выделения дифтерийного токсина штаммами *C. diphtheriae* в составе биопленки по сравнению с планктонными культурами. Это могло быть связано, с одной стороны, с формированием межмикробного матрикса, препятствующего выделению токсина за его пределы. С другой, - со снижением интенсивности процессов метаболизма и синтеза факторов патогенности бактериями в составе биопленки. При разрушении биопленки с последующим пересевом культуры возбудителя на сывороточный агар, интенсивность выделения токсина восстанавливалась.

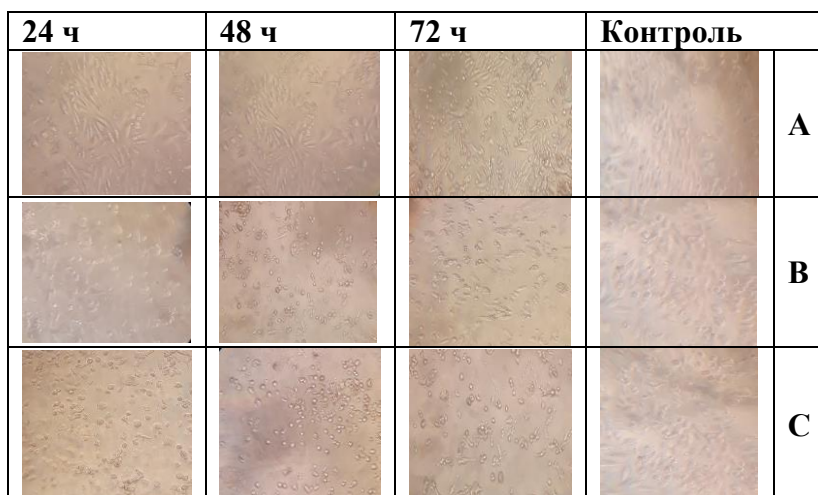


Рис. 2. Характер цитопатического действия планктонных культур штаммов *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий) (А), *C. diphtheriae gravis* (с молчащим *tox*-геном) (В) и недифтерийных коринебактерий (С)

Обнаруженные закономерности имеют и патогенетическое значение: небольшое количество токсина, выделяемое за пределы биопленки у бактерионосителей, успешно блокируется антитоксическими антителами и развития клинических проявлений дифтерии не происходит. То есть, причина «бессимптомности» носительства при дифтерии состоит не только в том, что у бактерионосителей, как правило, имеется высокий уровень антитоксических антител, нейтрализующих токсин. Важное значение имеет и тот факт, что в их организме формируется биопленка и, как следствие этого, количество выделяемого токсина возбудителем за пределы матрикса снижается.

Для планктонных и биопленочных культур штаммов, не продуцирующих дифтерийный экзотоксин (*C. diphtheriae* с «молчащим» *tox*-геном и недифтерийных коринебактерий) характерно ЦПД в виде округления клеток СНО-К1 и образования симпластов. В соответствии с этим, наблюдавшееся нами изменение клеток СНО-К1 в виде округления у биопленочных культур не связано с действием токсина, а может быть обусловлено ферментами коринебактерий (протеаза, нейраминидаза и др.), а также фрагментами поверхностных структур – адгезинов, проникших через поры бактериальных фильтров. На способность поверхностных структур коринебактерий оказывать повреждающий эффект указывают и другие авторы (Weerasekera D., 2019). Учитывая, что адгезивная активность *C. diphtheriae* в составе биопленки увеличивается, изменение характера ЦПД в виде округления у 720-часовых биопленочных культур токсигенных штаммов коринебактерий может происходить под влиянием их адгезии на клетках СНО-К1, что и способствует их округлению. При исследовании биопленочных и, особенно 720-часовых культур штамма *C. diphtheriae* с «молчащим» *tox*-геном количество измененных в виде округления клеток СНО-К1 было значительно меньше ($p \leq 0,05$), чем у планктонных культур коринебактерий. Округление клеток СНО-К1 с последующим образованием симпластов могло быть результатом как патогенного действия коринебактерий, так и метаболических процессов,

интенсивность которых у них резко снижается в составе биопленки.

