

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РОСТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

На правах рукописи

АЛИЕВА АННА АЛЕКСАНДРОВНА

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

03.02.03 – микробиология

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель: профессор, д.м.н. Г.Г. Харсеева

Ростов-на-Дону
2020

Содержание

	Стр
ВВЕДЕНИЕ	5
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	14
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Адгезивные и инвазивные свойства <i>C. diphtheriae</i>	14
1.2. Современные подходы к подавлению адгезивной активности микроорганизмов	26
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	35
2.1. Микробные штаммы	35
2.2. Моделирование процесса биоплёнкообразования штаммами <i>C. diphtheriae</i>	35
2.3. Методы определения биологических свойств планктонных и биоплёночных (120- и 720-часовых) культур штаммов <i>C. diphtheriae</i>	36
2.3.1. Морфологические, культуральные и ферментативные свойства	36
2.3.2. Токсигенные свойства	36
2.3.3. Цитопатическое действие	37
2.3.4. Гемолитическая активность	37
2.3.5. Гемагглютинирующая активность	38
2.3.6. Адгезивные свойства	38
2.3.6.1. Культуральный метод	38
2.3.6.2. Флуоресцентная микроскопия	39
2.3.6.3. Электронная микроскопия	39
2.3.7. Инвазивные свойства	40
2.3.7.1. Культуральный метод	40
2.3.7.2. Электронная микроскопия	41
2.4. Сыворотки, использованные в работе, и методы их исследования	41

2.4.1. ИФА для определения противодифтерийных антибактериальных антител	41
2.4.2. ИФА для определения противодифтерийных антитоксических антител	41
2.4.3. Иммунохимический анализ для определения С3- и С4-компонентов комплемента	42
2.4.4. ИФА для определения уровня лактоферрина и антител к лактоферрину	42
2.4.5. Электрофорез белков в полиакриламидном геле	42
2.4.6. Масс-спектрометрический анализ	43
2.5. Методы исследования воздействия факторов естественного и искусственного происхождения на адгезивные и инвазивные свойства <i>C. diphtheriae</i>	44
2.5.1. Образцы сыворотки крови различных контингентов обследованных	44
2.5.2. Комплемент	44
2.5.3. Лактоферрин	45
2.5.4. Антитоксин диагностический дифтерийный	46
2.5.5. Азоксимера бромид	46
2.6. Статистические методы	47
ГЛАВА 3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	
Патогенные свойства планктонных и биоплёночных (120- и 720-часовых) культур штаммов <i>C. diphtheriae</i>	48
3.1. Адгезивность и инвазивность	49
3.2. Токсигенность и токсичность	61
ГЛАВА 4. Влияние факторов естественного и искусственного происхождения на адгезивные и инвазивные свойства <i>C. diphtheriae</i>	77
4.1. Факторы врожденного и адаптивного иммунитета	77

4.2. Азоксимера бромид	96
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	107
ВЫВОДЫ	117
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	118
БЛАГОДАРНОСТЬ	119
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ	119
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	121
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	143
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. СТАТИСТИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ	147

ВЕДЕНИЕ

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 [132, 134, 140, 142, 155, 178, 180, 184, 187]. Адгезия *Corynebacterium 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 [17]. 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 [15, 16]. Способность к адгезии в настоящее время рассматривается как один из ведущих факторов патогенности *C. diphtheriae* [133, 134].

Прикрепление *C. diphtheriae* к слизистой оболочке зева является необходимым условием для дальнейшего развития инфекционного процесса [133, 155, 164]. 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 [13, 133, 140, 155, 187]. 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 [58, 134]. 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 [5, 36]. Помимо этого, известно, что возбудитель дифтерии обладает способностью формировать биопленку [117], 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* [68, 139, 190]. С другой стороны, для ингибирования адгезии могут применяться аналоги адгезинов – синтетические низкомолекулярные пептиды, гиалуроновая кислота, липотейхоевые кислоты, которые имитируют структуру поверхностных адгезинов бактерий [190].

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 [155]. 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 [37, 38].

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 [3, 13, 14, 15], посвященные изучению адгезии дифтерийного микроба, а процессы инвазии коринебактерий не рассматривались вообще. В Германии [129, 130] и США [116, 117, 173] 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 токсин 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 2018г.).

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 15.06.2020г.) – 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» *tox*-геном) 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 [29]. 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°C.

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 [177].

Физико-химические методы. Образцы сыворотки крови исследовали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле по методу [107] (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 [129], цитопатического действия - на клеточной линии СНО-К1 [9, 31]. 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 [19, 20], лактоферрина (Nucult 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.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Адгезивные и инвазивные свойства *C. diphtheriae*

Главным фактором патогенности возбудителя дифтерии *C. diphtheriae*, известного до недавнего времени как внеклеточный патоген, является экзотоксин. Процесс токсинообразования и механизм его воздействия на человеческий организм хорошо изучены. Однако в настоящее время очень мало известно о начальном этапе развития дифтерийной инфекции - адгезии, которая является необходимым условием для размножения возбудителя дифтерии, увеличения численности его популяции и продукции токсина. Адгезия играет важнейшую роль в колонизации возбудителем слизистой оболочки зева, лежащей в основе здорового бактерионосительства, без искоренения которого невозможна полная ликвидация дифтерии [2, 16]. В связи с этим, способность к адгезии рассматривается как один из ведущих факторов патогенности *C. diphtheriae* [129].

Адгезия представляет собой сложный многокомплексный процесс, обеспечивающий колонизацию микроорганизмами любых плотных субстратов, включая ткани человеческого организма и животных [117, 124, 143, 153]. Прикрепление бактерий к эпителиальным клеткам - первый этап развития большинства инфекций. В основе специфического прикрепления бактерий к клеткам лежит сродство соответствующих адгезинов к субстратам, выполняющим функцию рецепторов [117, 143].

Патогенные бактерии имеют невероятно большое разнообразие молекул адгезии, которые позволяют им прикрепляться к различным компонентам поверхности клетки-хозяина и занимать определенные ниши в человеческом организме [143]. Процесс адгезии у возбудителя дифтерии имеет общие закономерности с таковым у других грамположительных бактерий.

В реализации контакта микроорганизм - хозяин важную роль играет строение клеточной стенки бактерий и наличие пилей или фимбрий. Пили являются структурами, в том числе, обеспечивающими адгезию, и обнаружены у таких грамположительных микроорганизмов, как представители рода *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Actinomyces* и др. [41, 73, 135, 142, 143, 173].

Кроме фимбрий или пилей существует множество неполимерных адгезинов, которые распознают различные структурные элементы поверхности тканей хозяина (рецепторы), в том числе, компоненты внеклеточного матрикса - коллаген, эластин, гликопротеины, гиалуроновую кислоту. Рецепторы клеток хозяина (углеводы или пептидные белковые фрагменты) имеют структуру, комплементарную адгезину, и находятся на поверхности эукариотической клетки [22]. Адгезивные гликопротеины человека, такие как фибронектин и фибриноген, могут присутствовать в секретах или плазме, быть ассоциированными с молекулами мембран, распознаваться различными видами патогенных бактерий и выступать в роли рецепторов для них [105].

Поверхностные белки - адгезины являются ключевыми факторами запуска инфекционного процесса у большинства бактериальных патогенов. Более 40 лет назад Sjöquist [164] представил первые доказательства того, что поверхностные белки грамположительных бактерий обладают способностью прикрепляться к клеткам восприимчивого организма. Значительная часть грамположительных микроорганизмов посредством поверхностных белков, пилей или фимбрий связывается с мембранами клеток хозяина, уклоняясь от факторов врожденного и адаптивного иммунитета. Затем происходит колонизация возбудителями клеток человеческого организма и, в ряде случаев, межклеточное и внутриклеточное распространение в эпителиальных тканях и клетках иммунной системы хозяина [124]. Многие поверхностные белки (в том числе адгезины) у грамположительных бактерий ковалентно связаны с пептидогликаном клеточной стенки с помощью ферментов сортаз [67].

У большинства грамположительных микроорганизмов структуры пилей были описаны сравнительно недавно, а в последнее время стали известны

механизмы сборки пилей [169]. Сборка пилей (фимбрий) у грамположительных бактерий может требовать наличия такого уникального фактора, как фермент транспептидаза [110, 125, 157, 173, 185]. У многих грамположительных микроорганизмов вся клеточная поверхность, включая пили (фимбрии) и пептидогликан клеточной стенки, практически является адгезивной. С помощью фимбрий (или пилей) бактерии инициируют плотное взаимодействие возбудителя с клетками хозяина. В геномах этих бактерий обнаружены характерные кластеры фимбриальных генов, кодирующих синтез множества сортаз (транспептидаз) и транскрипционных регуляторов, координирующих экспрессию фимбрий в ответ на изменение условий внешней среды [44, 50, 55, 75, 116, 120, 123, 170, 175].

В настоящее время экспериментальные данные по изучению адгезии *C. diphtheriae* на клетках хозяина ограничены, однако известно, что в этом процессе участвуют как непосредственно компоненты клеточной стенки, так и поверхностные структуры - пили (фимбрии), ковалентно связанные с пептидогликаном [117, 121].

Микроорганизмы рода *Corynebacterium* характеризуются сложным строением КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ, которая напоминает таковую у микобактерий [66, 74]. Цитоплазматическая мембрана *C. diphtheriae* покрыта слоем пептидогликана, ковалентно связанного с арабиногалактаном, который является дополнительным гетерополисахаридным слоем. Пептидогликан содержит диаминопимелиновую кислоту и связан с миколовыми кислотами, а также с производным миколовой кислоты – коринемиколом [87]. Над поверхностным слоем пептидогликана расположен липид – димиколат трегалозы, названный корд-фактором. С этим полимером граничит слой миколовых кислот, липидоманнан и липоарабиноманнан. Верхний наружный слой клеточной стенки состоит из свободных полисахаридов, гликолипидов и белков, включая пили. Вся оболочка коринебактерий пронизана белками – коринебактериальными поринами [58].

ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ (ИЛИ ПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ) МЕМБРАНА (ЦПМ) - основной диффузный барьер клеток *C. diphtheriae*. Как и у других

бактерий, ЦПМ *C. diphtheriae* состоит из фосфолипидов, собранных в липидный бислой, который дополнительно содержит другие полярные липиды, жирные кислоты (насыщенная пальмитиновая и ненасыщенная деценовая кислоты) и большое разнообразие белков. Такая структура ЦПМ чрезвычайно важна для реализации процессов переноса и биоэнергетики клетки [58]. Основными фосфолипидами ЦПМ являются фосфатидилглицерол, дифосфатидилглицерол и фосфатидилинозитол.

Состав жирных кислот может существенно изменяться в зависимости от условий окружающей среды (низкая температура или наличие остатка углерода). Жирные кислоты синтезируются путем последовательных циклов многоступенчатой реакции [149, 152]. Описано два различных типа синтеза жирных кислот (FAS – fatty acid synthesis, англ.). При реализации типа FAS-I задействован крупный многофункциональный белковый комплекс, типа FAS-II – минимум семь функциональных областей, необходимых для синтеза жирных кислот.

Протеины FAS-I обнаружены у представителей семейства *Corynebacteriaceae*, в том числе, и *C. diphtheriae*. Тип FAS-II, обычно обнаруживаемый у многих бактерий, отсутствует у некоторых коринебактерий, в частности, у *C. diphtheriae* [58].

ПЕПТИДОГЛИКАН. Как и у других бактерий, гликановую часть макромолекулы пептидогликана составляют чередующиеся β -1,4-связанные N-ацетилглюкозаминовые и N-ацетиловые единицы мурамовой кислоты. Образование поперечных связей между различными полимерами гликана происходит через пептидные связи. Пептидогликан у *C. diphtheriae* сшит напрямую, как и у *C. bovis*, *C. pseudodiphthericum*, *C. pseudotuberculosis*, *C. striatum*, *C. ulcerans* и *C. xerosis*; межпептидные мостики, которые можно обнаружить у других грамположительных бактерий, отсутствуют. Сложная архитектура пептидогликана коринебактерий обеспечивает ригидность их клеточной оболочки и форму клеток [58]. В отличие от *Escherichia coli* или *Bacillus subtilis*, каркас клеточной стенки коринебактерий и родственных им

таксонов состоит не только из пептидогликана, но, ко всему прочему, в нем имеется слой арабиногалактана, ковалентно сшитый с пептидогликаном, который, в свою очередь, связан с миколовыми кислотами [58, 71, 146].

АРАБИНОГАЛАКТАН - гетерополисахарид, состоящий из D-арабинозы и D-галактозы. У *C. glutamicum* чередующиеся сшитые остатки D-галактозы образуют линейную цепочку примерно из 30 сахарных долей, соединенных с пептидогликаном связывающим агентом. Арабиногалактан у *C. glutamicum* состоит только из арабинозы и галактозы, а у *C. diphtheriae* включает и большое количество маннозы, у *C. amycolatum* и *C. xerosis* отличается дополнительным содержанием глюкозы [58, 146]. В любом случае арабиногалактан обеспечивает ковалентную связь не только с пептидогликаном, но и с наружной мембраной [58].

МИКОЛОВЫЕ КИСЛОТЫ И МИКОЛАТ ТРЕГАЛОЗЫ формируют второй барьер проницаемости, эквивалентный наружной мембране грамотрицательных бактерий, что является главной особенностью коринебактерий, нокардий и микобактерий. На эффективность этого барьера оказывает немалое влияние содержащаяся в нем миколовая кислота [82, 95]. Внутренняя часть слоя миколовой кислоты коринебактерий сформирована, главным образом, миколовыми кислотами, связанными с арабиногалактаном; во внешнем слое преобладают трегалоза и глицерин-эстерифицированные миколовые кислоты. Кроме того, можно обнаружить незначительное количество свободных миколовых кислот.

В коринебактериях обнаружены миколовые кислоты приблизительно с 30 атомами углерода (коринемиколаты), в нокардиях – с 50 (нокардиомиколаты), в микобактериях – с 70-90 (эумиколаты) [71]. По сравнению с линейными жирными кислотами фосфолипидов, миколовые кислоты являются длинноцепочечными α -разветвленными и β -жирными оксикислотами [118].

Слой миколовых кислот функционально эквивалентен наружной мембране грамотрицательных бактерий не только как физиологический барьер проницаемости, но и как важный компонент взаимодействия хозяин - паразит

[58]. Составные элементы слоя миколовых кислот могут активировать систему врожденного иммунитета, способствуя экспрессии TLR, и ингибировать функцию макрофагов [58]. Эти свойства были наилучшим образом показаны на примере *Mycobacterium tuberculosis* [95]. Димиколат трегалозы (корд-фактор), называемый также фактором жгутообразований, препятствует лизису микобактерий внутри макрофагов хозяина, способствуя в то же самое время активации макрофагов [96]. Относительно коринебактерий данные не столь обширны, однако известно, что он способствует устойчивости к фагоцитозу и считается фактором патогенности *C. diphtheriae*. Корд-фактор, которым обладает возбудитель дифтерии, нарушает процессы дыхания и фосфорилирования клеток организма хозяина [88].

ЛИПИДОМАННАН и ЛИПОАРАБИНОМАННАН. У коринебактерий, как и у других прокариот, липидный бислой клеточной оболочки не симметричен. Причиной асимметрии является введение гликоконъюгатов в ее внешний слой. Производные липидоманнана и липоарабиноманнана обнаружены у различных видов коринебактерий [146], причем распределение липидоманнан - и липоарабиноманнан-подобных веществ видоспецифично.

В клеточной стенке *C. diphtheriae* обнаружен липоарабиноманнан массой 10 кД, получивший название CdiLAM. Основная структура CdiLAM *C. diphtheriae* схожа с липоарабиноманнаном микобактерий и несколько отличается от липоарабиноманнана нокардий и других коринебактерий. CdiLAM, расположенный на поверхности клеточной оболочки *C. diphtheriae*, способствует связыванию с эпителиальными клетками хозяина и, взаимодействуя с TLR2, активирует дендритные клетки и Т-хелперы [121]. CdiLAM, в отличие от нефимбриального адгезина 67-72 (см. ниже), не связывается с эритроцитами человека, но взаимодействует с клетками Her-2. Обработка бактериальных клеток штамма *C. diphtheriae* 241 антителами (IgG) к CdiLAM полностью блокирует процесс их адгезии на Her-2-клетках [121]. Кроме того, очищенный CdiLAM ингибирует присоединение *C. diphtheriae* к клеткам Her-2. Следовательно, на основании поведения CdiLAM на клетках респираторного тракта, его можно

рассматривать как адгезин и потенциальный фактор вирулентности *C. diphtheriae* [58, 129].

НЕФИМБРИАЛЬНЫЙ ПОВЕРХНОСТНЫЙ БЕЛОК 67-72p (или DIP0733), кодирующийся одним геном, обнаружен у штаммов *C. diphtheriae*, лишенных фимбрий [66]. Белок 67-72p способен распознавать и специфически связываться с эритроцитами человека, вызывая их агглютинацию [154]. Обнаружение клеточного (а не фимбриального) адгезина объясняет, почему некоторые авторы не выявили пилей у штамма, обладающего гемагглютинирующей активностью [13]. Кроме того, белок 67-72p способен связываться и с клетками Нер-2 [121], причем присоединение к данной линии эпителиальных клеток блокируется анти-67-72p IgG-антителами. Интересно, что была установлена отрицательная корреляция между способностью *C. diphtheriae* к адгезии на клетках линии Нер-2 и эритроцитах: штамм с низкой гемагглютинирующей способностью показал высокую активность адгезии к Нер-2-клеткам, и наоборот [89, 129]. Дифтерийные токсигенные штаммы, выделенные от больных, оказались более адгезивными (в отношении эритроцитов), чем носительские штаммы. Среди последних наиболее адгезивными оказались штаммы, выделенные при длительном носительстве, а не при кратковременном [14]. Установлено, что белок 67-72p способствует также инвазии *C. diphtheriae* в клетки Нер-2 и индуцирует их апоптоз [121].

ПОВЕРХНОСТНЫЙ БЕЛОК DIP1281 вначале считался ассоциированным с инвазией. Белок DIP1281 является представителем группы NlpC/P60 - большого надсемейства, объединяющего несколько различных групп белков [45, 174], в том числе и предполагаемых протеаз, являющихся белками, связанными с инвазией. Он встречается у бактерий, бактериофагов, РНК-вирусов, эукариотов, а также различных представителей непатогенных и патогенных коринебактерий, в частности, *C. diphtheriae*, *C. efficiens*, *C. glutamicum* и *C. jeikeium* [129]. Окрашивание бифлюоресцентными красителями и атомно-силовая микроскопия показали, что мутации DIP1281 вызывают изменение белковых структур клеточной поверхности и формирование цепей бактериальных клеток. DIP1281 не является ключевым фактором при отделении пептидогликанового слоя делящихся

бактерий: разрушение цепей не снижает жизнеспособность бактерий. Функции DIP1281 ограничены наружной мембраной *C. diphtheriae* [129].

Структурные повреждения, вызванные дефектом DIP1281, препятствуют адгезии соответствующих мутантов возбудителя дифтерии к эпителиальным клеткам хозяина и инвазии в них, что свидетельствует о его роли не только в инвазии, но и в адгезии [129].

КОРИНЕБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПОРИНЫ – каналообразующие белки, способствующие транспорту питательных веществ в клетку. Наиболее хорошо порины изучены у *C. glutamicum*, где представлены в виде PorA-, PorB-, PorC- и PorH-белков. Гомологи этих белков обнаружены у *C. diphtheriae*, *C. callunae*, *C. efficiens* [58].

ПИЛИ (ФИМБРИИ). Белковые нити на поверхности коринебактерий, известные как пили (или фимбрии) - наиболее хорошо изученный фактор адгезии, необходимый для последующей колонизации. Пили (фимбрии), ковалентно связанные с пептидогликаном клеточной стенки, являются главным структурным компонентом бактерий для прикрепления их к абиотическим и биотическим поверхностям. Среди представителей семейства *Corynebacteriaceae* пили впервые были обнаружены у *C. renale* [183], позже - у *C. diphtheriae* [153, 172]. В геноме типового штамма *C. diphtheriae* NCTC13129, относящегося к эпидемическому клону Rossija/Sankt-Peterburg, представлены три различных генетических кластера: spaABC, spaDEF, spaHGI. Каждый кластер кодирует синтез фимбрий соответствующих типов, представленных основными белками SpaA, SpaD и SpaH, формирующими ось фимбрий [170]. Помимо основных белков в состав пилей входят и другие (малые) субъединицы: SpaB, SpaC, SpaE, SpaF, SpaG и SpaI. SpaB равномерно распределяется вдоль стержня пилей, а SpaC, SpaF или SpaG располагаются на его конце. Штаммы *C. diphtheriae* характеризуются разнообразным набором пилей [130] с различными биофизическими свойствами. Между пилеями разных типов имеются антигенные различия.

Кластеры генов, кодирующих каждый тип фимбрий, содержат гены сортаз (srt - surface protein sorting, англ.). Эти транспептидазы специфически

катализируют ковалентное связывание фимбриальных протеинов между собой, а основание фимбрий - с клеточной стенкой бактерий. Для такого связывания в С - концевом участке молекулы белка имеется специфический сайт с аминокислотной последовательностью LPxTG (где «х» обозначает любую аминокислоту). Сортаза расщепляет данную последовательность и связывает белок с определенной аминокислотной группой другого мономера, образуя таким образом полимерную основу фимбрии. Для катализируемого сортазами «заякоривания» белка в клеточной стенке важную роль играет располагающийся следом за LPxTG-участком гидрофобный мембранный домен, а также концевая часть молекулы с положительным зарядом. Фиксация белка в клеточной стенке наступает в результате сортазозависимого расщепления LPxTG-последовательности между треонином (Т) и глицином (G) с последующим связыванием остатка треонина с аминокислотной группой пептидогликана [75, 80].

SpaA-тип фимбрий *C. diphtheriae* кодируется кластером генов spaA-srtA-spaB-spaC. Структурная основа пилия SpaA-типа состоит из большой SpaA-субъединицы, на боковой поверхности которой располагается малая субъединица SpaB, а на кончике пилия находится другая малая субъединица SpaC. Подобным образом устроены SpaD- и SpaH-пили. Наличие LPxTG-мотива как у больших, так и у малых фимбриальных субъединиц *C. diphtheriae*, делает возможным катализируемое сортазами закрепление их на бактериальной клеточной стенке в мономерной форме. Показано, что малые субъединицы фимбриальных протеинов (SpaB, -C, -E, -F, -G, -I) могут быть связаны не только с большими фимбриальными субъединицами (SpaA, -D, -H), но и непосредственно с клеточной стенкой [113, 116]. Следовательно, адгезивной у коринебактерий может являться, как уже указывалось, вся поверхность клеточной стенки. Формирование пилей и скорость адгезии - не связанные процессы. Штаммы, их не имеющие, также могут прикрепляться к клеткам хозяина [129], что указывает на наличие факторов адгезии помимо пилей (CdiLAM, белок 67-72p и DIP1281).

Адгезия каждого типа пилей контролируется минорным антигеном пилей, содержащим аминокислотную последовательность LPxTG и «заякоренным» в

клеточной стенке коринебактерий, и происходит строго индивидуально к разным типам эпителиальных клеток [170, 173]. Каждый тип пилей, предположительно, реагирует с соответствующими структурами (рецепторами) эпителиальных клеток, что позволяет *C. diphtheriae* колонизировать различные виды слизистых оболочек [173]. Наличие пилей различных типов у одного микроорганизма обуславливает их избирательную функциональную активность, тропизм к определенным клеткам и тканям.

Пили SpaA-типа обеспечивают взаимодействие *C. diphtheriae* с фарингеальными эпителиальными клетками. Адгезия на эпителии гортани и бронхов происходит за счет пилей SpaD и SpaH типов [129]. Интересно, что при отсутствии SpaA-субъединицы и, соответственно, нитевидных выростов SpaA-типа, коринебактерии остаются способными адсорбироваться на фарингеальных клетках, а в отсутствии малых субъединиц SpaB- и SpaC-типа – нет. Это объясняется тем, что большие субъединицы являются лишь структурными компонентами пилей, а малые – функциональными компонентами, играющими ключевую роль в адгезии.

При исследовании адгезии возбудителя дифтерии в культуре клеток Нер-2 обнаружены две модели их взаимодействия: локализованная и диффузная. При локализованной модели коринебактерии формируют изолированные «микрocolонии» на поверхности клеток Нер-2, тогда как при диффузной – хаотично располагаются по поверхности [131].

На начальных этапах инфекционного процесса минорные пилины Spa-типа, ассоциированные с пиями и клеточной стенкой, формируют зону «тесной адгезии», участвуя, с одной стороны, в связывании с клеткой хозяина в составе пилей, с другой, – находясь в составе клеточной стенки бактерии. Вначале с рецепторами эпителиальных клеток связываются концы пилей, затем – боковые субъединицы от верхушки до основания пилей по типу замка «молнии» [116]. Впоследствии во взаимодействие вступают малые субъединицы, расположенные на клеточной стенке коринебактерий, что обеспечивает тесный контакт бактериальных адгезинов и человеческих клеток. Такая плотная адгезия играет

важную роль в патогенезе, предотвращая диссоциацию бактерий, усиливая их взаимодействие с клетками хозяина и колонизацию.

Процесс адгезии *C. diphtheriae* облегчается действием фермента нейраминидазы (сиалидазы), разрушающей сиаловые кислоты на поверхности клетки хозяина, тем самым освобождая клеточную поверхность от слизи и интенсифицируя межклеточное взаимодействие. В дальнейшем токсин, связываясь со своим рецептором, проникает внутрь клетки хозяина и парализует ее жизнедеятельность посредством ингибирования синтеза белка. Клетка некротизируется и таким образом формируется безопасное убежище для адгезированного возбудителя, где он может размножаться, колонизируя другие клетки хозяина [143]. При колонизации специфические белки пилей экспрессируются на поверхности вновь образующихся бактериальных клеток, что облегчает дальнейшее их прикрепление к клеткам хозяина [66, 116, 143].

В фагоцитирующих клетках, помимо этого, выживание *C. diphtheriae* может быть обусловлено и их способностью индуцировать апоптоз и некроз человеческих макрофагов [52]. Интересно, что как токсигенные, так и нетоксигенные штаммы коринебактерий способны адгезироваться на поверхности макрофагов и вызывать их гибель. Способность *C. diphtheriae* убивать нефагоцитирующие клетки может быть полезной для выживания штамма и инвазии в глубокие ткани. Индукция апоптоза и некроза при дифтерийной инфекции не всегда напрямую связана с продукцией дифтерийного токсина, а может быть обусловлена и действием поверхностных структур *C. diphtheriae* и ферментов патогенности [36].

Токсигенные штаммы *C. diphtheriae* обладают более выраженными адгезивными свойствами, чем нетоксигенные. При исследовании процессов адгезии живых и убитых культур токсигенного штамма *C. diphtheriae* DSM43989 установлено, что наиболее высокой адгезивной активностью обладает убитая культура по сравнению с живой [131]. Это свидетельствует о том, что дифтерийный токсин оказывает повреждающее действие на рецепторы для адгезинов клетки хозяина, нарушая тем самым адгезию возбудителя [143].

Нетоксигенные штаммы слабо адгезируются и только небольшое количество бактерий проникает внутрь клетки [113].

При дифтерии помимо поражения слизистой верхних дыхательных путей и токсемии формируются и системные осложнения – миокардит, нефрозо-нефрит, пневмония, поражения нервной ткани и кишечника. Это указывает на то, что возбудитель дифтерии способен колонизировать эпителий, а продуцируемый им токсин – проникать в более глубокие ткани, взаимодействуя с различными типами клеток организма [147]. Однако описаны единичные редкие случаи прижизненной бактериемии у больных дифтерией и выделения токсигенного возбудителя из крови и органов умерших, что можно расценивать как свидетельство инвазивности *C. diphtheriae* [87]. Установлено, что токсигенные штаммы *C. diphtheriae* могут не только прикрепляться, но и проникать и выживать в клетках фарингеального эпителия Нер-2 [87], нечувствительных к действию токсина. Способность токсигенных штаммов *C. diphtheriae* к адгезии и инвазии обусловлена поверхностными структурами бактериальной клетки и, в частности, белками DIP1281 и DIP0733 (или 67-72p). Белок DIP0733 вызывает агглютинацию эритроцитов и апоптоз фагоцитирующих клеток, с чем связывают в значительной степени способность коринебактерий к выживанию внутри клеток [154].

Известно, что коринебактерии могут вызывать не только дифтерию, но и такие заболевания как эндокардит, остеомиелит, абсцесс селезенки, септический артрит и др. [147]. Эти системные инфекции предполагают не только прикрепление коринебактерий к эпителиальным клеткам (адгезию), но и проникновение их в более глубокие ткани (инвазию) и сохранение в них (персистенцию). Это встречается редко, но является важным свидетельством способности коринебактерий к инвазии.

Проникая внутрь клеток, коринебактерии осуществляют перестройку цитоскелета клетки-хозяина, вызывая полимеризацию актина у Нер-2 клеток [16, 58, 71, 73, 75, 128]. Способность к агрегации и гидрофобность помогают коринебактериям избежать действия иммунной системы, способствуя их

прикреплению, проникновению и выживанию в эпителиальных клетках слизистой оболочки рото- и носоглотки. Гидрофобность играет важную роль в бактериальной адгезии, обеспечивая формирование биопленки и облегчая распространение в организме внутри фагоцитов. Усиление гидрофобности способствует более интенсивному образованию биопленки, особенно в условиях развития инфекции при дефиците железа [46, 47, 58, 134]. Причиной гидрофобности коринебактерий заключена в наличии липидов в составе клеточной стенки и особом строении коринемиколовых кислот с длиной цепей от 22 до 35 атомов углерода, специфичной для рода *Corynebacterium*.

Таким образом, процесс адгезии, обусловленный поверхностными структурами *C. diphtheriae*, играет ключевую роль в последующей колонизации возбудителем слизистой оболочки зева. Персистенция *C. diphtheriae* в организме при бактерионосительстве может быть связана с адгезинами, которые, как предполагают [22], участвуют в проникновении внутрь клеток организма и формировании биопленки [184]. Учитывая данные [121] о способности адгезинов *C. diphtheriae* стимулировать действие факторов врожденного и адаптивного иммунитета, перспективным в системе профилактики дифтерийного бактерионосительства является разработка новых вакцинных препаратов на основе адгезинов. Создание вакцин, формирующих иммунологическую защиту организма от адгезивной и инвазивной активности *C. diphtheriae*, а также препятствующих их колонизации, позволило бы решить проблему дифтерийного бактерионосительства, справиться с которой существующими средствами вакцинопрофилактики невозможно.

1.2 Современные подходы к подавлению адгезивной активности микроорганизмов

Вакцинопрофилактика дифтерийным анатоксином не способна прерывать процесс адгезии возбудителя дифтерии и, как следствие, формирование бактерионосительства. В связи с этим продолжается циркуляция токсигенных штаммов *C. diphtheriae* в популяции.

Для борьбы с дифтерийным бактерионосительством используется антибактериальная терапия. Но она не всегда успешна и, как теперь стало ясно, из-за образования биопленок. Однако появление штаммов коринебактерий, обладающих резистентностью к антибактериальным препаратам, диктует необходимость поиска новых средств, препятствующих циркуляции *C. diphtheriae* в популяции и, в частности, в организме бактерионосителей. Одним из таких средств может явиться антиадгезивная терапия, направленная на прерывание инфекционного процесса на начальном этапе вплоть до его прекращения за счет блокады адгезии и, как следствие, колонизации бактерий на слизистой оболочке входных ворот инфекции.

В настоящее время известны некоторые способы снижения адгезивной активности микроорганизмов. К ним относят подавление сборки пилей бактериальной клетки под воздействием субингибирующих концентраций антибактериальных препаратов (ципрофлоксацин, амикацин, пенициллин и эритромицин) [85, 145, 182]. Субингибирующие концентрации антибиотиков (1/8 МПК) вызывают нарушения синтеза белка бактериальной клеткой, что влечет за собой продукцию некорректно или частично свернутых поверхностных белков внешних мембран бактерий [53, 72, 144]. Следствием этого процесса является невозможность сборки фимбриальных адгезинов и изменение поверхностного заряда бактериальной клетки. Это влечет за собой подавление специфического взаимодействия бактерий (*C. diphtheriae*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* и *Haemophilus influenzae*) с рецепторами клеток хозяина [55, 65, 69, 72, 76, 85, 91, 93, 144, 189]. Однако следует отметить, что субингибирующие концентрации антибактериальных препаратов (пенициллин, эритромицин) способны усиливать образование биопленки штаммами *C. diphtheriae* и гидрофобность их клеточной поверхности. Способность к биопленкообразованию является одной из причин снижения эффективности антибактериальной терапии при дифтерийной инфекции и, в частности, такой ее формы, как бактерионосительство [65].

Другим подходом к проведению антиадгезивной терапии является подавление синтеза гликосфинголипидов (ГСЛ) мембран клеток хозяина, участвующих в формировании рецепторов для адгезинов бактерий. Для этого используют ингибиторы энзимов, принимающих участие в биосинтезе ГСЛ [119, 151, 166]. К ним относят N-бутилдезоксидиримицин (NB-DNJ), блокирующий церамидспецифическую глюкозилтрансферазу, которая катализирует образование глюкозилцерамида - предшественника ГСЛ. Подобный способ снижения адгезивности микроорганизмов был использован при лечении больных с инфекцией мочевыводящих путей [62, 79, 90, 156]. Истощение ГСЛ в составе клеточных мембран хозяина может достигаться и путем ферментозаместительной терапии с использованием человеческой глюкозилцерамид-глюкозидазы [148]. Данный метод лечения показал свою эффективность при лечении больных с системным сальмонеллезом [137, 167, 168].

Важным направлением разработки веществ, блокирующих адгезию микроорганизмов, является использование аналогов рецепторов клеток хозяина, что обуславливает конкурентные взаимоотношения с адгезинами патогенов [163]. Для этих целей используют различные сахара, гликомиметики, а также вещества пептидной природы. Углеводы в большом количестве присутствуют как на поверхности бактериальных клеток (липосахариды и гликопротеины), так и клеток хозяина (гликопротеины и гликосфинголипиды). В роли аналогов этих веществ могут выступать гликомиметики и синтетические гликозиды, способные связывать патоген и предотвращать его прикрепление к клеткам хозяина [122, 163, 165, 166]. Имеются указания на использование в клинической практике антиадгезивных соединений - бифенил-маннозидов, направленных на предотвращение инфекций мочеполового тракта, вызванных уропатогенной *E. coli*. Антиадгезивное действие этих веществ основано на ингибировании FimH – адгезивной субъединицы, располагающейся на конце фимбриальных адгезинов. FimH является фактором вирулентности уропатогенной *E. coli* и играет ключевую роль в процессе ее колонизации и инвазии в ткань мочевого пузыря и формировании внутриклеточных бактериальных сообществ, ответственных за

рецидивы заболевания. Антагонисты FimH - бифенил-маннозиды - обладают низкой цитотоксичностью и отсутствием перекрестных реакций с маннозосвязывающими рецепторами человеческих клеток. Такой FimH-ингибитор снижает бактериальную колонизацию до уровня, достигаемого применением антибактериального препарата ципрофлоксацина, что делает его целесообразной альтернативой антимикробным средствам [42, 43, 49, 61, 63, 64, 77, 86, 150].

Хорошо известен антиадгезивный эффект клюквенного сока в отношении инфекций мочеполовых путей. Защитный эффект достигается за счет антиадгезивных свойств соединений, входящих в состав клюквенного сока - высокомолекулярных полифенолов и проантоцианидинов [106, 162, 163]. Проантоцианидины подавляют адгезию и коагрегацию уропатогенной *E. coli*, *Helicobacter pylori* и *Porphyromonas gingivalis* [56, 57]. Механизм действия полифенолов и проантоцианидинов состоит в связывании с ресничками и пиллями бактерий, что затрудняет адгезию и формирование биопленки [126, 172].

Для борьбы с адгезией и формированием биопленки *Campylobacter jejuni* используют и экстракт можжевельника обыкновенного (*Juniperus Communis*). Плоды можжевельника эффективно ингибируют адгезию *C. jejuni* к полистиролу, а также формирование биопленки на ранней стадии [98].

Обнаружена способность гликозид-гидролаз из морских гидробионтов прерывать адгезию *C. diphtheriae* к клеткам буккального эпителия. Показано, что деградация углеводов, экспрессированных на поверхности эукариотических клеток или бактерий, гликозид-гидролазами из морских гидробионтов может изменять их структуру и, нарушая уникальность и специфичность лектин-углеводного связывания, препятствовать адгезии [11].

Известен механизм препятствия адгезии, состоящий в использовании сахаров как ложных мишеней бактериальных адгезинов. Слизь, выделяемая эпителием кишечника, действует как физический барьер против колонизации энтеропатогенами. Муциновые гликопротеины, содержащиеся в слизи, имитируют рецепторы эпителиальной поверхности. Они связывают бактерии,

которые в дальнейшем удаляются из желудочно-кишечного тракта при отслоении слизистой оболочки [111, 112, 158, 159, 161]. Очищенный коровий муцин, получаемый из коровьего молока, эффективно предотвращает адгезию бактерий на клетках кишечного эпителия, избирательно подавляя прикрепление грамотрицательных бактерий (*E. coli* и *Salmonella typhimurium*), но не эффективен в подавлении грамположительных бактерий (*Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*). Очищенный коровий муцин слабо влияет на отсоединение бактерий, ранее прикрепившихся к клеткам хозяина, поэтому может применяться скорее для профилактики, чем для лечения [136].

Человеческое грудное молоко также содержит олигосахариды, в состав которых входят сиаловые кислоты, защищающие младенца от колонизации бактериальными патогенами желудочно-кишечного тракта [163]. Олигосахарид человеческого грудного молока дисиалилакто-N-тетраоза предотвращает некротический энтероколит у недоношенных новорожденных [96].

Для борьбы с адгезией используют ингибиторы на пептидной основе, в частности, противокариозные пептиды. *Streptococcus mutans* - один из главных факторов, вызывающих кариес зубов, имеет поверхностный белковый стрептококковый антиген (SA) I/II, который связывается с сиаловыми рецепторами, адсорбированными на гидроксиапатитовой матрице поверхности зуба. SA I/II входит в состав адгезинов *S. mutans*, поэтому моноклональные антитела против SA I/II способны предотвратить колонизацию зубов и кариес у нечеловекообразных приматов, а также колонизацию ротовой полости у людей [186].

Другим кандидатом для антиадгезивной терапии на пептидной основе является мультивалентная адгезивная молекула (МАМ) белка бактериальной поверхности - МАМ 7. Она задействована в первоначальном присоединении к клеткам хозяина у таких видов, как энтеропатогенная *E. coli*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Vibrio cholerae* и *Vibrio parahaemolyticus*, используя два рецептора поверхности клетки хозяина - фибронектин и фосфатидную кислоту мембранных липидов [99, 100]. Полимерные гранулы на основе МАМ7 были

успешно применены для снижения поверхностного присоединения и заражения выделенными из ран пациентов микроорганизмами со множественной резистентностью к лекарственным средствам [100, 101, 102].

Другой механизм предотвращения адгезии – это использование в качестве антиадгезивной терапии антител или иммунных сывороток против бактериальных адгезинов. Организм хозяина для предотвращения прикрепления микроорганизмов может быть иммунизирован бактериальным адгезином или его субъединичными компонентами; иммуногенным пептидным фрагментом отдельного адгезина или группы адгезинов бактериальной клетки; ДНК-вакциной, кодирующей адгезин или его компоненты.

Так, иммунизация мышей основным адгезином T2544 возбудителя брюшного тифа (*Salmonella enterica* серотип *Typhi*) способствовала 10-кратному возрастанию LD50, индукции специфического IgG в сыворотке и секреторного IgA в кишечнике, интенсификации процессов фагоцитоза и комплемент-опосредованного лизиса сальмонелл. Однако иммунизация T2544 полностью не предотвращала развитие заболевания, что, вероятно, было обусловлено наличием других структур, таких как пили типа IV, способствующих проникновению возбудителя в клетку [54, 84, 176].