Попадая в организм, возбудитель дифтерии сталкивается с воздействием факторов врожденного и адаптивного иммунитета, которые оказывают определенное влияние на способность коринебактерий прикрепляться к эпителиальным клеткам. В связи с этим, представляло интерес исследовать воздействие образцов сыворотки крови различных контингентов обследованных, содержащих эти факторы, на адгезивные и инвазивные свойства штаммов *C. diphtheriae*. При воздействии образцов сыворотки крови бактерионосителей на продуцирующие токсин штаммы *C. diphtheriae* (рис. 3) адгезивная активность их планктонных культур величилась ($p \geq 0,05$) в 1,5-2 раза, а биопленочных – понижалась ($p \geq 0,05$). В то же

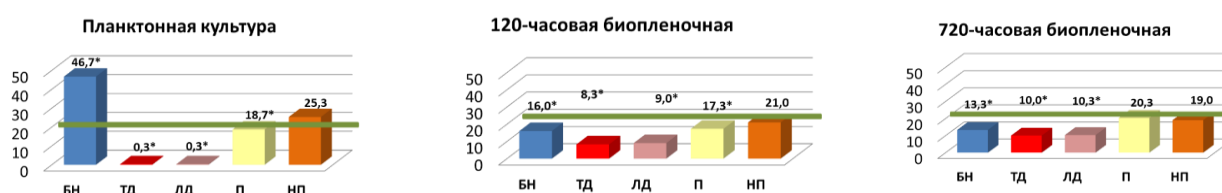


Рис. 3. Показатели адгезии планктонных и биопленочных культур штамма *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий) при воздействии образцов сыворотки крови различных контингентов обследованных

по оси ординат – уровень адгезивной активности (КОЕ/мл),

по оси абсцисс – контингент обследованных (БН – бактерионосители; ДТ – дифтерия ротоглотки токсическая; ДЛ – дифтерия ротоглотки локализованная; П – привитые; НП – непривитые)

Условные обозначения:

— показатели адгезии исследованных культур, не подвергшихся воздействию образцов сыворотки крови обследованных (контроль);

* - статистическая значимость отличий ($p \leq 0,05$) по сравнению с контролем

время под действием образцов сыворотки крови бактерионосителей на не продуцирующий токсин, но несущий ген токсигенности штамм *C. diphtheriae*, наблюдали снижение адгезивности ($p \geq 0,05$) как его планктонной, так и биопленочных культур. Это свидетельствует о том, что определенную роль в повышении адгезивной активности коринебактерий играет выделяемый ими токсин. В организме бактерионосителей, имеющих повышенный уровень антитоксических антител в сыворотке крови, выделяемый *C. diphtheriae* токсин эффективно нейтрализуется антитоксическими антителами на клеточной поверхности в месте входных ворот инфекции, в результате чего повреждения эпителия не происходит (Кветная А.С., 2000). Образующийся иммунный комплекс (токсин-антитоксин) модифицирует клеточную поверхность и создает благоприятные условия для адгезии и колонизации дифтерийной палочки. Противодифтерийные антитоксические антитела блокировать адгезины коринебактерий не могут, что и обнаружено при исследовании *in vitro* воздействия антитоксина на адгезивные свойства планктонных и биопленочных культур коринебактерий. Уровень антибактериальных

антител, направленных против поверхностных структур коринебактерий у бактерионосителей низок, поэтому адгезины у *C. diphtheriae* «свободны» и формируют биопленку. Это подтверждает тот факт, что межмикробный матрикс дифтерийной биопленки имеет преимущественно белковую природу (Харсеева Г.Г., 2012) и, по всей видимости, сформирован адгезинами. За пределы биопленки выделяется меньшее количество токсина, эффективно блокирующегося антитоксическими антителами, а также лактоферрином, содержание которого у носителей выше по сравнению с больными манифестированной формой дифтерии. В свою очередь известно, что антимикробные пептиды могут выступать в роли адьювантов, стимулируя адаптивный иммунный ответ (Чеботарь И.В., 2020), в том числе, и выработку антитоксических антител. Изолированно *in vitro* лактоферрин полностью блокировал адгезию планктонных и биопленочных культур *C. diphtheriae*. Однако известно, что повышенный уровень лактоферрина может стимулировать комплемент-зависимое формирование биопленки, а образовавшийся вследствие этого межмикробный матрикс устойчив к прямому воздействию лактоферрина (Kanwar J.R., 2015).

Изменения показателей инвазивной активности исследованных штаммов *C. diphtheriae* под воздействием образцов сыворотки крови бактерионосителей имели, в целом, такие же закономерности. Это указывает на существующую взаимосвязь адгезивности и инвазивности возбудителя дифтерии, что объясняется общностью поверхностных структур (DIP 0733, DIP1281), отвечающих за эти процессы.

Под воздействием образцов сыворотки крови больных манифестированными формами дифтерии наблюдали наиболее выраженное снижение адгезивной и инвазивной активности как планктонных, так и биопленочных культур исследованных штаммов *C. diphtheriae* по сравнению с образцами сыворотки других контингентов обследованных. Это можно объяснить наличием антибактериальных антител, блокирующих поверхностные структуры коринебактерий, обуславливающих адгезию и инвазию. Однако в образцах сыворотки крови привитых противодифтерийными препаратами уровень антибактериальных антител не отличался от такового у больных локализованной и токсической формами дифтерии ротоглотки, но снижения адгезивных свойств планктонных и 120-часовых биопленочных культур продуцирующих токсин штаммов *C. diphtheriae* не наблюдали. В то же время аналогичные результаты обнаружены и при исследовании воздействия на адгезивность и инвазивность штаммов *C. diphtheriae* и образцов сыворотки крови непривитых, содержащих относительно низкий уровень антибактериальных антител. Отличия в воздействии образцов сыворотки различных контингентов обследованных на адгезивность и инвазивность штаммов *C. diphtheriae* могут быть связаны с наличием в них не только антибактериальных антител и лактоферрина, но и иных белков. Об этом свидетельствовали данные дендрограммы (рис. 4), где видно, что наибольшим сродством по

масс-спектру белков обладали образцы сыворотки крови больных манифестированными формами дифтерии и привитых противодифтерийными препаратами. Образцы сыворотки крови бактерионосителей и непривитых АКДС- и АДС-М-препаратами существенно отличаются от

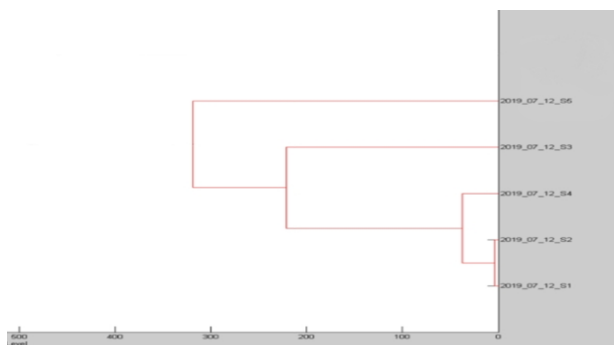


Рис. 4. - Дендрограмма масс-спектрометрического анализа образцов сыворотки крови различных контингентов обследованных (S1 – дифтерия ротоглотки токсическая; S2 – дифтерия ротоглотки локализованная; S3 – бактерионосители; S4 – привитые АКДС- и АДС-М-препаратами; S5 – непривитые АКДС- и АДС-М-препаратами)

них. Можно предположить, что различный масс-спектр белковых субстанций, содержащихся в образцах сыворотки крови указанных контингентов обследованных связан с различным характером их воздействия на адгезивные свойства штаммов *C. diphtheriae*. Так, в образцах сыворотки крови бактерионосителей более широко по сравнению с другими контингентами обследованных представлен спектр белков Human-like protein, являющихся мощным ингибитором апоптоза и способных при воздействии на митохондрии увеличивать выработку АТФ, что и обуславливает выживание клеток в стрессовых условиях. Помимо этого, у бактерионосителей, как и здоровых привитых и непривитых противодифтерийными препаратами, шире спектр и белков семейства металлотIONEинов (англ. *Metallothionein*) по сравнению с больными манифестированными формами дифтерии. Эти белки связывают тяжелые металлы, в том числе, железо и цинк, утилизируя их в организме. Известно, что удержание железа в человеческих клетках – один из важнейших механизмов защиты хозяина, используемый для предотвращения роста бактерий (Gaudet P., 2011; Ibraim I.C., 2019; Peng E.D., 2018; Sharma N.C., 2019). В свою очередь, возбудитель дифтерии в условиях низкого содержания железа в свободном состоянии в организме размножается менее интенсивно, происходит активация адгезивного аппарата коринебактерий и усиливается биопленкообразование. *C. diphtheriae* начинают выделять токсин, который задерживается матриксом биопленки, а выйдя за ее пределы, блокируется антитоксическими антителами и лактоферрином. Перечисленные особенности белкового спектра сыворотки крови бактерионосителей способствуют, по-видимому, активации адгезивного аппарата коринебактерий, биопленкообразованию и длительной персистенции в организме.