Для предотвращения колонизации тонкого кишечника кроликов энтеротоксигенной и энтерогеморрагической *E. coli* использовали вакцину, состоящую из гибридного белка основной субъединицы фимбриальных адгезинов, эпитопа из субъединицы В термолабильного токсина и субъединицы А шига-токсина [188]. Иммунизация вызывала формирование антител, направленных на нейтрализацию токсина и блокаду адгезинов *E. coli*. Заражение дважды иммунизированных мышей летальной дозой штамма энтерогеморрагической *E. coli* O157:H7 не вызвало развития заболевания [108].

Иммунизация фимбриальными антигенами FimH *E. coli* позволила снизить колонизацию слизистой оболочки мочевого пузыря более чем на 99% у лабораторных мышей [109]. Иммунизация обезьян фимбриальными антигенами FimH в сочетании с адъювантом вызвала формирование выраженного гуморального иммунного ответа и защитила 3/4 животных от последующего заражения

уропатогенной *E. coli* [114]. Результаты клинических исследований по сравнению эффективности профилактической вакцинации и профилактической терапии антибиотиками показали, что вакцинация была более эффективной для снижения частоты, длительности и тяжести рецидивов инфекций мочеполовой системы [114].

Для лечения инфекций, вызванных штаммами *P. aeruginosa*, обладающими устойчивостью к антибактериальным и дезинфицирующим препаратам, на основе элементов пептидной структуры бактериальных пилей Cachia P.J. и Hodges R.S. (2003) разработали антиадгезивную вакцину и соответствующий лекарственный препарат на основе моноклональных антител [58]. Эти препараты при введении в организм лабораторных мышей были эффективны против многих штаммов *P. aeruginosa* [161]. Авторы отмечали, что выработка эффективного иммунного ответа зависела от конформационной структуры иммуногенного пептида [59].

Для выработки эффективного иммунного ответа необходимо обеспечить представление бактериальных антигенов и их эпитопов в составе вакцинных препаратов в физиологической конформации. Так, живой аттенуированный штамм *Salmonella typhimurium* с экспрессированными на поверхности фимбриальными антигенами *E. coli* (K88ab, K88ac, FedA, и FedF) предотвратил диарею у поросят при иммунизации свиней во время беременности [91, 92]. Вместе с тем, при использовании таких вакцин необходим тщательный контроль реверсии патогенных свойств генетически модифицированных штаммов микроорганизмов [78].

ДНК-вакцины содержат ДНК, кодирующую производные от патогена антигены, способные вызывать формирование как клеточного, так и гуморального иммунитета при введении в организм хозяина [48]. Такие вакцины разработаны для профилактики стафилококковой инфекции. Присоединение *S. aureus* к клеткам хозяина осуществляется с помощью поверхностных белков, связывающихся с белками внеклеточного матрикса с чрезвычайно высокой специфичностью. ДНК-вакцина на основе коллаген-связывающего белка - основного адгезина *S. aureus* - при иммунизации мышей линии Balb/c способствовала формированию как клеточного, так и гуморального иммунитета. Несмотря на то, что антитела к коллаген-связывающему белку распознавали цельные микробные клетки и

подавляли адгезию в лабораторных условиях, они оказались неспособны защитить мышей от внутриперитонеального заражения *S. aureus* [171]. Полипротеиновая ДНК-вакцина против *S. aureus*, состоящая из нескольких плазмид с экспрессией фактора слипания A(ClfA), белка A (FnBPA), связывающего фибронектин, и сортазы (Srt), вызвала как выработку антител, так и формирование клеточного иммунного ответа. Этот препарат обеспечивал частичную защиту от изолята *S. aureus* Sa042 и полную защиту от реактивного артрита после экспериментального заражения культурой *S. aureus* штамма Newman [82].

Помимо поиска эффективных препаратов для антиадгезивной терапии важным является и разработка режимов ее использования. В недавнем исследовании [138] предложен алгоритм лечения раневой инфекции крысы, вызванной *Pseudomonas aeruginosa*, с помощью мультивалентной адгезивной молекулы белка бактериальной поверхности МАМ7, связанной с микроэлементами полистирола. Установлено, что терапевтический эффект МАМ7 обусловлен ее способностью ингибировать адгезию бактерий путем конкуренции за рецепторы на клетках хозяина. Кроме того, МАМ7, проявляя антиадгезивный эффект, тем самым значительно уменьшает скорость размножения бактериальных клеток. Посредством разработанной математической модели показано, что наиболее выраженный эффект лечения раневой инфекции достигается при непрерывной обработке раны МАМ7 и удалением образующегося экссудата. Такой метод лечения позволяет устранить или значительно снизить бактериальную нагрузку.

Таким образом, антиадгезивная терапия имеет определенные преимущества перед традиционной антибактериальной [190]. Важное значение имеет тот факт, что к препаратам для антиадгезивной терапии не формируется резистентность у бактерий. Это связано, прежде всего, с тем, что антиадгезивные препараты ингибируют только связывание бактерий с клетками хозяина, не влияя на жизнеспособность микроорганизмов. При этом антиадгезивные средства эффективны в отношении штаммов бактерий как чувствительных, так и резистентных к антибиотикам. Генетические различия между адгезинами патогенных и условно-патогенных бактерий, а также различных штаммов

микроорганизмов одного вида могут быть использованы при разработке антиадгезивных препаратов с видовой и штаммовой специфичностью. Бактериальные адгезины в основном демонстрируют значительную степень неизменности, что делает их хорошими кандидатами на роль вакцин [127, 181]. Интерес представляет проведение отдельных точечных мутаций в бактериальных адгезинах для изменения тканевого тропизма бактерий к клеткам хозяина. Кроме того, препараты для антиадгезивной терапии стабильны в физиологических условиях. Поскольку антиадгезивные соединения не обладают бактерицидной активностью, при их использовании не происходит разрушения бактериальных клеток, сопровождающегося высвобождением бактериальных эндотоксинов, оказывающих негативное воздействие на здоровье пациентов. При этом инфицирование интактными, но утратившими способность к адгезии патогенными микроорганизмами, стимулирует выработку иммунитета в организме хозяина, защищая его от повторного заражения и ускоряя иммунологический клиренс бактерий. Так, антиадгезивные антитела способны выступать в роли опсопинов, интенсифицируя фагоцитоз, а также вызывать обусловленный комплементом бактериолиз патогенов [84].

Однако существуют и некоторые проблемы, связанные с использованием антиадгезивных средств. Важной составляющей в процессе предотвращения адгезии является достижение высокой прочности связи между бактериальными клетками и антиадгезивными препаратами [60, 68, 70]. Помимо этого, антиадгезивный препарат должен обладать способностью блокировать не один, а несколько адгезинов бактерий.

В перспективе интересным направлением является сочетание в одном препарате веществ с антибактериальной и антиадгезивной активностью, что позволило бы более эффективно предотвращать образование биопленок бактерий.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Микробные штаммы

Исследовали 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» бактериологической лабораторией ФГУ «1002 ЦГСЭН СКВО» Минобороны России г. Ростова-на-Дону; *C. diphtheriae gravis* с «молчащим» *tox*-геном (отрицательный в тесте Элека и положительный при определении гена дифтерийного токсина в ПЦР), предоставленный МБУЗ «ГБ №1 им. Н.А. Семашко Ростова-на-Дону».

Исследовали и штаммы недифтерийных коринебактерий (*C. pseudodiphtheriticum* - 49 шт.), выделенные из верхних дыхательных путей (зев, нос) в количестве 10^5 - 10^6 КОЕ/мл от больных с хроническим тонзиллитом (9 шт.) и ангинами (14 шт.), а также практически здоровых лиц (26 шт.) в количестве 10^2 - 10^4 КОЕ/мл.

2.2. Моделирование процесса биоплёнкообразования

штаммами *C. diphtheriae*

Культивирование штаммов *C. diphtheriae* осуществляли в стеклянных флаконах объемом 100 мл, содержащих 50 мл питательного бульона для культивирования микроорганизмов (ГРМ-бульон) (ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск) с добавлением 20% сыворотки лошадиной нормальной (Микроген, г. Славгород). Тестирование штаммов на способность формировать биоплёнку проводили по методике P. L. Watnick, e. a. [177]. Предварительно по стандарту Мак Фарланда готовили микробную взвесь *C. diphtheriae* густотой 10^9 КОЕ/мл (1 млрд. м.т./мл). Полученную микробную взвесь в разведении 1:100 вносили в объёме 1 мл во флаконы с 50 мл 20% сывороточного бульона и инкубировали в термостате при $+37^\circ\text{C}$ в течение 120 и 720 ч. Жидкую фракцию суспензии из

флаконов удаляли через 120 и 720 ч культивирования, двукратно промывая флаконы дистиллированной водой. Для получения биоплёночных (120- и 720-часовых) культур при помощи урологического зонда вертикальными обратнопоступательными движениями снимали с поверхности стекла адгезированные биоплёночные культуры исследованных штаммов коринебактерий. Получившиеся взвеси помещали в пробирки «Эппендорф» и центрифугировали при 377 g 10 мин, убирали надосадочную жидкость, осадок доводили до объёма 1 мл физиологическим раствором и производили высеv на кровяно-теллуритовый агар.

2.3. Методы определения биологических свойств планктонных и биоплёночных (120- и 720-часовых) культур штаммов *C. diphtheriae*

2.3.1. Морфологические, культуральные и ферментативные свойства

Морфологические свойства планктонных и биоплёночных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* изучали в мазках, окрашенных по методу Грама и Нейссера [23, 24, 25]. Морфологическое исследование коринебактерий, адгезированных на культуре клеток карциномы фарингеального эпителия Нер-2, производили при окраске мазков по методу Романовского-Гимзы.

Культуральные свойства исследованных культур штаммов токсигенных штаммов *C. diphtheriae* изучали при посеве на кровяно-теллуритовый и 20 % сывороточный агар [24, 25, 26]. Ферментативную активность токсигенных штаммов *C. diphtheriae* изучали путем определения ферментов цистиназы (на среде Пизу), уреазы (гидролиз мочевины на скошенном агаре Кристенсена), а также способности расщеплять глюкозу, сахарозу, мальтозу, крахмал и вызывать редукцию нитратов [24, 25, 26].

2.3.2. Токсигенные свойства

Токсинообразование дифтерийных микробов определяли с помощью реакции иммунопреципитации в агаре по Элеку [24].

Для тестирования гена дифтерийного токсина методом ПЦР использовали набор реагентов для определения токсигенности штаммов *C. diphtheriae* (ДНК-Технология, Россия).

Концентрацию токсина (Lf/мл) в исследованных фильтратах планктонных и биопленочных культур штаммов *C. diphtheriae* определяли с помощью реакции флоккуляции в соответствии с рекомендациями, изложенными в общей фармакопейной статье [7].

2.3.3. Цитопатическое действие

Исследовали фильтраты планктонных и биопленочных (120- и 720-часовых) культур штаммов коринебактерий (использовали мембранные фильтры фирмы «Millipore» (США) с размером пор 0,45 мкм), которые титровали в 96-луночном планшете в среде RPMI-1640 без добавления сыворотки и вносили в лунки с клетками СНО-К1 по 0,05 мл, предварительно удалив питательную среду. Каждый образец фильтрата культур коринебактерий исследовали в 7-8 повторах. Планшет инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 72 ч при температуре +37°C, влажности 90% и концентрации CO₂ - 5%. Учет производили через 24, 48 и 72 ч.

Цитопатическое действие (ЦПД) штаммов коринебактерий на культуру клеток СНО-К1 [10, 39] учитывали в инвертированном микроскопе. Определяли количество жизнеспособных и измененных клеток в инвертированном микроскопе по морфологическим и деструктивным изменениям в виде истончения, удлинения, округления и образования симпластов. Регистрацию результатов проводили с использованием цифрового фотоаппарата и инвертированного микроскопа. Для этого лунки с интактной культурой клеток СНО-К1 (контроль) и лунки с клетками, подвергшимися воздействию фильтратов исследованных культур коринебактерий (опыт) фиксировали на предметном столике. Затем клетки фотографировали через прозрачное дно панели с общим увеличением на фотоснимке в 100 раз без дополнительного окрашивания.

2.3.4. Гемолитическая активность

Гемолитическую активность планктонных и биопленочных (120- и 720-часовых) культур штаммов коринебактерий исследовали по методу Грейга [18]. К

1 мл 24 ч бульонной культуры коринебактерий добавляли 1 мл 1% -ной взвеси трижды отмытых эритроцитов барана в физиологическом растворе (опыт). В качестве контроля использовали смесь 1 мл бульона и 1 мл 1%-ной взвеси эритроцитов. Смесь осторожно встряхивали и помещали в термостат на 2 ч при температуре +37°C, затем в холодильник на 16-18 ч. Предварительный учет проводили через 2 ч, окончательный на следующий день визуально и с помощью мультискана «Labsystems Multiskan MS» (Финляндия).

2.3.5. Гемагглютинирующая активность

Гемагглютинирующую активность планктонных и биопленочных (120- и 720-часовых) культур исследовали с помощью метода полуколичественного титрования культур коринебактерий с использованием свежих эритроцитов I (0) группы крови человека. Результаты учитывали по 4-х (+) системе [24, 26].

2.3.6. Адгезивные свойства

2.3.6.1. Культуральный метод

Способность к адгезии планктонных и биопленочных (120- и 720-часовых) культур штаммов коринебактерий исследовали в соответствии с указаниями L. Ott [129, 130] на культуре клеток карциномы фарингеального эпителия Нер-2 при различных временных экспозициях (2, 8, 18 ч). Непосредственно перед опытом коринебактерии культивировали на кровяном агаре (рН 7,6 – 7,8) в течение 18 ч. Из выросших колоний готовили взвесь коринебактерий густотой 10^9 КОЕ/мл (по стандарту Мак Фарланда) и вносили ее в объеме 0,5 мл в 4,5 мл сывороточного бульона (рН 7,6 – 7,8), выдерживали в термостате (+37°C) в течение 24 ч. Затем выросшую бульонную культуру микроорганизмов центрифугировали при 1509 g, удаляли надосадок и ресуспендировали осадок в среде RPMI-1640 до густоты 10^6 КОЕ/мл по стандарту Мак Фарланда. Далее по 1 мл полученной взвеси коринебактерий густотой 10^6 КОЕ/мл вносили в лунки с разреженным монослоем Нер-2 и инкубировали в течение 2, 8 и 18 ч в CO₂-инкубаторе при температуре +37°C и 5% CO₂. В качестве контроля использовали интактную культуру клеток Нер-2. Лунки планшета трижды промывали раствором Хенкса, удаляя несвязавшиеся клетки коринебактерий. В лунки вносили 1 мл раствора трипсина

(ООО «БиолоТ», Россия) на 5-7 минут для отслоения монослоя клеток Нер-2. После этого трипсин удаляли из лунок. Культуру клеток Нер-2 с адгезированными на них коринебактериями смывали раствором Хенкса. Количество коринебактерий, адгезированных на клетках Нер-2, определяли путем посева смыва на мясо-пептонный агар с добавлением 20% сыворотки лошадиной нормальной для культивирования микроорганизмов с последующим подсчетом среднего количества колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1мл. Адгезивные свойства планктонных и биопленочных (120- и 720-часовых) культур штаммов *C. diphtheriae* выражали в $(КОЕ \pm m) \times 10^2$.

2.3.6.2. Флуоресцентная микроскопия

Для проведения флуоресцентного исследования планктонных и биопленочных (120- и 720-часовых) культур штаммов *C. diphtheriae*, адгезированных на культуре клеток Нер-2, готовили препараты на специальных дисках для культуральных исследований (диски 12,0x0,11, производитель SPL Lifesciences (Корея)). Перед определением адгезии на культуре клеток Нер-2 (п. 2.3.7.) в лунки планшета вносили стерильные диски, а затем по окончании опыта диски промывали трехкратно раствором Хенкса, высушивали на воздухе и фиксировали 96°-ным спиртом. Окрашивание дисков проводили с использованием корифосфина (1:10000), после чего их помещали во влажную камеру (чашка Петри с увлажненной ватой) при температуре 37°С, не допуская высыхания нанесенного раствора в течение 30 минут. Затем диски дважды промывали дистиллированной водой. Препараты высушивали на воздухе и просматривали под люминесцентным микроскопом Nikon Eclipse Ni-U (Япония) с применением иммерсионного нефлуоресцирующего масла.

2.3.6.3. Электронная микроскопия

Электронно-микроскопическое исследование адгезии планктонных и биопленочных (120- и 720-часовых) культур коринебактерий на культуре клеток Нер-2 проводили методом трансмиссионной электронной микроскопии в электронном микроскопе JEM-1011 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Фиксацию образцов осуществляли 3,6 % раствором глутарового альдегида

в фосфатном буфере (рН 7,2–7,4), постфиксацию – 2% водным раствором тетраоксида осмия (VIII). Контрастирование осуществляли по методу J.Luft и тетраоксидом осмия (VIII) [115]. Изображения получали при помощи ССD-камеры Olympus-SIS Veleta с применением программного обеспечения Olympus iTEM TEM Imaging Platform.

2.3.7. Инвазивные свойства

2.3.7.1. Культуральный метод

Способность к инвазии планктонных и биопленочных (120- и 720-часовых) культур штаммов коринебактерий исследовали в соответствии с указаниями L. Ott [129, 130] на культуре клеток карциномы фарингеального эпителия Нер-2 при различных временных экспозициях (2, 8, 18 ч). Непосредственно перед опытом коринебактерии культивировали на кровяном агаре (рН 7,6 – 7,8) в течение 18 ч. Из выросших колоний готовили взвесь коринебактерий густотой 10^9 КОЕ/мл (по стандарту Мак Фарланда) и вносили ее в объеме 0,5 мл в 4,5 мл сывороточного бульона (рН 7,6 – 7,8), выдерживали в термостате (+37°C) в течение 24 ч. Затем выросшую бульонную культуру микроорганизмов центрифугировали при 1509 g, удаляли надосады и ресуспендировали осадок в среде RPMI-1640 до густоты 10^6 КОЕ/мл по стандарту Мак Фарланда. Далее по 1 мл полученной взвеси коринебактерий густотой 10^6 КОЕ/мл вносили в лунки с разреженным монослоем Нер-2 и инкубировали в течение 2, 8 и 18 ч в CO₂-инкубаторе при температуре +37°C и 5% CO₂. В качестве контроля использовали интактную культуру клеток Нер-2. Лунки планшета трижды промывали раствором Хенкса, удаляя не связавшиеся клетки коринебактерий. Для определения числа инвазировавшихся коринебактерий в лунки планшета добавляли гентамицин (ОАО «Дальхимфарм», Россия) в концентрации $1,2 \pm 0,4$ мг/мл с целью уничтожения коринебактерий, адгезированных на поверхности клеток Нер-2. Затем клетки Нер-2 разрушали в течение 5 минут с помощью 0,025% раствора Твин-20, после чего содержимое лунок высевали на мясо-пептонный агар с добавлением 20% сыворотки лошадиной нормальной для культивирования микроорганизмов и подсчитывали количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл. Инвазивные свойства

штаммов коринебактерий выражали в $(\text{КОЕ} \pm m) \times 10^2$.

2.3.7.2. Электронная микроскопия

Электронно-микроскопическое исследование штаммов коринебактерий, инвазированных в клетки Нер-2, проводили аналогично п. 2.3.6.3.

2.4. Сыворотки, использованные в работе, и методы их исследования

Использовали образцы сыворотки крови взрослых, больных дифтерией ротоглотки локализованной (30 чел.) и токсической (30 чел.), отобранные на 1-7 сутки заболевания до проведения специфического лечения; 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 [29]. Образцы сыворотки крови больных дифтерией взяты в период эпидемии дифтерии в г. Ростове-на-Дону (1997-1999 г.г.) и хранились при -20°C .

2.4.1. ИФА для определения противодифтерийных антибактериальных антител

Для определения содержания противодифтерийных антибактериальных антител в лунки полистироловых планшет «Dynatech» сорбировали дифтерийный диализатный антиген - липополисахаридо-полипептидный комплекс, включающий в себя элементы поверхностных структур и пептидогликана клеточных стенок *C. diphtheriae* и не содержащий дифтерийный токсин [20], полученный из циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox+* в концентрации 10-15 мг/л в объеме 100 мкл в лунку. Сорбированные планшеты выдерживали в течение 18-20 ч при $+4^{\circ}\text{C}$. Далее постановку ИФА осуществляли по методике [20].