Известно, что в состав используемых для вакцинации препаратов дифтерийного анатоксина входят и бактериальные антигены возбудителя, но иммунный ответ на них не формируется (Лабушкина А.В., 2009). Для лечения больных дифтерией и бактерионосителей используют антибактериальную терапию, однако учитывая увеличение в последние годы количества

антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов, встает вопрос о разработке иных подходов к борьбе с этой инфекцией. Одним из них может явиться использование веществ с антиадгезивной активностью, способных оказывать блокирующее воздействие на множественные адгезины бактерий. (Klein T., 2010; Krachler AM., 2012). В этом отношении использование АЗБ, обладающего универсальной адсорбционной активностью, является более перспективным. Это подтверждается тем, что этому препарату свойственна антиадгезивная активность в отношении всех исследованных штаммов возбудителя дифтерии. По нашим данным (рис. 5) установлено, что антиадгезивный эффект АЗБ имел четкую зависимость от дозы препарата и экспозиции его воздействия. При использовании АЗБ в концентрации 300 мг/л и 600 мг/л наиболее выраженный антиадгезивный эффект к 8 ч культивирования на модели культуры клеток Нер-2 этот препарат оказывал на штаммы *C. diphtheriae mitis tox⁺* № 269 и *C. diphtheriae gravis* с «молчащим» *tox*-геном, к 18 ч - на штаммы *C. diphtheriae gravis tox⁺* (циркулирующий), *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665 и *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 6765. При использовании АЗБ в концентрации 1200 мг/л эти различия нивелировались, и адгезивная активность коринебактерий к 18 ч культивирования у всех исследованных штаммов возбудителя дифтерии снижалась до нуля.