2.4.2. ИФА для определения противодифтерийных антитоксических антител

Для определения содержания противодифтерийных антитоксических антител в лунки полистироловых планшет «Dynatech» сорбировали дифтерийный анатоксин в концентрации 10-15 мг/л в объеме 100 мкл в лунку. Дальнейшую постановку ИФА осуществляли по методике [19].

2.4.3. Иммунохимический анализ для определения С3- и С4-компонентов комплемента

Определение количества С3- и С4-компонентов системы комплемента в сыворотке крови проводили с помощью иммунохимического анализатора специфических белков с двойной системой детекции Image 800 и диагностических панелей тестов «С3-компонент комплемента» и «С4-компонент комплемента» для данного анализатора (Beckman Coulter, США).

2.4.4. ИФА для определения уровня лактоферрина и антител к лактоферрину

Для определения уровня лактоферрина в сыворотке крови использовали тест-систему «Реагенты для определения лактоферрина *in vitro* иммуноферментным методом (Lactoferrin)» (Nycult Biotechnology (НТВ) BV, Нидерланды).

Для определения количества антител к лактоферрину в сыворотке крови использовали тест-систему «Набор реагентов для определения антител к лактоферрину *in vitro* методом ИФА (Anti-Lactoferrin)» (Organtec Diagnostika GmbH, Германия).

2.4.5. Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Разделение белков исследованных образцов сыворотки крови в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях проводили по методу Laemmli U.K. [107]. Образцы прогревали при 100°C в течение 10 мин в лизис-буфере, содержащем 0,125 М трис-НСl (Serva, Германия), рН-6,8, 5% раствора додецилсульфата натрия (ДСН) (Serva, Германия), 0,1% раствора 2-меркаптоэтанола (Fluka, Германия), 12,5% глицерина ("АО Реахим", Россия), 0,05% бромфенолового синего ("АО Реахим", Россия). Затем их наносили на ПААГ, состоящий из концентрирующего и разделяющего гелей. Концентрирующий гель имел в своем составе 4% акриламида (Serva, Германия), 0,1% бис-акриламида (Serva, Германия), 0,125 М трис-НСl (Serva, Германия), рН-6,8, 0,1% раствора ДСН (Serva, Германия), а разделяющий гель – 12,5-15% акриламида, 0,4% бис-акриламида, 0,375 М трис-НСl, рН -8,8, 0,1% раствора

ДСН. Электрофорез проводили с использованием трис-глицинового электродного буфера (0,025 М трис-ОН (Serva, Германия), 0,192 М глицина (Reanal, Венгрия), 0,1 % ДСН, pH-8,3) в течение 2,0 - 2,5 ч при 25-30 мА. В соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя (Bio-Rad, США) после фиксации в течение 1 ч в растворе, содержащем 25% этилового спирта и 10% уксусной кислоты, белки окрашивали раствором Кумасси R-250 (Serva, Германия) (0,2 % красителя в растворе, содержащем 10% уксусной кислоты и 10% этанола). Для определения молекулярной массы использовали набор маркеров фирмы «Fermentas» (Латвия) и другие стандартные белки.

2.4.6. Масс-спектрометрический анализ (MALDI-TOF MS)

Пробоподготовку исследованных образцов сыворотки крови проводили следующим образом. К 100 мкл исследуемого образца сыворотки крови добавляли 100 мкл насыщенного раствора сульфата аммония (1:1). Затем полученный раствор инкубировали со слабым перемешиванием при температуре 22-24°C. Полученный преципитат осаждали центрифугированием (10 минут, 2683 g), после чего удаляли супернатант. Добавляли к осадку деионизированную дистиллированную воду до первоначального объёма сыворотки (100 мкл). Полученный раствор наносили на лунки мишени для масс-спектрометрии в объеме 0,1 мкл, после высыхания покрывали их матричной α -циано-4-гидроксициннамовой кислотой (СННА-матрицей). Для снятия спектров использовали масс-спектрометр Autoflex («BrukerDaltonics» Германия), применяя метод времяпролетной масс-спектрометрии.

Идентификацию белков проводили по наборам значений масс пептидов с использованием программы Mascot Search Results (www.matrixscience.com, «Matrix Science», США), базы данных SwissProt 2014_04. Были заданы следующие параметры поиска: точность определения массы 100 миллионных долей, таксон *Homo sapiens*. Погрешность определения масс ионов пептидных фрагментов составляла примерно 0,03 %.

2.5. Методы исследования воздействия факторов естественного и искусственного происхождения на адгезивные и инвазивные свойства

C. diphtheriae

2.5.1. Образцы сыворотки крови различных контингентов обследованных

Воздействие образцов сыворотки крови различных контингентов обследованных (п. 2.4.) на адгезивные и инвазивные свойства *C. diphtheriae* изучали в опытах по прерыванию адгезии и инвазии. Для этого образцы сыворотки крови фильтровали при помощи мембранных фильтров с размером пор 0,45 мкм (фирма «Millipore», Германия) и проверяли на стерильность высевом на чашку с 20% сывороточным агаром. Перед проведением опыта в пробирки вносили по 1,0 мл взвеси коринебактерий густотой 10^6 КОЕ/мл и образца стерильной сыворотки (цельной). Полученную смесь выдерживали в термостате в течение 60 минут при $+37^{\circ}\text{C}$. Далее пробирки центрифугировали при 2683 g в течение 5 минут, удаляли надосадочную жидкость и ресуспендировали осадок в среде RPMI-1640 до густоты 10^6 КОЕ/мл. Затем полученной смесью в объеме 1 мл заражали культуру клеток Нер-2 и инкубировали в течение 2 ч в CO_2 -инкубаторе при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ и 5% CO_2 . В качестве контроля использовали интактную культуру клеток Нер-2, а также зараженную взвесью *C. diphtheriae*. Далее адгезивные свойства определяли в соответствии с п. 2.3.6.1., инвазивные – п. 2.3.7.1.

2.5.2. Комплемент

Использовали препарат сухого компонента (производство ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России, Россия, г. Пермь). Воздействие препарата компонента (цельного) на коринебактерии изучали в опытах по прерыванию адгезии и инвазии на культуре клеток карциномы фарингеального эпителия Нер-2 при экспозиции 2 ч. Непосредственно перед опытом коринебактерии культивировали на кровяном агаре (рН 7,6 – 7,8) в течение 18 ч. Из выросших колоний готовили взвесь коринебактерий густотой 10^9 КОЕ/мл (по стандарту Мак Фарланда) и вносили ее в объеме 0,5 мл в 4,5 мл сывороточного бульона (рН 7,6 – 7,8), выдерживали в термостате ($+37^{\circ}\text{C}$) в течение 24 ч. Затем выросшую

бульонную культуру микроорганизмов центрифугировали при 1509 g, удаляли надосады и ресуспендировали осадок в среде RPMI-1640 до густоты 10^6 КОЕ/мл по стандарту Мак Фарланда. Перед проведением исследования в пробирки вносили по 1,0 мл взвеси коринебактерий густотой 10^6 КОЕ/мл и препарата комплемента (цельной). Полученную смесь выдерживали в термостате в течение 60 минут при $+37^\circ\text{C}$. Далее пробирки центрифугировали при 2683 g в течение 5 минут, удаляли надосадоочную жидкость и ресуспендировали осадок в среде RPMI-1640 до густоты 10^6 КОЕ/мл. Затем полученной смесью в объеме 1 мл заражали культуру клеток Нер-2 и инкубировали в течение 2 ч в CO_2 -инкубаторе при температуре $+37^\circ\text{C}$ и 5% CO_2 . В качестве контроля использовали интактную культуру клеток Нер-2, а также зараженную взвесью *C. diphtheriae*. Далее адгезивные свойства определяли в соответствии с п. 2.3.6.1., инвазивные – п. 2.3.7.1.

2.5.3. Лактоферрин

Использовали коммерческий препарат «Лактоферрин» сухой, фирмы Sigma-Aldrich (США). Воздействие лактоферрина на коринебактерии изучали в опытах по прерыванию адгезии и инвазии на культуре клеток карциномы фарингеального эпителия Нер-2 при экспозиции 2 ч. Перед опытом коринебактерии культивировали на кровяном агаре (рН 7,6 – 7,8) в течение 18 ч. Из выросших колоний готовили взвесь коринебактерий густотой 10^9 КОЕ/мл (по стандарту Мак Фарланда) и вносили ее в объеме 0,5 мл в 4,5 мл сывороточного бульона (рН 7,6 – 7,8), выдерживали в термостате ($+37^\circ\text{C}$) в течение 24 ч. Затем выросшую бульонную культуру микроорганизмов центрифугировали при 1509 g, удаляли надосады и ресуспендировали осадок в среде RPMI-1640 до густоты 10^6 КОЕ/мл по стандарту Мак Фарланда. Непосредственно перед опытом в лунки планшета вносили по 100 мкл дифтерийных микробов густотой 10^6 КОЕ/мл и 100 мкл раствора лактоферрина в концентрации 270 мг/л. Полученную смесь выдерживали в термостате в течение 60 минут при $+37^\circ\text{C}$. Затем смесь переносили в лунки с разреженным монослоем клеток Нер-2 и инкубировали в течение 2 ч в CO_2 -инкубаторе при температуре $+37^\circ\text{C}$ и 5% CO_2 . В качестве контроля использовали интактную культуру клеток Нер-2, а также зараженную взвесью *C. diphtheriae*. Далее адгезивные свойства определяли в

соответствии с п. 2.3.6.1., инвазивные – п. 2.3.7.1.

2.5.4. Антитоксин диагностический дифтерийный

Использовали препарат антитоксина диагностического дифтерийного, очищенного ферментализом и специфической сорбцией сухой (ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России, Россия, г. Пермь). Воздействие антитоксина на коринебактерии изучали в опытах по прерыванию адгезии и инвазии на культуре клеток карциномы фарингеального эпителия Нер-2 при экспозиции 2 ч. Непосредственно перед опытом коринебактерии культивировали на кровяном агаре (рН 7,6 – 7,8) в течение 18 ч. Из выросших колоний готовили взвесь коринебактерий густотой 10^9 КОЕ/мл (по стандарту Мак Фарланда) и вносили ее в объеме 0,5 мл в 4,5 мл сывороточного бульона (рН 7,6 – 7,8), выдерживали в термостате (+37°C) в течение 24 ч. Затем выросшую бульонную культуру микроорганизмов центрифугировали при 1509 g, удаляли надосадок и ресуспендировали осадок в среде RPMI-1640 до густоты 10^6 КОЕ/мл по стандарту Мак Фарланда. Перед проведением опыта в пробирки вносили по 1,0 мл взвеси коринебактерий густотой 10^6 КОЕ/мл и антитоксина в концентрации 5 МЕ/мл. Полученную смесь выдерживали в термостате в течение 60 минут при +37°C. Далее пробирки центрифугировали при 2683 g в течение 5 минут, удаляли надосадочную жидкость и ресуспендировали осадок в среде RPMI-1640 до густоты 10^6 КОЕ/мл. Затем полученной смесью в объеме 1 мл заражали культуру клеток Нер-2 и инкубировали в течение 2 ч в CO₂-инкубаторе при температуре +37°C и 5% CO₂. В качестве контроля использовали интактную культуру клеток Нер-2, а также зараженную взвесью *C. diphtheriae*. Далее адгезивные свойства определяли в соответствии с п. 2.3.6.1., инвазивные – п. 2.3.7.1.

2.5.5. Азоксимера бромид

Использовали препарат азоксимера бромид (АЗБ) производства НПО Петровакс Фарм, г. Москва, который применяется у взрослых и детей от 3-х лет для лечения и профилактики острых и хронических респираторных заболеваний в стадии обострения и ремиссии. Воздействие АЗБ на планктонные и биопленочные (120- и 720-часовые) культуры *C. diphtheriae* изучали в опытах по прерыванию

адгезии и инвазии на культуре клеток карциномы фарингеального эпителия Нер-2 при различных временных экспозициях (2, 8, 18 ч). Непосредственно перед опытом коринебактерии культивировали на кровяном агаре (рН 7,6 – 7,8) в течение 18 ч. Из выросших колоний готовили взвесь коринебактерий густотой 10^9 КОЕ/мл (по стандарту Мак Фарланда) и вносили ее в объеме 0,5 мл в 4,5 мл сывороточного бульона (рН 7,6 – 7,8), выдерживали в термостате (+37°C) в течение 24 ч. Затем выросшую бульонную культуру микроорганизмов центрифугировали при 1509 g, удаляли надосадок и ресуспендировали осадок в среде RPMI-1640 до густоты 10^6 КОЕ/мл по стандарту Мак Фарланда. Перед проведением опыта в пробирки вносили по 1,0 мл взвеси коринебактерий густотой 10^6 КОЕ/мл и АЗБ в концентрации 300 мг/л, 600 мг/л и 1200 мг/л. Полученную смесь выдерживали в термостате в течение 60 минут при +37°C. Далее пробирки центрифугировали при 2683 g в течение 5 минут, удаляли надосадочную жидкость и ресуспендировали осадок в среде RPMI-1640 до густоты 10^6 КОЕ/мл. Затем полученной смесью в объеме 1 мл заражали культуру клеток Нер-2 и инкубировали в течение 2, 8 и 18 ч в CO₂-инкубаторе при температуре +37°C и 5% CO₂. В качестве контроля использовали интактную культуру клеток Нер-2, а также зараженную взвесью *C. diphtheriae*. Далее адгезивные свойства определяли в соответствии с п. 2.3.6.1., инвазивные – п. 2.3.7.1.

2.6. Статистические методы

Статистический анализ результатов исследования проводили с применением программы Statistica 12.0 (StatSoft, США). При этом использовали модуль описательной статистики с расчетом средней величины, ее ошибки, медианы и межквартильного диапазона. Оценку распределения величин и отличие от нормального распределения анализировали по критерию Шапиро-Уилка [1, 4, 21]. Различие средних величин между группами оценивали с помощью дисперсионного анализа. При этом уровень значимости p при множественном сравнении рассчитывали по критерию Крускала-Уолиса [6, 8, 25]. При попарном сравнении средних величин между группами использовался критерий Манна-Уитни с учетом поправки Бонферрони на множественные сравнения [27, 30].

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА 3. Патогенные свойства планктонных и биоплёночных (120- и 720-часовых) культур штаммов *C. diphtheriae*

Патогенные свойства возбудителя дифтерии обусловлены, в основном, дифтерийным экзотоксином, однако на ранних стадиях инфекционного процесса ведущую роль играют адгезия и колонизация *C. diphtheriae* на эпителии входных ворот инфекции. Учитывая, что в течение инфекционного процесса при дифтерии возбудитель формирует биопленку на поверхности респираторного тракта, представляло интерес провести сравнительное исследование патогенных свойств (адгезивность, инвазивность и токсичность) планктонных и биопленочных культур штаммов *C. diphtheriae*.

При исследовании основных биологических свойств планктонных и биопленочных (120- и 720-часовых) культур штаммов *C. diphtheriae* установлено, что при световой микроскопии они представляли собой грамположительные полиморфные палочки, располагавшиеся в мазках в виде латинских букв (L, X, V, Y) или «растопыренных пальцев», имели зерна волютина, выявляемые при окраске по методу Нейссера. Штаммы недифтерийных коринебактерий - прямые или слегка изогнутые грамположительные полиморфные палочки, располагавшиеся в мазках одиночно, реже - парами или в виде «частокола», имеющие зерна волютина.

Колонии планктонных культур штаммов *C. diphtheriae* при пересеве на сывороточный агар и кровяно-теллуритовый агар имели выпуклую, шероховатую, матовую поверхность, бахромчатый край, сухую консистенцию. Колонии биопленочных культур - выпуклую, глянцевую, блестящую поверхность, волнистый край, маслянистую консистенцию. Размер колоний планктонных культур штаммов *C. diphtheriae* был несколько больше (2-4 мм), чем биоплёночных (1-2 мм). Колонии штаммов недифтерийных коринебактерий имели округлую форму, размеры 0,5 - 3,0 мм, выпуклую, глянцевую, блестящую, гладкую или шероховатую поверхность, ровные края, сухую консистенцию.

При определении ферментативной активности планктонных и биоплёночных (120- и 720-часовых) культур штаммов *C. diphtheriae* установили их способность разлагать глюкозу, мальтозу, крахмал, редуцировать нитраты в нитриты и проявлять положительную цистиазную активность, не разлагая сахарозу и мочевины. Штаммы недифтерийных коринебактерий (*C. pseudodiphtheriticum*) каталазоположительны; не разлагали глюкозу, сахарозу, мальтозу, крахмал; не обладали цистиазной, но имели нитратредуктазную активность и разлагали мочевины.

3.1. Адгезивность и инвазивность

В проведенных ранее исследованиях [34, 35] установлено, что пик образования межмикробного матрикса музейным штаммом *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665 приходился на ранние сроки (120-й ч культивирования), а циркулирующим штаммом - более поздние (720-й ч культивирования). В соответствии с этим и было проведено исследование адгезивных свойств 120- и 720-часовых биопленочных культур различных токсигенных штаммов *C. diphtheriae*.

Все планктонные и биопленочные культуры исследованных токсигенных штаммов коринебактерий обладали адгезивной активностью разной степени выраженности (табл. 3.1.1.), причем наиболее высокие показатели адгезии ($(\text{КОЕ} \pm m) \times 10^2$) как среди планктонных, так и биопленочных культур обнаружены у штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* (циркулирующий). При 2-х ч экспозиции культивирования планктонной культуры циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* этот показатель составил $0,26 \pm 0,01$, что отличалось ($p \leq 0,05$) от результатов определения адгезии других исследованных штаммов (от $0,03 \pm 0,003$ до $0,20 \pm 0,01$). При 8- и 18-ч экспозициях культивирования получены аналогичные результаты при исследовании как планктонных, так и биопленочных (120- и 720-часовых) культур коринебактерий. При 2-х ч экспозиции культивирования наименьшей адгезивной активностью обладали и планктонные, и биопленочные культуры штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 6765, при 8- и 18- ч – штаммов *C. diphtheriae gravis* («молчащим» *tox*-геном) и *C. diphtheriae mitis tox⁺* № 269.

Таблица 3.1.1. - 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</i> <i>gravis 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</i> <i>gravis 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</i> <i>gravis 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</i> <i>gravis</i> (с «молчащим» tox- 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)

При исследовании адгезивных свойств планктонных и биопленочных (120- и 720-часовых) культур внутри каждой временной экспозиции (2, 8, 18 ч) при культивировании в течение 2 ч достоверных отличий обнаружено не было. Адгезивные свойства биопленочных культур исследованных штаммов коринебактерий при 8-ми ч экспозиции культивирования не изменялись по сравнению с планктонными. Исключение составили 720-часовые биопленочные культуры штаммов *C. diphtheriae gravis tox+* № 665 и *C. diphtheriae mitis tox+* № 269, у которых адгезивность снижалась ($p \leq 0,05$). К 18-му ч культивирования адгезивная активность увеличивалась ($p \leq 0,05$) у 120- и 720-часовых биопленочных культур штамма *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий), 120-часовой биопленочной культуры штамма *C. diphtheriae gravis tox+* № 665 и 720-часовой биопленочной культуры штамма *C. diphtheriae mitis tox+* № 269. Снижение адгезивных свойств отмечено у 720-часовой биопленочной культуры *C. diphtheriae gravis* (с «молчащим» *tox*-геном).

Изучая способность к адгезии в динамике, установили, что как у планктонных, так и у биопленочных культур всех исследованных штаммов коринебактерий она достоверно ($p \leq 0,05$) увеличивалась к 8- и 18-му ч культивирования.

При определении инвазивных свойств *C. diphtheriae* (табл. 3.1.2.) установлено, что планктонные культуры всех исследованных штаммов коринебактерий, за исключением штамма *C. diphtheriae gravis tox+* № 6765, обладали незначительной инвазивной активностью при 2-х ч экспозиции культивирования. При увеличении сроков культивирования (к 18 ч) инвазивность увеличивалась ($p \leq 0,05$) у всех планктонных культур штаммов *C. diphtheriae*, за исключением *C. diphtheriae gravis tox+* (с «молчащим» *tox* - геном). При этом наиболее высокие показатели инвазии наблюдали у циркулирующего в популяции штамма *C. diphtheriae gravis tox+* ($216,7 \pm 6,7$), наименьшие – у *C. diphtheriae gravis tox+* (с «молчащим» *tox* - геном) ($0,75 \pm 0,01$).

Таблица 3.1.2. - 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)

Подобные закономерности прослеживались и при исследовании 120-часовых биопленочных культур исследованных штаммов коринебактерий. Совершенно иные результаты обнаружены при изучении инвазивности 720-часовых биопленочных культур коринебактерий. Так, если при 2-х ч экспозиции показатели инвазии биопленочных культур не отличались от таковых у планктонных культур, то при увеличении сроков культивирования до 8 и особенно 18 ч, они регистрировались на значительно более низком уровне ($p \leq 0,05$). У 720-часовых биопленочных культур всех штаммов *C. diphtheriae gravis tox+* инвазивность к 18-му ч культивирования была ниже, чем у планктонных, в 61,2 – 91,5 раз, *C. diphtheriae mitis tox+* № 269 – в 4,4 раза, а у штамма *C. diphtheriae gravis tox+* (с «молчащим» *tox*-геном) вообще не обнаруживалась.

При рассмотрении способности к инвазии в динамике установили, что как у планктонных, так и у 120-часовых биопленочных культур всех исследованных токсигенных штаммов коринебактерий она достоверно ($p \leq 0,05$) увеличивалась к 8- и 18-му ч культивирования. Однако у 720-часовых биопленочных культур всех исследованных штаммов коринебактерий она была иной: незначительно увеличивалась к 8-му ч культивирования и снижалась к 18-му.

При сравнительном исследовании адгезивных и инвазивных свойств штаммов коринебактерий установлено, что способность к адгезии всех исследованных планктонных культур токсигенных штаммов коринебактерий в динамике увеличивалась к 8- и 18-му ч культивирования на культуре клеток Нер-2. Наиболее интенсивно этот процесс происходил у циркулирующего штамма возбудителя дифтерии и штамма *C. diphtheriae gravis tox+* № 665 (от $0,13 \pm 0,01$ до $193,3 \pm 3,3$ КОЕ/мл), наименее – у штаммов *C. diphtheriae gravis* (с «молчащим» *tox*-геном) и *C. diphtheriae mitis tox+* № 269 (от $0,17 \pm 0,01$ до $27,7 \pm 0,3$ КОЕ/мл). Динамика инвазивных свойств исследованных штаммов коринебактерий коррелировала с их адгезией. Так, количество проникших внутрь клеток Нер-2 коринебактерий резко (в 40-200 раз) увеличивалось при исследовании штаммов *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий), *C. diphtheriae gravis tox+* № 665,

C. diphtheriae gravis tox+ № 6765, *C. diphtheriae mitis tox+* № 269 и не претерпевало изменений у штамма *C. diphtheriae gravis* (с «молчащим» *tox*-геном). При этом количество коринебактерий, инвазировавших к 18 ч культивирования в клетки Нер-2, превышало ($p \leq 0,05$) число адгезированных на их поверхности 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, процессы адгезии превалировали ($p \leq 0,05$) над инвазией.

Изучая 120-часовые биопленочные культуры токсигенных штаммов коринебактерий, обнаружили аналогичные результаты, характеризующие динамику их адгезивных и инвазивных свойств. Однако, в отличие от планктонных культур коринебактерий, процесс инвазии превалировал над адгезией только у биопленочной культуры штамма *C. diphtheriae gravis tox+* № 665.

При рассмотрении адгезивных свойств 720-часовых культур исследованных штаммов коринебактерий никаких отличий по сравнению с таковыми планктонных и 120-часовых биопленочных культур обнаружено не было, но их инвазивность была иной. Так, инвазивные свойства 720-часовых биопленочных культур всех исследованных штаммов коринебактерий были существенно (в 50-120 раз) ниже ($p \leq 0,05$) адгезивных. При этом динамика их инвазивности характеризовалась низкими значениями при 2-х ч экспозиции культивирования (от $0,01 \pm 0,01$ до $0,25 \pm 0,002$ КОЕ/мл), незначительным увеличением к 8-му ч культивирования (от $0,35 \pm 0,01$ до $5,62 \pm 0,47$ КОЕ/мл) и снижением к 18-му ч (от 0 до $3,54 \pm 0,07$ КОЕ/мл).

При рассмотрении процесса адгезии планктонных и биопленочных (120- и 720-часовых) культур штамма *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий) в световом микроскопе при окраске по Романовскому-Гимзе (рис. 3.1.1.) видны коринебактерии, прикрепившиеся к клеткам карциномы фарингеального эпителия Нер-2. При увеличении экспозиции культивирования (к 8- и 18-ч) наблюдали значительное

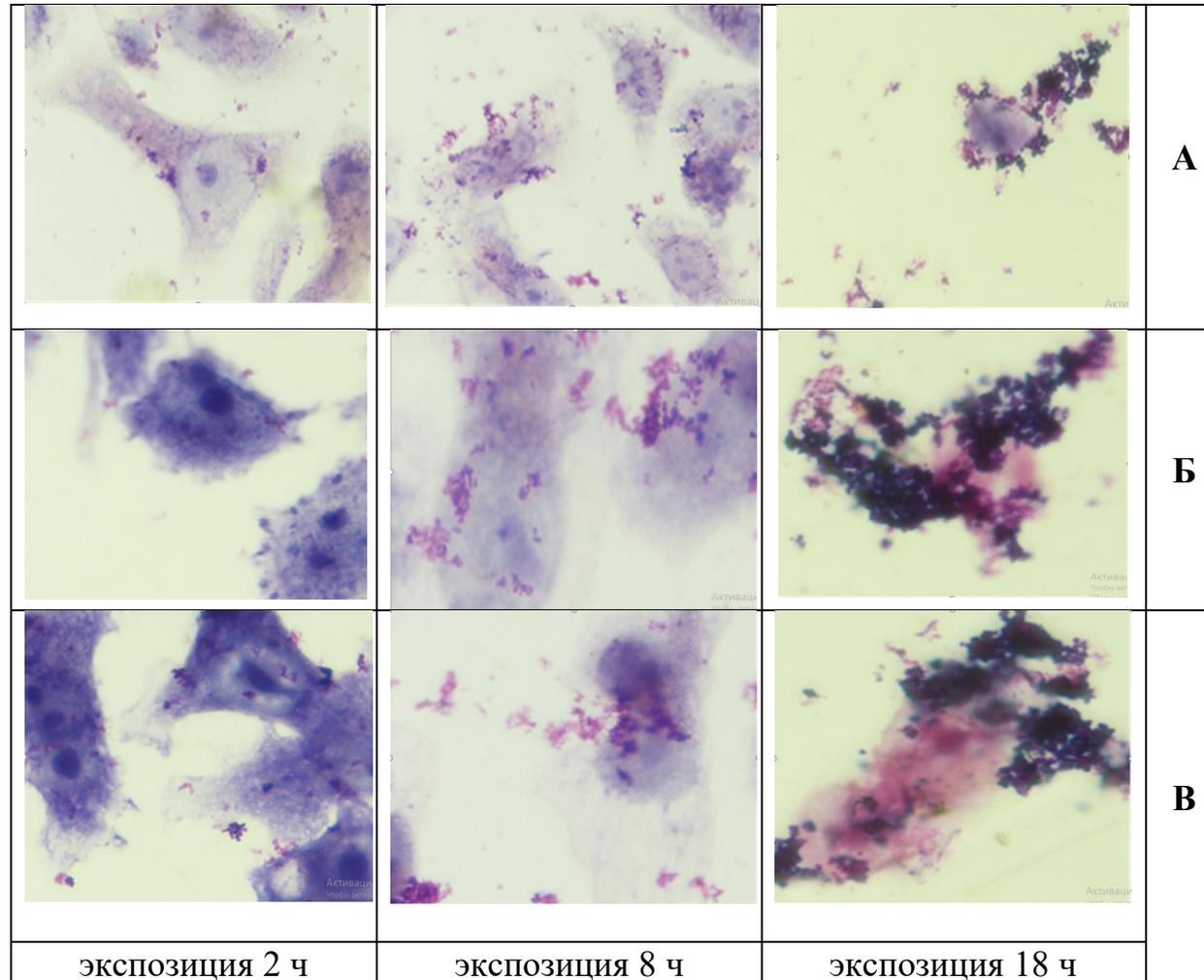


Рис. 3.1.1. Световое микроскопическое исследование адгезии планктонной (А), 120-часовой биопленочной (Б) и 720-часовой биопленочной (В) культур штамма *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий) на культуре клеток карциномы фарингеального эпителия Нер-2 (Окраска по Романовскому-Гимзе, увеличение x1000)

увеличение количества коринебактерий, прикрепившихся к клеткам Нер-2 планктонных и особенно биопленочных культур коринебактерий этого штамма.

При флуоресцентном микроскопическом исследовании (рис. 3.1.2.) адгезии планктонных и биопленочных (120- и 720-часовых) культур штамма *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий) видны коринебактерии, адгезированные на микроворсинках и поверхности клеток фарингеального эпителия Нер-2. При увеличении экспозиции культивирования также зарегистрировано значительное увеличение адгезивности планктонных и особенно биопленочных культур коринебактерий.

При электронно-микроскопическом исследовании планктонных и биопленочных культур штамма *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий) (рис. 3.1.3.) видны коринебактерии как адгезированные на поверхности клеток Нер-2, накопившие контрастное вещество, так и инвазированные электронно-прозрачные.

При исследовании адгезивности планктонных и биопленочных культур штаммов *C. diphtheriae* на эритроцитах человека I (0) группы крови установлено, что положительную гемагглютинирующую активность, причем низких значений (1/2-1/8), проявляли планктонные и биопленочные культуры только двух штаммов: *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий) и *C. diphtheriae gravis tox+* № 6765.

При изучении адгезивных свойств штаммов недифтерийных коринебактерий (табл. 3.1.3.) установлено, что у выделенных от практически здоровых обследованных штаммов *C. pseudodiphtheriticum* адгезивность была ниже ($p \leq 0,05$) таковой, чем у штаммов недифтерийных коринебактерий, выделенных от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта. При этом наиболее высокой адгезивностью ($238,3 \pm 6,5$ КОЕ/мл) обладали штаммы *C. pseudodiphtheriticum*, выделенные от больных ангинами, по сравнению со штаммами *C. pseudodiphtheriticum*, выделенными от больных хроническим тонзиллитом. При определении инвазивных свойств обнаружено, что

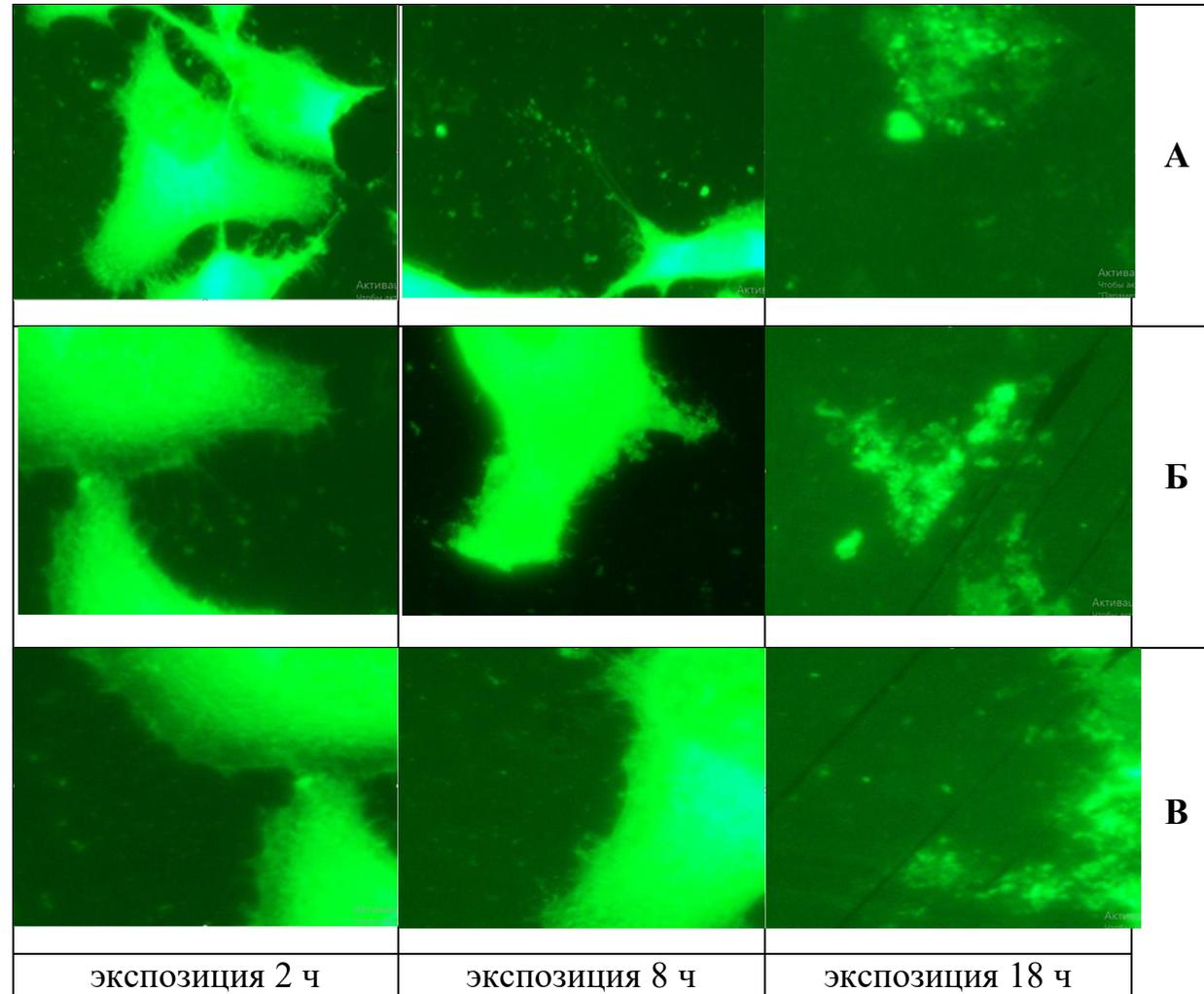


Рис. 3.1.2. Флуоресцентное микроскопическое исследование адгезии планктонной (А), 120-часовой биопленочной (Б) и 720-часовой биопленочной (В) культур штамма *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий) на культуре клеток карциномы фарингеального эпителия Нер-2 (окраска корифосфином, увеличение x1000)

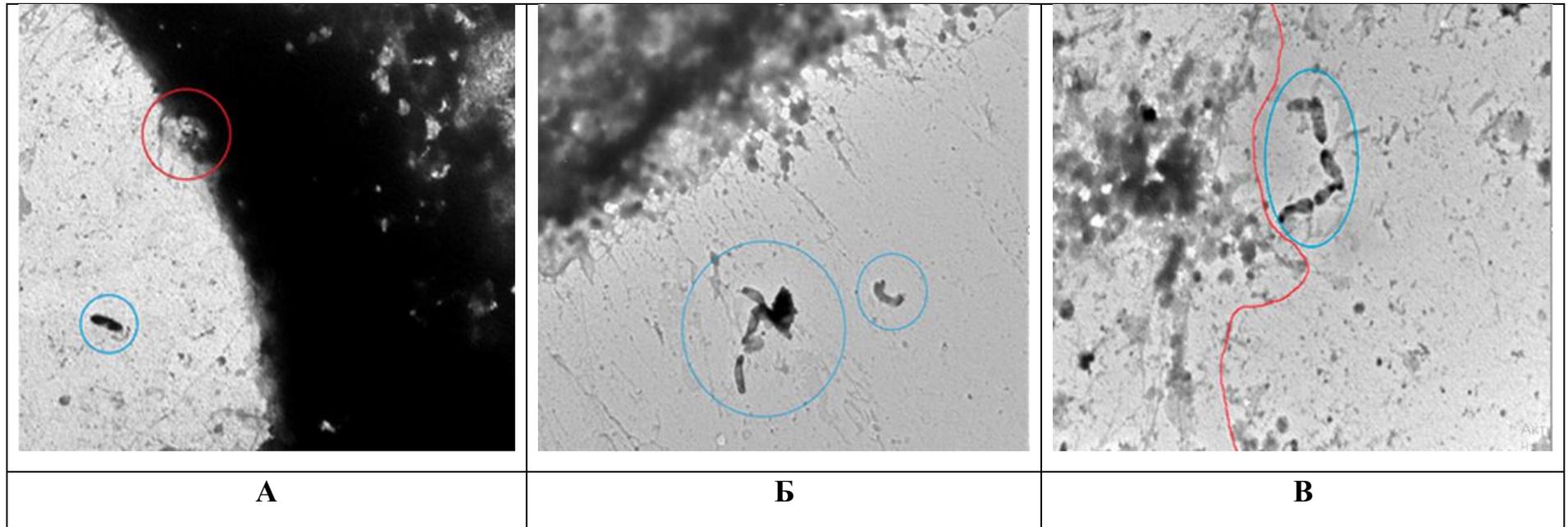


Рис. 3.1.3. Электронно-микроскопическое исследование адгезии и инвазии планктонной (А), 120-часовой биопленочной (Б) и 720-часовой биопленочной (В) культур штамма *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий) на культуре клеток карциномы фарингеального эпителия Нер-2 (контрастирование по методу Luft J.H. и тетраоксидом осмия (VIII))

На электронограмме представлены:

- клетка коринебактерий (электронно-прозрачная, обведена красным), инвазированная в цитоплазму клетки Нер-2 (А),
- клетки коринебактерий (обведены синим), адгезированные на отростках (А, Б) и поверхности клетки Нер-2 (В)

менее инвазивным среди всех исследованных недифтерийных коринебактерий оказались штаммы *C. pseudodiphtheriticum*, выделенные от практически здоровых обследованных. При этом наиболее инвазивными из числа штаммов коринебактерий, изолированных от больных с патологией респираторного тракта, оказались штаммы *C. pseudodiphtheriticum*, выделенные от пациентов с хроническим тонзиллитом.

Таблица 3.1.3. - Показатели адгезии и инвазии штаммов *C. pseudodiphtheriticum*, выделенных от различных контингентов обследованных (КОЕ±m) x10²

Контингент обследованных		Адгезия	Инвазия	Коэффициент корреляции (R)
больные с патологией респираторного тракта (n=23)	хронический тонзиллит (n=9)	187,0±8,5 *, **	146,8±6,1 *, **	0,78
	ангина (n=14)	238,3±6,5 *, **	215,9±7,9 *, **	0,94
	всего	212,7±3,1 *, **	181,4±7,9 *, **	0,86
практически здоровые лица (n=15)		104,0±4,3	92,4±7,0	0,93

Условные обозначения:

* - статистическая значимость отличий ($p \leq 0,05$) между штаммами *C. pseudodiphtheriticum*, выделенными от больных с патологией респираторного тракта и практически здоровых лиц;

** - статистическая значимость отличий ($p \leq 0,05$) между показателями адгезии и инвазии

При сравнительном анализе интенсивности процессов адгезии и инвазии штаммов недифтерийных коринебактерий, выделенных от больных с патологией респираторного тракта, установлено, что адгезия превалировала ($p \leq 0,05$) над инвазией у всех исследованных штаммов. При исследовании штаммов

C. pseudodiphtheriticum, выделенных от практически здоровых лиц, обнаружили, что уровень их адгезивности и инвазивности был одинаков. Коррелятивная связь интенсивности процессов адгезии и инвазии у штаммов *C. pseudodiphtheriticum*, выделенных как от больных с хроническим тонзиллитом, так и от практически здоровых обследованных положительна (значения R составили 0,86 и 0,93 соответственно).