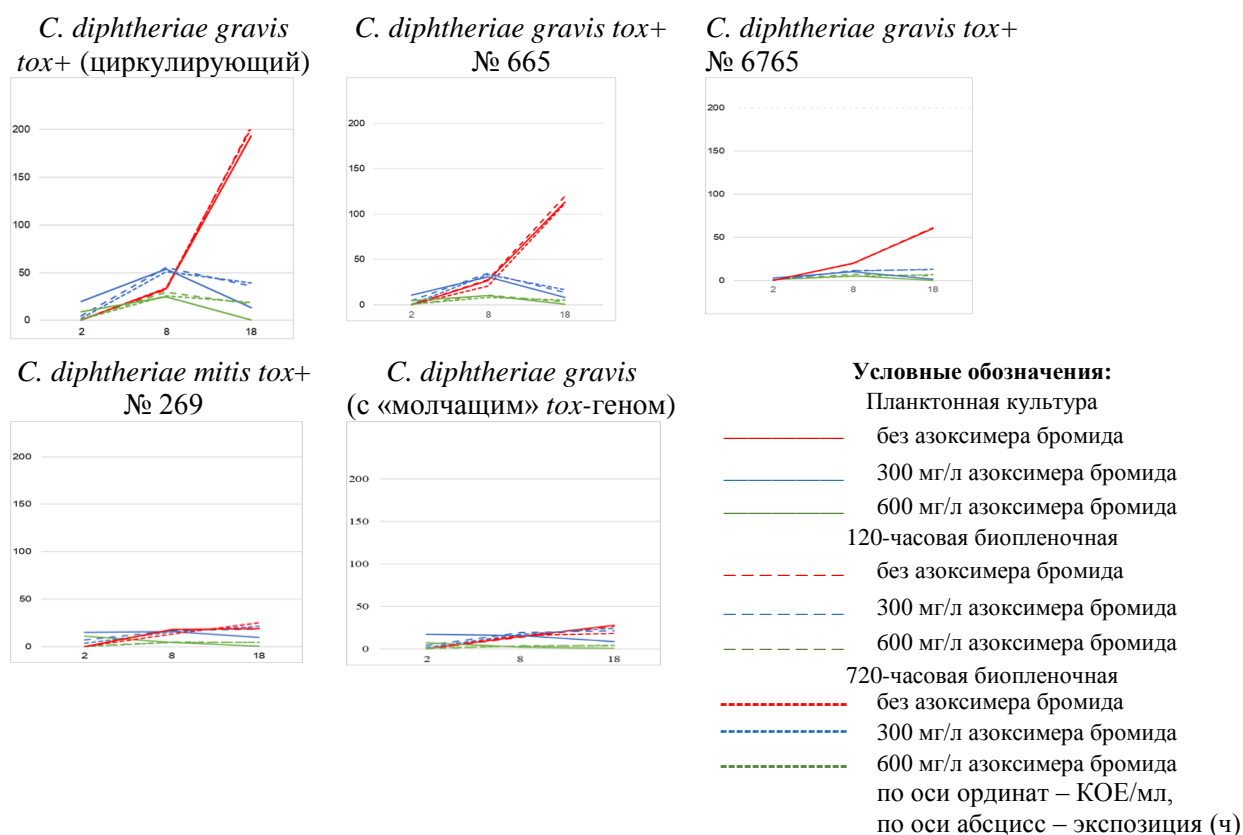


Рис. 5. Влияние азоксимера бромид на адгезивную активность планктонных и биопленочных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae*

Вслед за адгезией и колонизацией на эпителии верхних дыхательных путей возбудитель дифтерии формирует биопленку, что позволяет ему персистировать в организме на поздних стадиях манифестированных форм дифтерии и бактерионосительстве. При исследовании воздействия АЗБ на биопленочные культуры возбудителя дифтерии обнаружили, что этот препарат оказывал на них выраженный антиадгезивный эффект. Однако динамика этого процесса несколько отличалась от таковой у планктонных культур коринебактерий. Так, на 2-м ч культивирования под воздействием АЗБ наблюдали выраженное снижение адгезивных свойств биопленочных культур всех исследованных штаммов коринебактерий, но к 8-му ч адгезия увеличивалась. Это свидетельствовало, по всей видимости, о том, что на 2-м ч культивирования адгезия носит неспецифический обратимый характер. К 8- и 18-му ч культивирования АЗБ оказывал более выраженный антиадгезивный эффект на планктонные культуры коринебактерий, чем на биопленочные (фаза специфического взаимодействия). Данный факт может свидетельствовать в пользу того, что АЗБ соединяется белками клеточной стенки и пилиями, но не матриксом биопленки. Это указывает на целесообразность использования АЗБ на ранних стадиях инфекционного процесса у больных и контактных. У бактерионосителей, при наличии сформировавшейся биопленки, назначение этого препарата может быть менее эффективно. АЗБ оказывает менее выраженное воздействие на штаммы с «молчащим геном» и *C. diphtheriae mitis* № 269, что свидетельствует о влиянии токсина как на адгезивность, так и на взаимодействие коринебактерий с АЗБ.

Выраженная антиадгезивная активность иммуномодулятора АЗБ в отношении коринебактерий связана, по всей видимости, с высокой адсорбционной активностью и особенностями химической структуры (N-оксидированное производное полиэтиленпиперазина). Вероятно, аминогруппы АЗБ вступают во взаимодействие с кислотными остатками белков, входящих в состав адгезинов коринебактерий и межмикробного матрикса биопленки. Это влечет за собой ингибирование адгезивности как планктонных, так и биопленочных культур возбудителя дифтерии. Следует отметить, что суточная доза АЗБ при введении в организм составляет 6 - 12 мг, что в 5 - 10 раз превышает концентрацию АЗБ (1200 мг/л), полностью блокирующую адгезию возбудителя дифтерии на клетках фарингеального эпителия. При этом пролонгированное воздействие АЗБ (18 ч) более эффективно, чем кратковременное (2 ч и 8 ч), что необходимо учитывать при возможном назначении этого препарата для лечения и профилактики дифтерийной инфекции.

Применение препарата АЗБ как антиадгезина в отношении дифтерийных бактерий представляет интерес, прежде всего с тех позиций, что АЗБ эффективно блокирует адгезию коринебактерий именно на клетках фарингеального эпителия, на которых и происходит адгезия и колонизация возбудителя в естественных условиях. Эффективность применения АЗБ для

лечения и неспецифической профилактики дифтерийной инфекции как препарата с антиадгезивной активностью дополняется и его иммуномодулирующим воздействием, активирующим иммунный ответ организма. Использование АЗБ может способствовать снижению циркуляции штаммов возбудителя дифтерии в популяции благодаря его антиадгезивному действию.