При рассмотрении процессов адгезии и инвазии (рис. 3.1.4.) с помощью электронной микроскопии (увеличение $\times 6000$) обнаружены прикрепившиеся к поверхности клеток карциномы фарингеального эпителия Нер-2 делящиеся

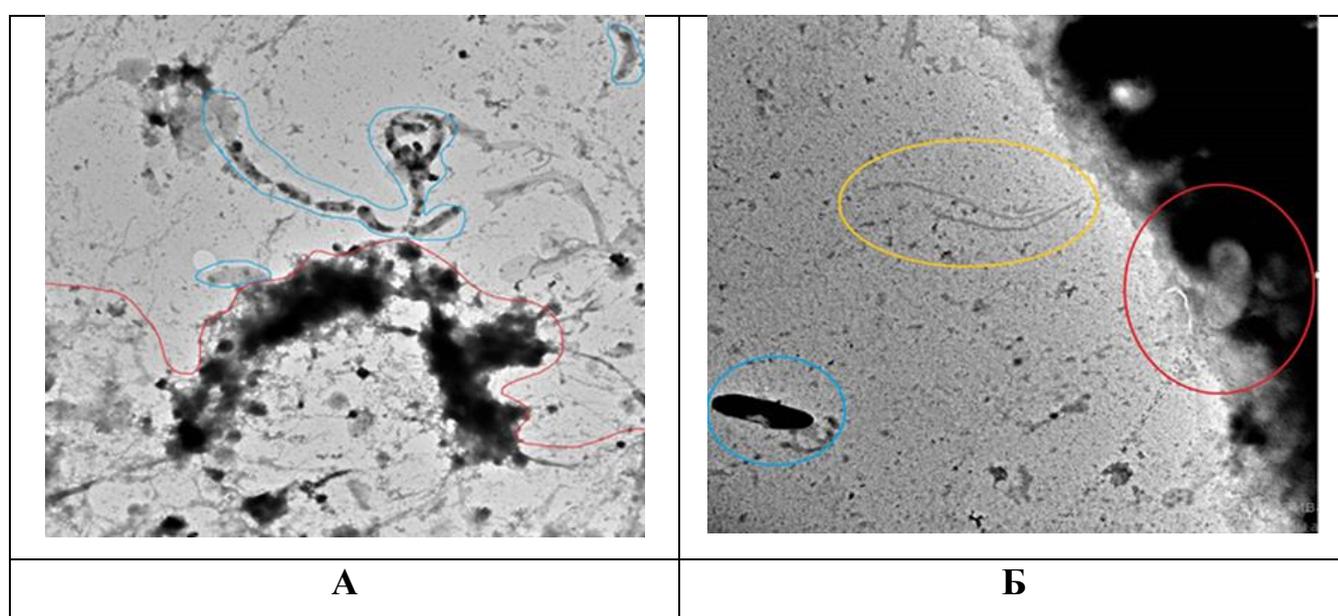


Рис. 3.1.4. Электронно-микроскопическое исследование адгезии и инвазии штамма *C. pseudodiphtheriticum*, выделенного из носа больного с хроническим тонзиллитом на культуре клеток карциномы фарингеального эпителия Нер-2. (Увеличение $\times 6000$ (А), увеличение $\times 20\ 000$ (Б), контрастирование по методу Luft J.H. и тетраоксидом осмия (VIII))

На электронограмме А коринебактерии, адгезированные на поверхности клетки Нер-2, обведены синим; цитоплазма клетки Нер-2 - красным

На электронограмме Б клетка коринебактерий, внедрившаяся в цитоплазму, обведена красным; клетка коринебактерий, расположенная внеклеточно, - синим; контурированные микроворсинки клетки Нер-2 - желтым

клетки недифтерийных коринебактерий штамма *C. pseudodiphtheriticum*, выделенного от больного с хроническим тонзиллитом. На электронограмме при увеличении $\times 20\ 000$ раз видны контуры клетки Нер-2, отростки и микроворсинки на их поверхности. Отчетливо заметны адгезированные на поверхности клеток Нер-2 коринебактерии, накопившие контрастное вещество, а также расположенные внутриклеточно, электроннопрозрачные инвазированные клетки штамма *C. pseudodiphtheriticum*.

Гемагглютинирующая активность всех исследованных штаммов недифтерийных коринебактерий, определяемая с использованием эритроцитов человека I(0) группы крови, отрицательна.

3.2. Токсигенность и токсичность

Определение способности планктонных и биоплёночных культур штаммов *C. diphtheriae* продуцировать дифтерийный токсин проводили в иммунопреципитационном тесте Элека; гена токсигенности — в ПЦР. Все исследованные планктонные и биоплёночные (120- и 720-часовые) культуры штаммов *C. diphtheriae* были положительными при определении гена токсигенности в ПЦР. В тесте Элека способность продуцировать дифтерийный токсин обнаружена у всех исследованных штаммов *C. diphtheriae*, за исключением штамма *C. diphtheriae gravis* (с «молчащим» *tox*-геном). Все исследованные штаммы *C. pseudodiphtheriticum* были отрицательны как в тесте Элека, так и в ПЦР.

Результаты реакции флоккуляции показали (табл.3.2.1.), что содержание дифтерийного экзотоксина в фильтратах планктонных культур всех исследованных токсигенных штаммов *C. diphtheriae* (от $39,0 \pm 0,2$ Lf/мл до $50,0 \pm 0,2$ Lf/мл) не отличалось от такового по сравнению с 120-часовыми биопленочными культурами, но было выше ($p \leq 0,05$), чем у 720-часовых биопленочных (от $36,0 \pm 0,2$ Lf/мл до $46,0 \pm 0,6$ Lf/мл). При этом наиболее выраженное понижение выделения токсина в составе 720-часовой биопленочной культуры наблюдали у штамма *C. diphtheriae mitis* № 269. В фильтратах культур штаммов

C. diphtheriae gravis (с «молчащим *tox*-геном») и штаммов *C. pseudodiphtheriticum* дифтерийный экзотоксин в реакции флоккуляции не обнаружен.

Таблица 3.2.1. - Содержание дифтерийного экзотоксина (Lf/мл) в фильтрах планктонных и биопленочных культур коринебактерий

Наименование штамма	Культура		
	планктонная	120-час. биопленочная	720-час. биопленочная
<i>C. diphtheriae gravis tox+</i> (циркулирующий)	49,0±0,2	50,0±0,2	46,0±0,6*
<i>C. diphtheriae gravis tox+</i> №665	46,0±0,2	46,0±0,2	44,0±0,2*
<i>C. diphtheriae gravis tox+</i> №6765	39,0±0,2	40,0±0,1	36,0±0,2*
<i>C. diphtheriae mitis tox+</i> №269	50,0±0,2	40,0±0,1*	37,0±0,2*
<i>C. diphtheriae gravis</i> (с «молчащим» <i>tox</i> -геном)	0	0	0
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> (n=11)	0	0	0

Условные обозначения:

*- достоверность различий ($p \leq 0,05$) между планктонной и биопленочными культурами каждого штамма коринебактерий

Исследование цитопатического действия (ЦПД) планктонных и биопленочных культур штаммов коринебактерий проводили на клеточной линии СНО-К1. При изучении динамики ЦПД планктонных культур токсигенных штаммов коринебактерий (табл. 3.2.2.) установили, что количество живых клеток СНО-К1 уже через 24 ч было незначительным ($22,6 \pm 1,2\%$), уменьшилось до $9,5 \pm 3,2\%$ через 48 ч, до $0,6 \pm 1,0\%$ - через 72 ч. При исследовании фильтратов 120-часовых биопленочных культур динамика цитопатического действия была иной: количество живых клеток при 24-х ч воздействии оставалось значительным ($70,8 \pm 2,2\%$), а затем при увеличении экспозиции культивирования резко снижалось до $16,5 \pm 5,0\%$ через 48 ч и $0,6 \pm 1,2\%$ через 72 ч.

Таблица 3.2.2. - Динамика цитопатического действия фильтратов планктонных и биопленочных культур коринебактерий

Исследованные штаммы	Культура	Количество живых клеток СНО-K1 (%)		
		24 ч	48 ч	72 ч
1. Токсигенные штаммы:				
- <i>C. diphtheriae gravis tox⁺</i> (циркулирующий)	планктонная	24,1±1,6	15,5±2,5	0
	120-час. биопленочная	75,3±1,2*	10,0±1,0	0
	720-час. биопленочная	90,0±1,0*	25,5±1,5*	35,5±1,5*
- <i>C. diphtheriae gravis tox⁺</i> №665	планктонная	22,3±1,2	12,5±1,6	2,5±1,0
	120-час. биопленочная	86,5±1,6*	15,5±2,5	2,5±1,2
	720-час. биопленочная	89,5±1,5*	70,0±1,0*	30,0±1,0*
- <i>C. diphtheriae gravis tox⁺</i> №6765	планктонная	20,0±0,1	10,0±0,1	0
	120-час. биопленочная	88,3±1,3*	18,5±3,2*	0
	720-час. биопленочная	98,5±1,2*	74,2±2,5*	25,6±1,2*
- <i>C. diphtheriae mitis tox⁺</i> №269	планктонная	24,3±1,2	0	0
	120-час. биопленочная	33,3±1,6*	21,5±2,2*	0
	720-час. биопленочная	52,5±1,6*	40,0±1,0*	10,0±1,3*
Всего (n=4)	планктонная	22,6±1,2	9,5±3,2	0,6±1,0
	120-час. биопленочная	70,8±2,2*	16,5±5,0	0,6±1,2
	720-час. биопленочная	82,5±2,2*	52,5±2,6*	25,3±3,0*
2. <i>C. diphtheriae gravis</i> (с «молчащим» <i>tox</i> -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. <i>C. pseudodiphtheriticum</i> (n=11)	планктонная	57,3±3,3	32,2±2,1	23,6±2,3

Условные обозначения:

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

При исследовании 720-часовых биопленочных культур токсигенных штаммов коринебактерий динамика ЦПД была аналогичной, но интенсивность ЦПД была существенно менее выражена ($p \leq 0,05$), чем при изучении культивирования планктонных и 120-часовых биопленочных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae*. При 72-х ч экспозиции наибольшее количество живых клеток ($p \leq 0,05$) обнаружено при исследовании фильтратов 720-часовых биопленочных культур коринебактерий ($25,3 \pm 3,0\%$). При анализе динамики ЦПД каждого из исследованных токсигенных штаммов коринебактерий обнаружили, что к 72 ч воздействия количество живых клеток было наибольшим у 720-часовых биопленочных культур всех исследованных токсигенных штаммов *C. diphtheriae* по сравнению с планктонными и 120-часовыми биопленочными культурами *C. diphtheriae*. Наибольшее количество живых клеток ($35,5 \pm 1,5\%$) обнаружено у штамма *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий).

При исследовании фильтратов планктонных и биопленочных культур штамма *C. diphtheriae gravis* (с «молчащим» *tox*-геном) выявлены аналогичные закономерности цитопатического действия. Однако количество живых клеток СНО-К1 при воздействии фильтрата 720-часовой биопленочной культуры значительно ($p \leq 0,05$) больше ($83,2 \pm 4,3\%$), чем при исследовании всех токсигенных штаммов коринебактерий.

Фильтраты планктонных культур штаммов *C. pseudodiphtheriticum*, выделенных от практически здоровых обследованных, по сравнению с аналогичными культурами возбудителя дифтерии, оказывали менее выраженный ($p \leq 0,05$) цитопатический эффект на клетки СНО-К1.

Рассматривая характер цитопатического действия, обнаружили, что при экспозиции 24 ч (табл. 3.2.3., рис. 3.2.1. - 3.2.7.) для планктонных и биопленочных культур токсигенных штаммов коринебактерий свойственно в 89,1 – 100% случаев изменение монослоя клеток СНО-К1, проявляющееся их истончением и удлинением. Для ЦПД, формирующегося под воздействием фильтратов

Таблица 3.2.3. - Частота признаков цитопатического действия (% поврежденных клеток СНО-К1) планктонных и биопленочных культур штаммов коринебактерий (экспозиция 24 ч)

Исследованные штаммы	Культура	истончение, удлинение	округление	отслоение	образование симпластов
1. Токсигенные штаммы:					
- <i>C. diphtheriae gravis tox⁺</i> (циркулирующий)	планктонная	89,1±10,2		10,8±2,2	-
	120- час. биопленочная	100,0±9,3	-	-	-
	720- час. биопленочная	100,0±8,5	-	-	-
- <i>C. diphtheriae gravis tox⁺</i> №665	планктонная	100,0±9,1	-		-
	120- час. биопленочная	100,0±10,2	-	-	-
	720- час. биопленочная	100,0±8,3	-	-	-
- <i>C. diphtheriae gravis tox⁺</i> №6765	планктонная	100,0±9,0	-		-
	120- час. биопленочная	100,0±8,5	-	-	-
	720- час. биопленочная	100,0±9,4	-	-	-
- <i>C. diphtheriae mitis tox⁺</i> №269	планктонная	100,0±9,2	-	-	-
	120- час. биопленочная	100,0±8,1	-	-	-
	720- час. биопленочная	100,0±9,0	-	-	-
Всего (n=4)	планктонная	97,3±11,9	-	2,7±2,2	-
	120- час. биопленочная	100,0±10,1	-	-	-
	720- час. биопленочная	100,0±9,2	-	-	-
2. <i>C. diphtheriae gravis</i> (с «молчащим» <i>tox</i> - геном)	планктонная	-	82,4±12,1	-	17,6±3,2
	120- час. биопленочная	-	66,7±8,5	-	33,3±3,3
	720- час. биопленочная	-	80,0±4,6	-	20,0±2,1
3. <i>C. pseudodiphtheriticum</i> (n=11)	планктонная	-	92,3±10,3	-	7,7±2,6

Условные обозначения:

* - достоверность различий ($p \leq 0,05$) между планктонной и биопленочными культурами каждого штамма коринебактерий

планктонных и биопленочных культур *C. diphtheriae gravis* (с «молчащим» *tox*-геном) характерно, в основном, округление клеток (66,7 – 82,4%) и формирование симпластов (17,6–33,3%).

При изучении характера ЦПД штаммов *C. pseudodiphtheriticum* истончения и удлинения клеток СНО-К1 не выявлено, тогда как почти все они были округлены (92,3+10,3%) и формировали симпласты (7,7-2,6%). При экспозиции 48 ч (Табл. 3.2.4., рис. 3.2.1. - 3.2.7.) как для планктонных, так и биопленочных культур всех исследованных штаммов коринебактерий наблюдали аналогичные закономерности.

Результаты определения характера цитопатического эффекта при экспозиции 72 ч (табл. 3.2.5., рис. 3.2.1. - 3.2.7.) были иными при исследовании планктонных и биопленочных культур токсигенных коринебактерий.

Так, помимо изменения клеток СНО-К1 в виде истончения и удлинения, обнаружили и их округление, которое значительно чаще ($p \leq 0,05$) обнаруживали у биопленочных культур токсигенных штаммов коринебактерий (63,1 – 69,7% клеток), чем у планктонных ($2,5 \pm 0,2\%$). При исследовании штамма *C. diphtheriae gravis* (с «молчащим» *tox*-геном) и штаммов *C. pseudodiphtheriticum* характер ЦПД никаких отличий по сравнению с аналогичными данными, полученными при экспозициях 24 и 48 ч, не имел.

При определении гемолитической активности обнаружено, что планктонные и биопленочные культуры как токсигенных штаммов *C. diphtheriae* и штамма *C. diphtheriae gravis* (с «молчащим» *tox*-геном) обладали низкой и средней гемолитической активностью. Гемолитическая активность всех исследованных штаммов *C. pseudodiphtheriticum* была положительна и имела низкие ($29,0 \pm 7,3 \%$), средние ($50,0 \pm 8,1 \%$;) и высокие ($21,0 \pm 6,6 \%$) значения.

Таблица 3.2.4. - Частота признаков цитопатического действия (% поврежденных клеток СНО-К1) планктонных и биопленочных культур штаммов коринебактерий (экспозиция 48 ч)

Исследованные штаммы	Культура	истончение, удлинение	округление	отслоение	образование симпластов	
1. Токсигенные штаммы:						
	- <i>C. diphtheriae gravis tox⁺</i> (циркулирующий)	планктонная	75,0±1,3	-	25,0±2,1	-
	120- час. биопленочная	88,8±2,2	-	11,1±0,1	-	
	720- час. биопленочная	85,7±1,6	-	14,3±2,0	-	
- <i>C. diphtheriae gravis tox⁺</i> № 665	планктонная	88,8±2,1	-	11,1±1,0	-	
	120- час. биопленочная	75,0±3,1	-	25,0±1,2	-	
	720- час. биопленочная	85,7±4,3	-	14,3±2,2	-	
- <i>C. diphtheriae gravis tox⁺</i> № 6765	планктонная	100,0±10,3	-	-	-	
	120- час. биопленочная	62,5±1,3	-	37,5±1,5	-	
	720- час. биопленочная	100,0±9,2	-	-	-	
- <i>C. diphtheriae mitis tox⁺</i> № 269	планктонная	-	-	100,0±10,2	-	
	120- час. биопленочная	100,0±7,3	-	-	-	
	720- час. биопленочная	100,0±9,1	-	-	-	
Всего (n=4)	планктонная	65,8±3,2	-	34,2±1,5	-	
	120- час. биопленочная	81,6±4,5	-	18,4±1,2	-	
	720- час. биопленочная	92,8±5,6	-	7,2±0,5	-	
2. <i>C. diphtheriae gravis</i> (с «молчащим» токсигеном)	планктонная	-	80,0±2,0	-	20,0±1,0	
	120- час. биопленочная	-	90,0±1,0	-	10,0±0,1	
	720- час. биопленочная	-	80,0±2,0	-	20,0±1,0	
3. <i>C. pseudodiphtheriticum</i> (n=11)	планктонная	-	96,3±10,6	-	3,6±2,1	

Условные обозначения:

* - достоверность различий ($p \leq 0,05$) между планктонной и биопленочными культурами каждого штамма коринебактерий

Таблица 3.2.5. - Частота признаков цитопатического действия (% поврежденных клеток СНО-К1) планктонных и биопленочных культур штаммов коринебактерий (экспозиция 72 ч)

Исследованные штаммы	Культура	истончение, удлинение	округление	отслоение	образование симпластов	
1. Токсигенные штаммы:						
	- <i>C. diphtheriae gravis tox⁺</i> (циркулирующий)	планктонная	70,0±4,1	10,0±1,0	20,0±1,0	-
	120- час. биопленочная	-	90,0±2,0	10,0±1,0	-	
	720- час. биопленочная	-	100,0±10,0	-	-	
- <i>C. diphtheriae gravis tox⁺</i> №665	планктонная	88,8±5,6	-	11,1±1,0	-	
	120- час. биопленочная	11,1±1,0	88,8±5,6	-	-	
	720- час. биопленочная	14,3±2,3	85,7±5,2	-	-	
- <i>C. diphtheriae gravis tox⁺</i> №6765	планктонная	100,0±10,	-	-	-	
	120- час. биопленочная	70,0±3,0	-	30,0±1,0	-	
	720- час. биопленочная	57,1±1,4	-	42,9±0,2	-	
- <i>C. diphtheriae mitis tox⁺</i> №269	планктонная	100,0±10,1	-	-	-	
	120- час. биопленочная	-	100,0±6,4	-	-	
	720- час. биопленочная	22,2±0,2	66,6±0,6	11,1±0,1	-	
Всего (n=4)	планктонная	88,7±6,3	2,5±0,2	7,8±0,4	-	
	120- час. биопленочная	20,2±0,2	69,7±0,7	10,0±0,1	-	
	720- час. биопленочная	23,4±1,2	63,1±1,3	13,5±0,3	-	
2. <i>C. diphtheriae gravis</i> (с «молчащим» <i>tox</i>-геном)	планктонная	-	80,0±2,0	-	20,0±1,0	
	120- час. биопленочная	-	90,0±1,0	-	10,0±0,1	
	720- час. биопленочная	-	80,0±2,0	-	20,0±1,0	
3. <i>C. pseudodiphtheriticum</i> (n=11)	планктонная	-	97,2±10,7	-	2,7±1,4	

Условные обозначения:

* - достоверность различий ($p \leq 0,05$) между планктонной и биопленочными культурами каждого штамма коринебактерий

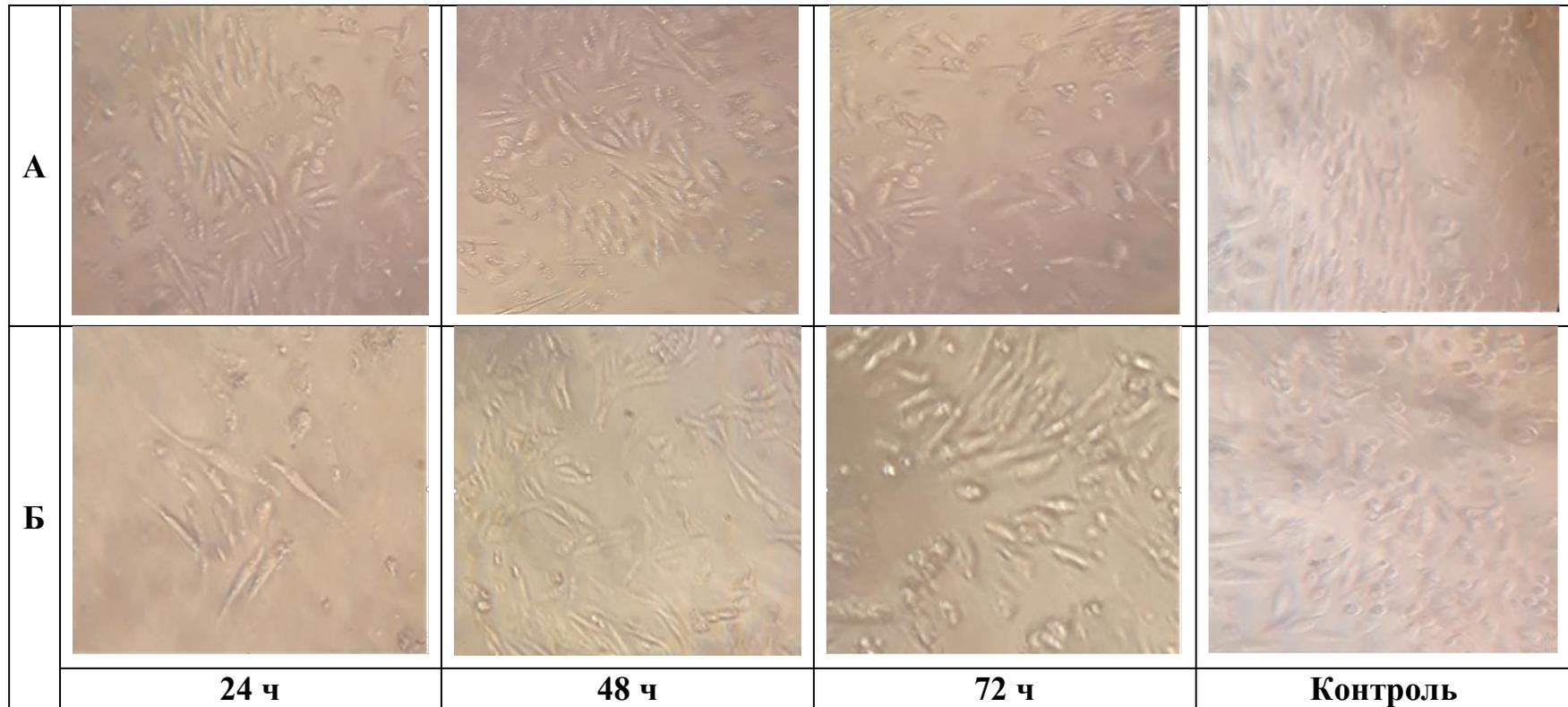


Рис. 3.2.1. - Характер цитопатического действия планктонных культур штаммов *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий) (А) и *C. diphtheriae gravis tox+* № 665 (Б)

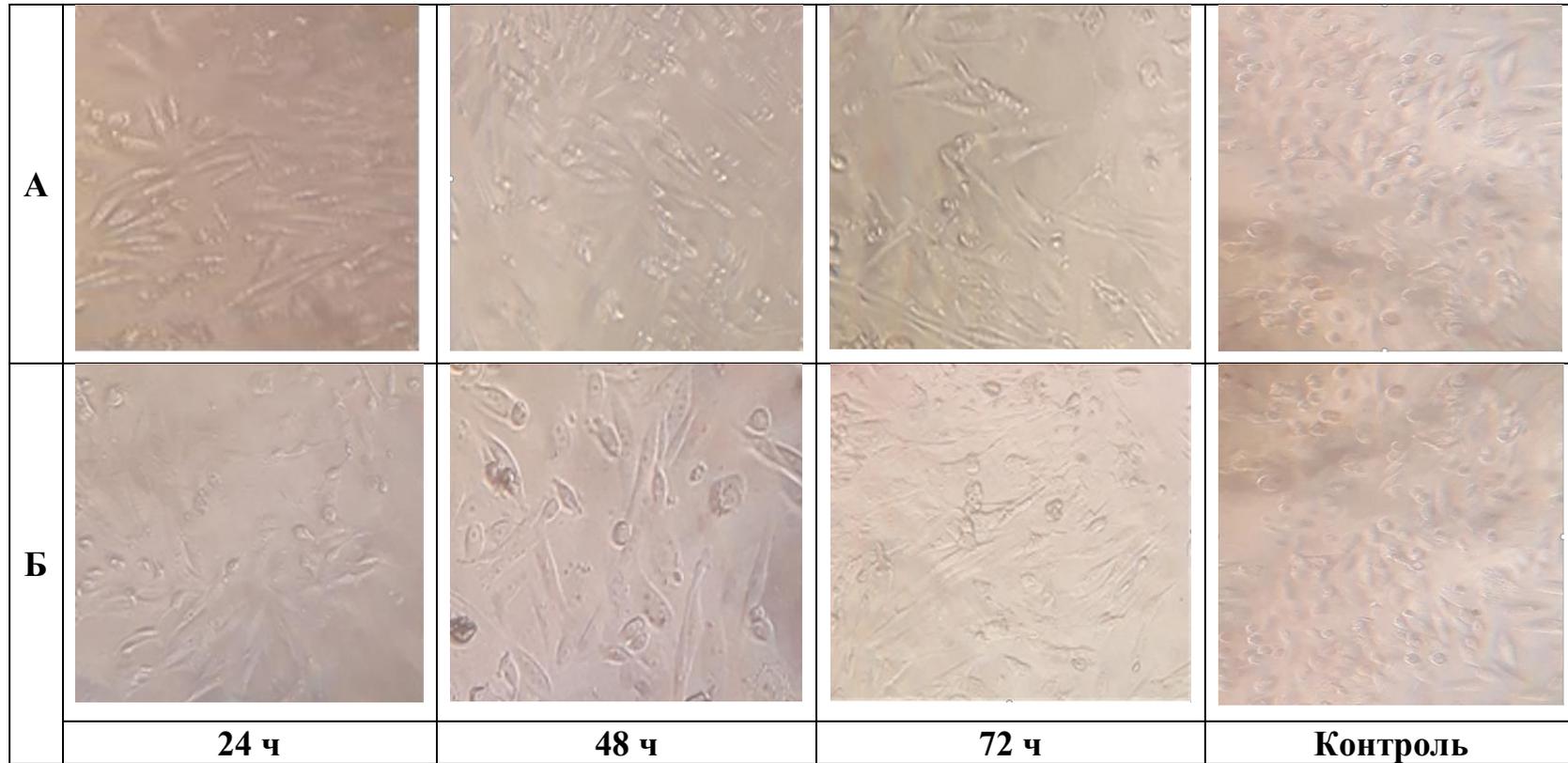


Рис. 3.2.2. - Характер цитопатического действия планктонных культур штаммов *C. diphtheriae gravis tox+* №6765 (А) и *C. diphtheriae mitis tox+* № 269 (Б)

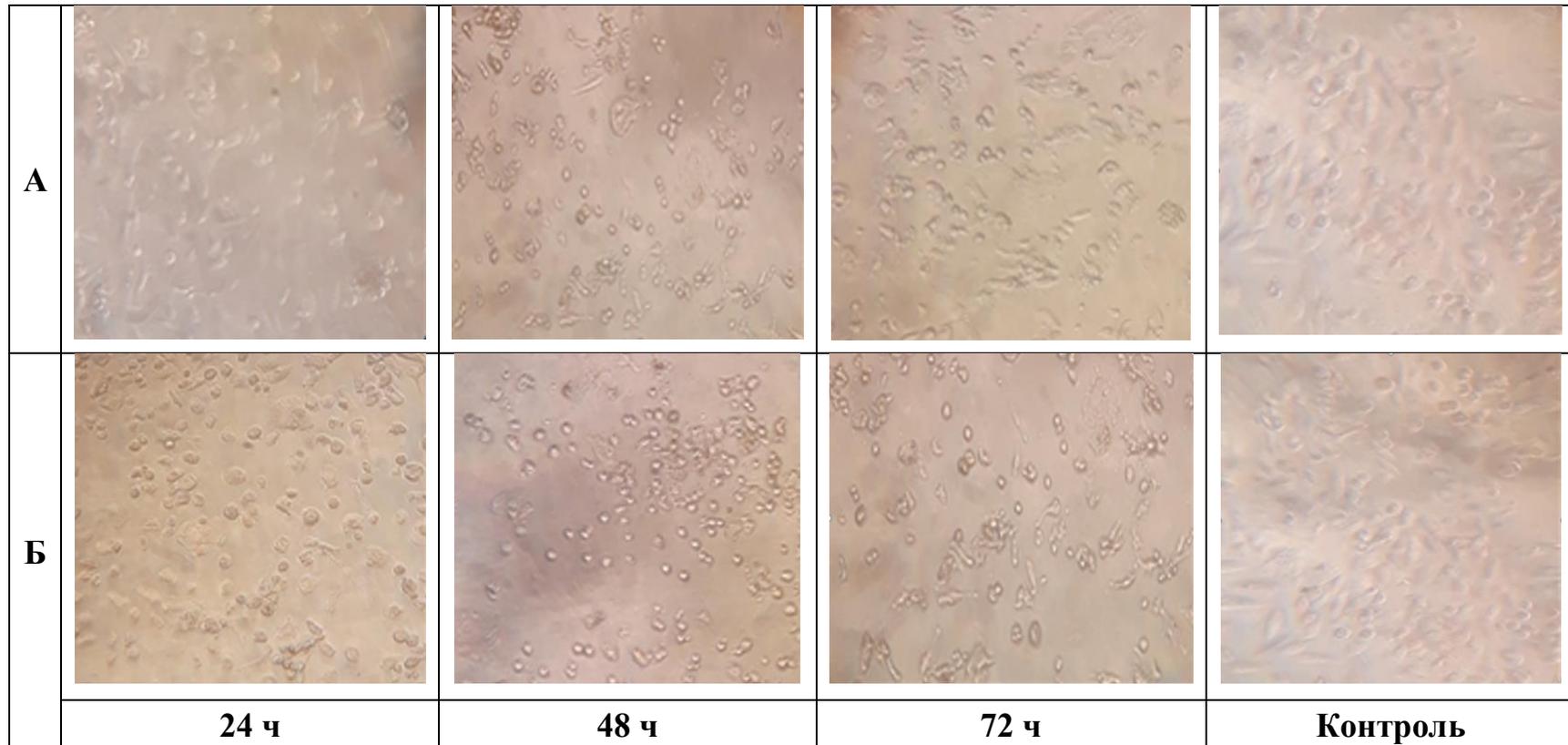


Рис. 3.2.3. - Характер цитопатического действия планктонных культур штаммов *C. diphtheriae gravis* (с «молчащим» *tox*-геном) (А) и *C. pseudodiphtheriticum* (Б)

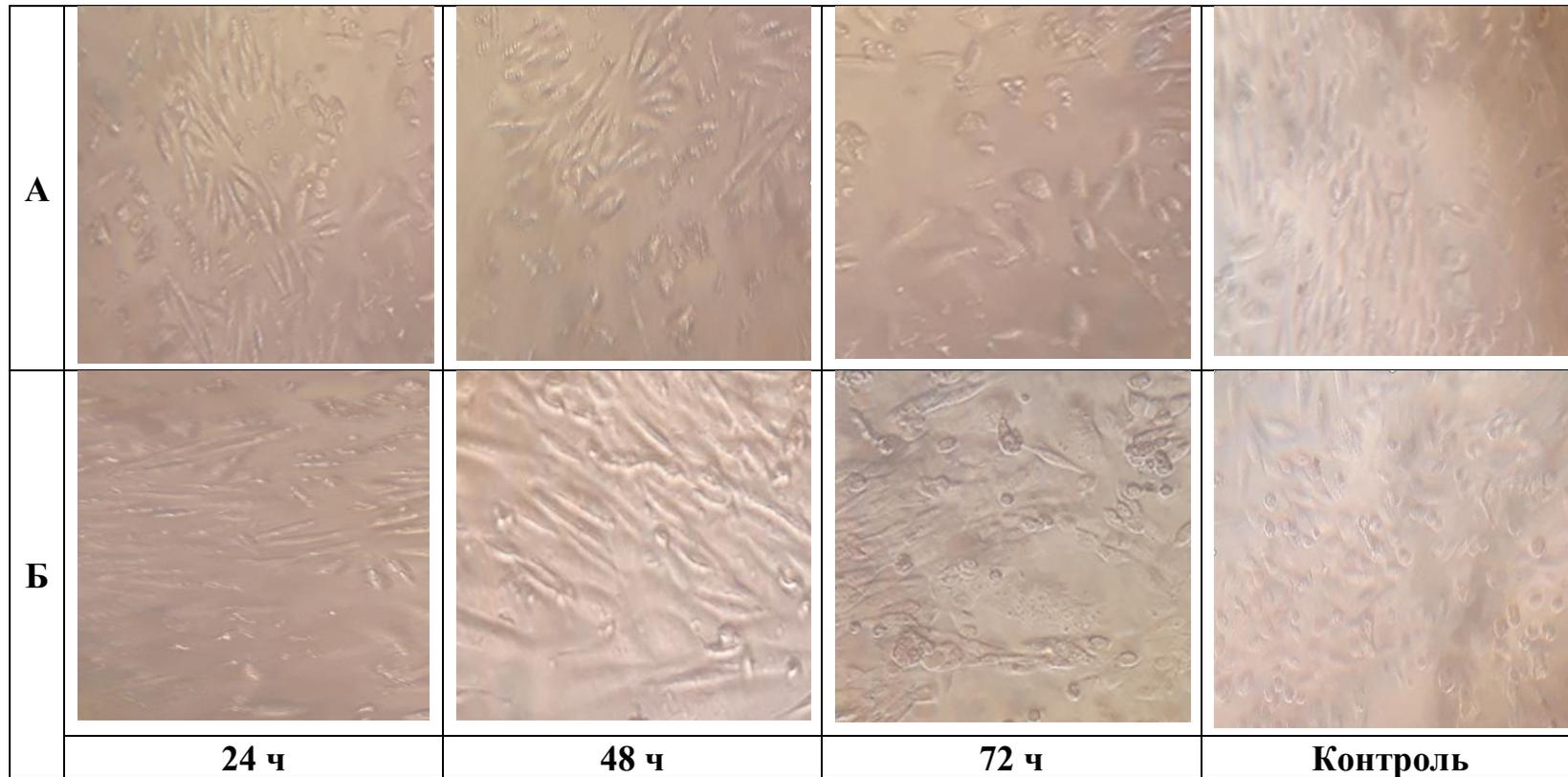


Рис. 3.2.4. - Характер цитопатического действия 120-часовых биопленочных культур штаммов *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий) (А) и *C. diphtheriae gravis tox+* № 665 (Б)

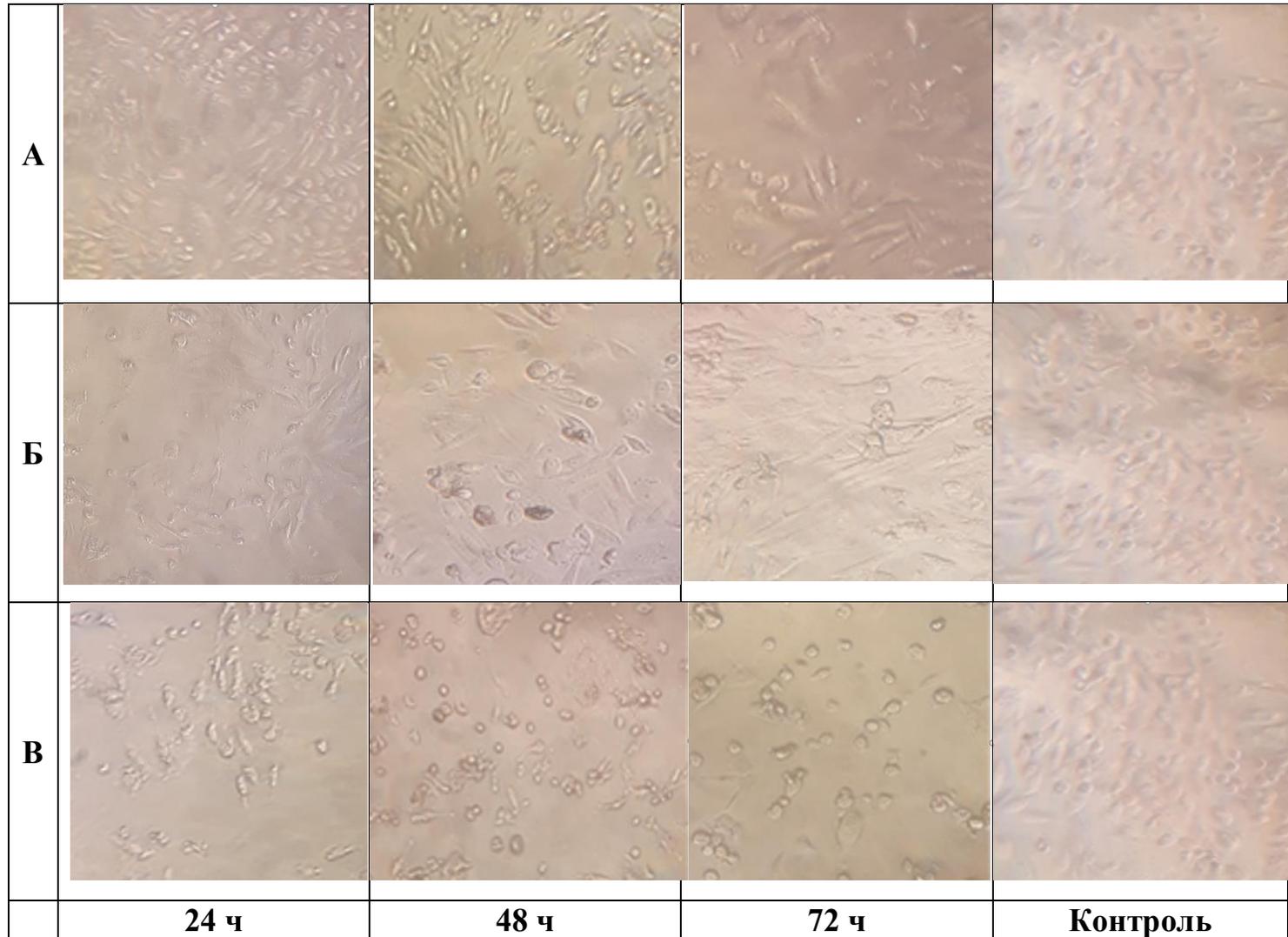


Рис. 3.2.5. - Характер цитопатического действия 120-часовых биопленочных культур штаммов *C. diphtheriae gravis tox+* № 6765 (А), *C. diphtheriae mitis tox+* № 269 (Б) и *C. diphtheriae gravis* (с «молчащим» *tox*-геном) (В)