ВЫВОДЫ

1. Адгезивная и инвазивная активность планктонных и 120-часовых биопленочных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* увеличивалась в динамике культивирования на клеточной линии Нер-2 (от $0,003 \pm 0,003$ до $203,3 \pm 3,3$ КОЕ/мл, от 0 до $216,7 \pm 6,7$ КОЕ/мл соответственно). У 720-часовых биопленочных культур адгезивность постепенно увеличивалась к 18 ч культивирования (до $201,4 \pm 0,3$ КОЕ/мл), а инвазивность незначительно повышалась к 8 ч (до $5,62 \pm 0,5$ КОЕ/мл) и снижалась к 18 ч (до $3,54 \pm 0,07$ КОЕ/мл). Адгезивно-инвазивный потенциал наиболее выражен у штамма *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий).

2. На ранних стадиях патологического процесса при дифтерии *C. diphtheriae*, обладая высокой адгезивной и инвазивной активностью, прикрепляется к эпителиальным клеткам, проникает в них, а затем, на более поздних, при сохранении выраженной способности к адгезии и постепенном снижении инвазивности, выходит из клеток и формирует биопленку с участием адгезинов, защищаясь таким образом от воздействия факторов иммунитета и антибактериальных препаратов.

3. Уровень цитопатического действия более выражен у планктонных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae*, чем биопленочных (количество живых клеток СНО-К1 составило до $25,3 \pm 1,2\%$ и $86,6 \pm 2,2\%$ соответственно), что указывает на снижение интенсивности выделения дифтерийного экзотоксина в составе биопленки. Это может быть связано с формированием межмикробного матрикса, препятствующего выделению токсина за его пределы, и снижением интенсивности процессов метаболизма и синтеза факторов патогенности бактериями в составе биопленки. Для цитопатического действия планктонных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* характерно истончение и удлинение клеток СНО-К1, обусловленное действием токсина, биопленочных – округление, связанное с иными факторами патогенности коринебактерий помимо токсина, в том числе, и адгезинами.

4. Под воздействием факторов врожденного и адаптивного иммунитета у больных с манифестированными формами дифтерии адгезивная активность токсигенных штаммов *C. diphtheriae* понижается ($p \leq 0,05$), что не приводит к формированию биопленки и не препятствует выделению токсина. У бактерионосителей на фоне низкого содержания антибактериальных антител ($0,0023 \pm 0,0001$ МЕ/мл), высокого уровня антитоксических антител (СГТ - $1:316,2$ ($234,4-426,5$)) и лактоферрина ($1000,0 \pm 0,2$ нг/мл), а также более широкого спектра

сывороточных белков, обладающих способностью ингибировать апоптоз и связывать тяжелые металлы, в том числе и железо, адгезивность токсигенных штаммов *C. diphtheriae* повышается (в 1,5-2 раза), что предрасполагает к формированию биопленки, понижению выделения токсина за ее пределы и, как следствие, длительной персистенции в организме.

5. Препарат азоксимера бромид способствует подавлению адгезии как планктонных, так и биопленочных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* в десятки и сотни раз в зависимости от дозы и экспозиции его воздействия. Антиадгезивное воздействие препарата азоксимера бромида более выражено по отношению к планктонным культурам токсигенных штаммов *C. diphtheriae*, чем биопленочным ($p \leq 0,05$), что может быть связано с его способностью соединяться с белками клеточной стенки и пилиями, но не матриксом биопленки.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Для неспецифической профилактики и как дополнительный препарат для лечения дифтерии возможно использовать препарат азоксимера бромид, обладающий выраженной как антиадгезивной, так и иммуномодулирующей активностью. При использовании этого препарата для лечения и неспецифической профилактики дифтерии необходимо учитывать, что более эффективно пролонгированное воздействие азоксимера бромида, чем кратковременное. Использование азоксимера бромида целесообразно на ранних стадиях инфекционного процесса у больных и контактных, тогда как у бактерионосителей, при наличии сформировавшейся биопленки, назначение этого препарата может быть менее эффективно.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность за оказанную помощь в проведении культуральных исследований и масс-спектрометрического анализа сотрудникам ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора: заведующему лабораторией гибридом, главному научному сотруднику д.б.н., профессору Л.П. Алексеевой и ведущему научному сотруднику, заведующему музея живых культур с центром патогенных для человека вибрионов к.б.н. О.С. Чемисовой.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

СНО-К1	-	клетки яичников китайского хомячка
CdiLAM	-	липоарабиноманнан
DIP	-	поверхностный белок
Нер-2	-	клетки карциномы фарингеального эпителия
АТФ		аденозинтрифосфат
АЗБ	-	азоксимера бромид
АДС-М	-	адсорбированный дифтерийно-столбнячный анатоксин с уменьшенным содержанием антигена
АКДС	-	адсорбированная коклюшно-дифтерийно-столбнячная вакцина
БН	-	бактерионосители
ДЛ	-	дифтерия ротоглотки токсическая

ДТ	-	дифтерия ротоглотки локализованная
ИФА	-	иммуноферментный анализ
КОЕ	-	колониеобразующая единица
НП	-	непривитые АКДС- и АДС-М-препаратами
П	-	привитые АКДС- и АДС-М-препаратами
ЦПД	-	цитопатическое действие

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК РФ для опубликования результатов диссертационных исследований:

1. Харсеева Г.Г. Адгезия *Corynebacterium diphtheriae*: роль поверхностных структур и механизм формирования / Г.Г. Харсеева, **А.А. Алиева** // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии. - 2014. - №4. - С. 109-117. (SCOPUS, Импакт-фактор РИНЦ 0,464; цит.-7)

2. **Алиева А.А.** Факторы патогенности недифтерийных коринебактерий, выделенных от больных с патологией респираторного тракта / А.А. Алиева, Г.Г. Харсеева, Э.О. Мангутов, С.Н. Головин // Клиническая лабораторная диагностика. - 2018. - Том 63. - № 6. - С. 375- 378. (SCOPUS, Импакт-фактор РИНЦ 0,528; цит. - 3)

3. Харсеева Г.Г. Цитопатическое действие возбудителя дифтерии в составе биопленки / Г.Г. Харсеева, **А.А. Алиева**, Л.П. Алексеева, Э.О. Мангутов, Л.А. Шовкун // Клиническая лабораторная диагностика. - 2019. - Том 64. - № 11. - С. 681-685. (SCOPUS, Импакт-фактор РИНЦ 0,528)

4. Харсеева Г.Г. Подавление бактериальной адгезии: Современные подходы, проблемы и перспективы / Г.Г. Харсеева, А.Ю. Миронов, **А.А. Алиева** // Успехи современной биологии. - 2019. - Том 139. - № 5. - С. 506-515. (Импакт-фактор РИНЦ 0,749)

Патенты на изобретения:

Патент на изобретение РФ № 2672862, от 20.11.2018. Способ отбора пациентов в группу риска по развитию фолликулярной ангины / Харсеева Г.Г., **Алиева А.А.**, Воронина Н.А., Мангутов Э.О. - Заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава РФ. - Бюл. № 32. - 15 с.

Публикации в других изданиях:

1. Харсеева Г.Г. Способность к адгезии типовых и биопленочных культур токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae* / Г.Г. Харсеева, **А.А. Алиева**, О.И. Сылка, С.Ю. Тюкавкина, Л.П. Алексеева // Альманах клинической медицины. - 2017. - Том 45. - № 2. - С. 154-158. (Импакт-фактор РИНЦ 0,513; цит. - 3)

2. Харсеева Г.Г. Адгезивные и инвазивные свойства токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae* / Г.Г. Харсеева, **А.А. Алиева**, А.В. Чепусова, Э.Л. Алутина, О.И. Сылка // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2019. - Том. 18. - № 3. - С. 22-27. (Импакт-фактор РИНЦ 0,687)

3. **Алиева А.А.** Инвазия как фактор патогенности возбудителей коринебактериальной инфекции / А.А. Алиева, Э.О. Мангутов // Известия ГГТУ Медицина. Формация. Научные труды. - Орехово-Зуево, 2020. - С. 21-25.

Публикации в сборниках трудов и материалов научных конференций:

1. **Алиева А.А.** Адгезивная активность *Corynebacterium diphtheriae* / А.А. Алиева, Г.Г. Харсеева, Л.П. Алексеева, Н.А. Воронина // Проблемы медицинской микологии (приложение). - Санкт-Петербург, 2015. - Том 17. - № 2 - С. 37.

2. **Алиева А.А.** Адгезивные свойства типовых и биопленочных культур возбудителя дифтерии / А.А. Алиева, Г.Г. Харсеева, Я.Н. Фролова, А.В. Лабушкина, Н.А. Воронина // Актуальные проблемы диагностики инфекционных заболеваний (микробиология, биотехнология, эпидемиология, паразитология). Сб. научн-практ. работ Межрегиональной научно-практической конференции. - Ростов-на-Дону, 2015. - С.13-14.

3. Воронина Н.А. Гемолитическая активность штаммов *Corynebacterium non diphtheriae*, выделенных в г. Ростове-на-Дону и Ростовской области / Н.А. Воронина, Г.Г. Харсеева, О.И. Сылка, А.В. Лабушкина, **А.А. Алиева** // Актуальные проблемы диагностики инфекционных заболеваний (микробиология, биотехнология, эпидемиология, паразитология). Сб. научн-практ. работ Межрегиональной научно-практической конференции. – Ростов-на-Дону, 2015. – С.27-29.
4. Харсеева Г.Г. Адгезивная активность штаммов *Corynebacterium diphtheriae* / Г.Г. Харсеева, **А.А. Алиева**, А.В. Лабушкина // 90 лет в авангарде микробиологической науки в Беларуси. Сб. трудов Республиканской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 125-летию со дня рождения Б.Я. Эльберта. – Минск, 18 декабря 2015. – С.169-172.
5. **Алиева А.А.** Воздействие иммуномодулятора полиоксидония на адгезивные свойства возбудителя дифтерии. / А.А. Алиева, Г.Г. Харсеева, Э.Л. Алутина, О.И. Сылка, С.Ю. Тюкавкина // Воздушно-капельные инфекции: микробиология, эпидемиология, биотехнология. Сб. научно-практических работ V Межрегиональной научно-практической конференции. - Ростов-на-Дону, 2016. – С.3-4.
6. **Алиева А.А.** Взаимодействие штаммов *Corynebacterium diphtheriae tox⁺* с культурой клеток Нер-2 / А.А. Алиева, Г.Г. Харсеева // Сборник материалов 3-ей итоговой научной сессии молодых ученых РостГМУ. – Ростов-на-Дону, 1 июня 2016. - С. 20-21.
7. **Алиева А.А.** Влияние способности к биопленкообразованию на адгезивную активность *Corynebacterium diphtheriae* / А.А. Алиева, Г.Г. Харсеева, Я.Н. Фролова, Н.А. Воронина, О.И. Сылка // Проблемы медицинской микологии (приложение). – Санкт-Петербург, 2016. – Том 18. – № 2. – С. 36.
8. Харсеева Г.Г. Методология исследования процесса инвазии недифтерийных коринебактерий / Г.Г. Харсеева, **А.А. Алиева**, Н.А. Воронина // Актуальные вопросы эпидемиологии, микробиологии и диагностики инфекционных и паразитарных заболеваний в Ростовской области. Материалы региональной научно-практической конференции. – Ростов-на-Дону, 2017. - С.161-162.
9. **Алиева А.А.** Способность к адгезии и инвазии токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae* / А.А. Алиева, Г.Г. Харсеева // Сборник материалов 4-ой итоговой научной сессии молодых ученых РостГМУ. – Ростов-на-Дону, 1 июня 2017. – С. 9-10.
10. **Алиева А.А.** Адгезивные и инвазивные свойства недифтерийных коринебактерий / А.А. Алиева, Г.Г. Харсеева, Э.О. Мангутов, Н.А. Воронина, Э.Л. Алутина // Проблемы медицинской микологии (приложение). – Санкт-Петербург, 2018. – Том 20. – № 2. – С. 47.
11. Харсеева Г.Г. Современные подходы к ингибированию адгезии *Corynebacterium diphtheriae* / Харсеева Г.Г., **Алиева А.А.** // Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации. Сборник материалов V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Орехово-Зуево, 30 ноября 2018. – С. 302-309.
12. **Алиева А.А.** Подавление адгезии типовых и биопленочных культур токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae* / А.А. Алиева, Г.Г. Харсеева, Л.П. Алексева, Э.Л. Алутина // Проблемы медицинской микологии (приложение). – Санкт-Петербург, 2019. – Том 21. – № 2. – С. 35-36.