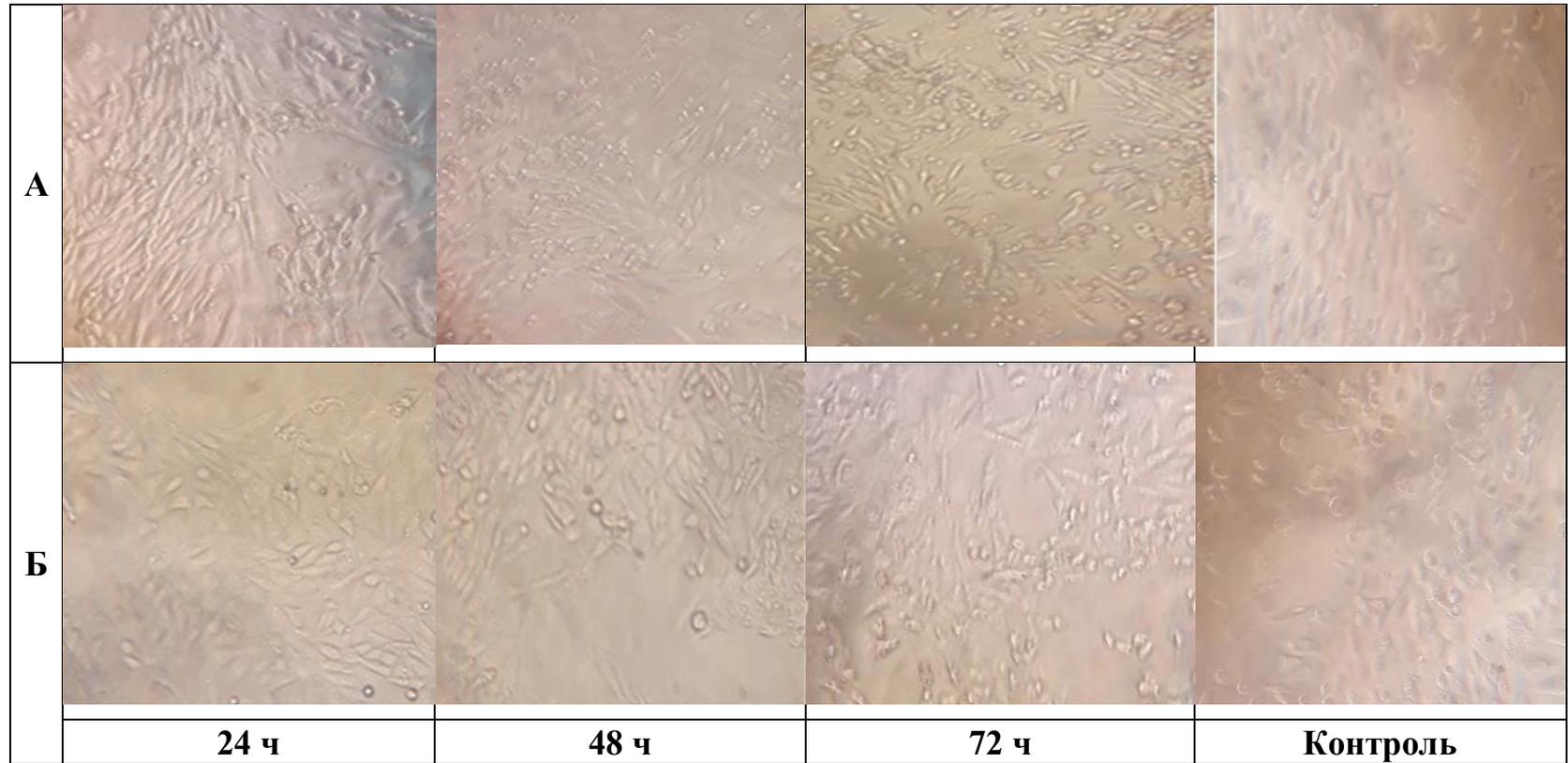


Рис. 3.2.6. - Характер цитопатического действия 720-часовых биопленочных культур штаммов *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий) (А) и *C. diphtheriae gravis tox+* № 665 (Б)

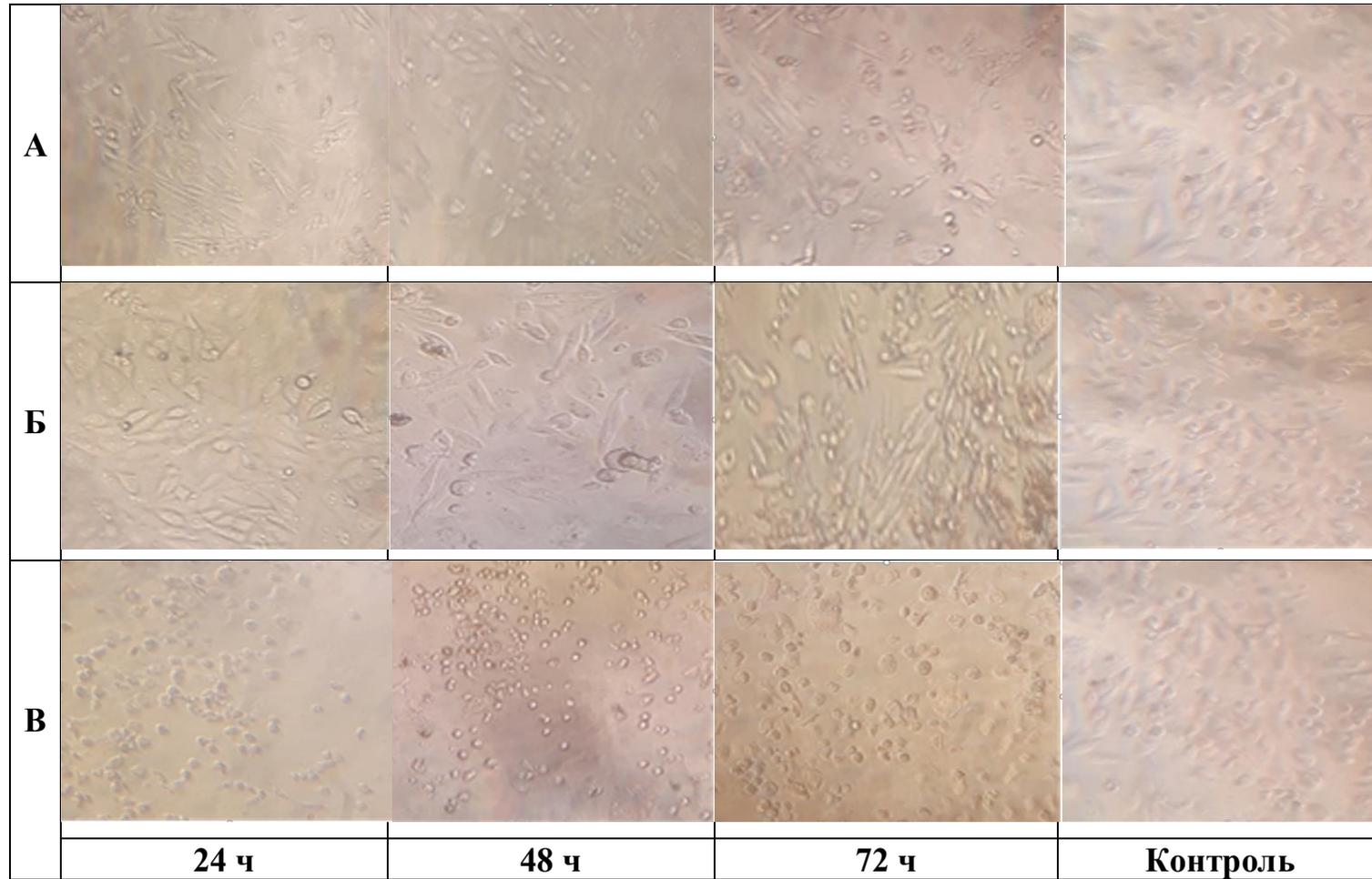


Рис. 3.2.7. - Характер цитопатического действия 720-часовых биопленочных культур штаммов *C. diphtheriae gravis tox+* № 6765 (А), *C. diphtheriae mitis tox+* № 269 (Б) и *C. diphtheriae gravis* (с «молчащим» *tox*-геном) (В)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наиболее выраженные адгезивные свойства из всех исследованных токсигенных штаммов возбудителя дифтерии обнаружены у циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox+*. Выраженная способность к адгезии и, как следствие, к биопленкообразованию позволяет возбудителю колонизировать слизистую оболочку зева и длительно персистировать в организме при бактерионосительстве. Адгезия и инвазия возбудителя дифтерии играют существенную роль на ранних стадиях инфекционного процесса, тогда как в последующем, при формировании биопленки, адгезивность коринебактерий увеличивается, а инвазивность резко снижается.

В составе биоплёнки интенсивность ЦПД токсигенных штаммов *C. diphtheriae* и штамма *C. diphtheriae* (с «молчащим» *tox*-геном) понижается, что свидетельствует о малой интенсивности выделения экзотоксина и замедлении метаболических процессов. ЦПД в виде истончения и удлинения клеток СНО-К1 связано с действием дифтерийного экзотоксина, округление – с действием ферментов коринебактерий и, возможно, фрагментов поверхностных структур – адгезинов. Пониженное выделение токсина и ферментов за пределы матрикса биопленки *C. diphtheriae* является важной причиной «бессимптомности» носительства при дифтерии.

ГЛАВА 4. Влияние факторов естественного и искусственного происхождения на адгезивные и инвазивные свойства *C. diphtheriae*

4.1. Факторы врожденного и адаптивного иммунитета

Известно, что высокий уровень антитоксина в организме привитых не препятствует циркуляции штаммов возбудителя дифтерии в популяции [17]. Связано это, прежде всего, с тем, что формирующийся при вакцинации противодифтерийный иммунитет не способен предотвратить адгезию и колонизацию возбудителем слизистой респираторного тракта человека [15]. У лиц с защитным уровнем анитоксических антител могут сформироваться различные по степени выраженности клинические формы дифтерии: от бессимптомных (бактерионосительство) до тяжелых клинически выраженных [28]. Почему так происходит, однозначного ответа пока нет. С одной стороны, известно, что бактерионосительство, в отличие от манифестированных форм инфекции, формируется у лиц с изначально высоким уровнем анитоксических и низким содержанием антибактериальных антител [12]. Имеет значение и состояние местного иммунитета: уровень секреторного IgA в слюне при кратковременном и транзитном бактерионосительстве ниже, чем при длительном [12]. С другой стороны, важную роль играют и свойства выделяемых штаммов коринебактерий. Так при длительном носительстве выделяются только высоко адгезивные штаммы независимо от их токсигенности [17]. В соответствии с этим, представляло интерес исследовать воздействие факторов врожденного и адаптивного иммунитета на адгезивные и инвазивные свойства штаммов *C. diphtheriae*. Для этого использовали образцы сыворотки крови различных контингентов обследованных (бактерионосители, больные дифтерией ротоглотки токсической и локализованной, привитые и непривитые противодифтерийными препаратами).

При исследовании воздействия образцов сыворотки крови различных контингентов обследованных на адгезивные свойства циркулирующего в популяции штамма *C. diphtheriae gravis tox+* (табл. 4.1.1., рис 4.1.1.) обнаружили

Таблица 4.1.1. - Показатели адгезии планктонных и биопленочных культур штаммов *C. diphtheriae* при воздействии образцов сыворотки крови различных контингентов обследованных (КОЕ/мл±m)

Штаммы	Культура	Образцы сыворотки крови					Контроль
		БН	ДТ	ДЛ	П	НП	
<i>C. diphtheriae gravis tox+</i> (циркулирующий)	Планктонная	46,7±8,98*	0,3±0,13*,**	0,3±0,12*,**	18,7±0,88*,**	25,3±0,33**	24,5±0,43
	120-час. биопленочная	16,0±1,18*	8,3±0,88*,**	9,0±1,05*,**	17,3±2,37*	21,0±1,03**	23,7±0,57
	720-час. биопленочная	13,3±0,88*	10,0±0,49*,**	10,3±0,50*,**	20,3±1,08*,**	19,0±1,03*,**	25,3±1,15
<i>C. diphtheriae gravis tox+</i> №665	Планктонная	22,5±2,05*	1,7±0,67*,**	5,7±1,20*,**	9,0±1,15*,**	13,7±0,67**	14,7±0,56
	120-час. биопленочная	7,0±0,96*	4,7±0,31*,**	7,0±0,47*	13,7±1,15**	12,0±1,03**	14,0±1,14
	720-час. биопленочная	4,0±0,37*	11,7±1,24*,**	9,7±0,48*,**	6,3±0,58*	7,0±0,46*,**	18,0±1,16
<i>C. diphtheriae gravis</i> (с «молчащим» <i>tox</i> - геном)	Планктонная	10,7±0,33*	5,3±1,20*,**	5,0±0,58*,**	11,0±0,67*	14,0±1,13*,**	20,0±2,31
	120-час. биопленочная	8,0±0,43*	9,3±1,11*	7,7±0,45*	7,7±0,56*	13,7±0,95*,**	18,7±1,07
	720-час. биопленочная	6,3±0,29*	7,3±0,15*	7,0±0,48*	5,7±0,41*	16,0±0,52*,**	18,3±1,14

Условные обозначения:

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

** - статистическая значимость отличий ($p \leq 0,05$) между показателями адгезии коринебактерий под воздействием образцов сыворотки крови различных контингентов обследованных (БН – бактерионосители, ДТ – дифтерия ротоглотки токсическая, ДЛ – дифтерия ротоглотки локализованная, П – привитые, НП – непривитые)

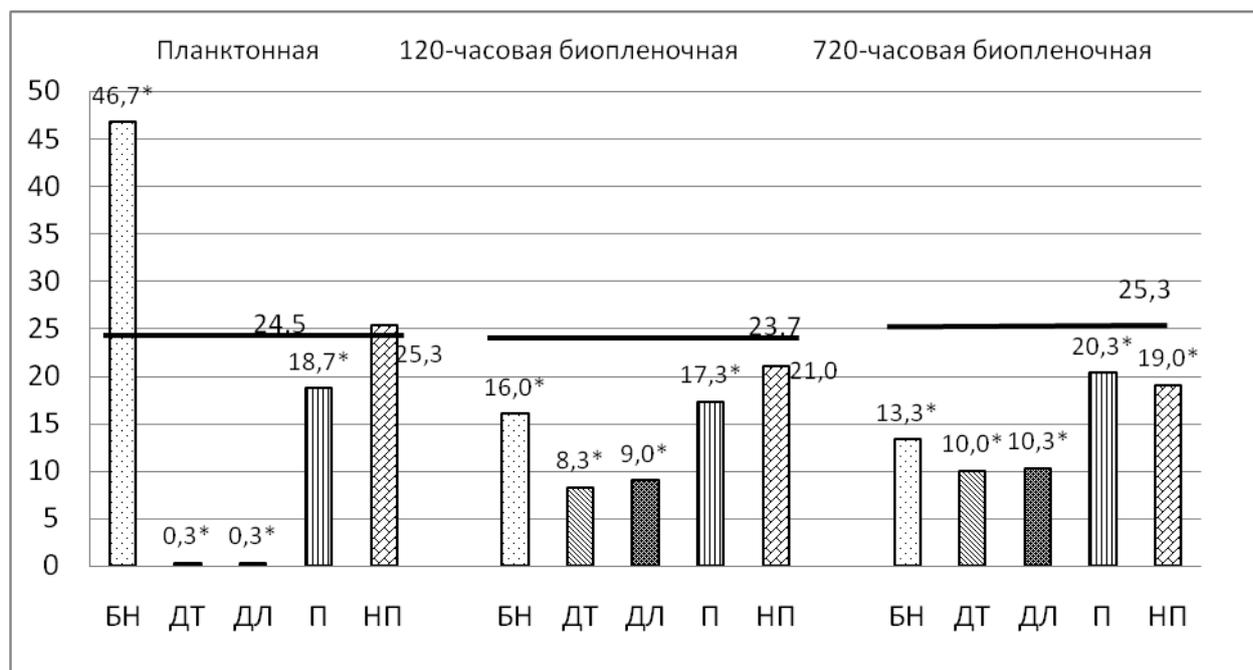


Рис. 4.1.1. – Показатели адгезии планктонных и биопленочных культур штамма *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий) при воздействии образцов сыворотки крови различных контингентов обследованных
по оси ординат – уровень адгезивной активности (КОЕ/мл),
по оси абсцисс – контингент обследованных (БН – 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

увеличение ($p \leq 0,05$) адгезивной активности планктонной культуры под влиянием сыворотки крови бактерионосителей почти в 2 раза по сравнению с показателями контроля. При этом наблюдали резкое (в 82 раза) снижение адгезивности ($p \leq 0,05$) под воздействием сыворотки крови пациентов с манифестированными формами дифтерии (дифтерией ротоглотки токсической и локализованной) и значительно менее выраженное (в 1,3 раза), но достоверное ($p \leq 0,05$) – сыворотки крови привитых АКДС- и АДС-М-препаратами. Под влиянием образцов сыворотки крови непривитых адгезивные свойства коринебактерий не изменялись. При исследовании биопленочных культур этого штамма показатели адгезивности понижались ($p \leq 0,05$) под воздействием образцов сыворотки крови как больных с клинически выраженными формами дифтерии, так и бактерионосителей. Но тенденция к более выраженной адгезивной активности культур, обработанных сывороткой крови бактерионосителей, сохранялась ($p \leq 0,05$). Под воздействием образцов сыворотки привитых и непривитых АКДС- и АДС-М-препаратами адгезивные свойства биопленочных культур штамма *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий) также снижались ($p \leq 0,05$) (приложение 1).

При рассмотрении адгезивных свойств планктонной культуры музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox+ №665* под воздействием образцов сыворотки бактерионосителей (табл. 4.1.1., рис. 4.1.2.) наблюдали увеличение ($p \leq 0,05$) показателей адгезии в 1,5 раза, а сыворотки крови больных манифестированными формами дифтерии - достоверное ($p \leq 0,05$) их снижение. При исследовании биопленочных культур этого штамма коринебактерий обнаружили, что их адгезивность понижалась ($p \leq 0,05$) под воздействием образцов сыворотки крови как больных дифтерией, так и бактерионосителей.

Воздействие образцов сыворотки привитых и непривитых АКДС- и АДС-М-препаратами не влияло на адгезивные свойства 120-часовых биопленочных культур, но снижало адгезивность 720-часовых биопленочных культур этого штамма коринебактерий.

При исследовании штамма *C. diphtheriae gravis* (с «молчащим» *tox*-геном) (табл.4.1.1., рис. 4.1.3.) результаты были иными: адгезивность как планктонной,

так и биопленочных культур этого штамма снижалась ($p \leq 0,05$) под воздействием всех исследованных образцов сыворотки крови.

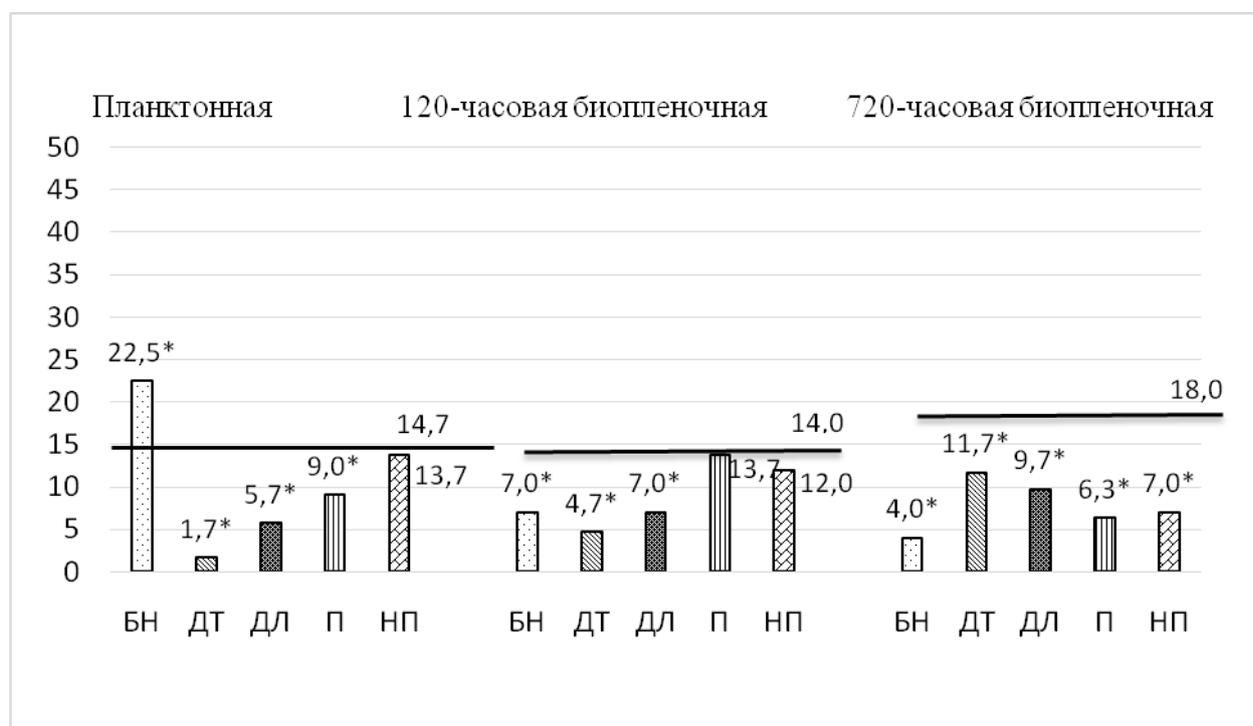


Рис. 4.1.2. – Показатели адгезии планктонных и биопленочных культур штамма *C. diphtheriae gravis tox+* № 665 при воздействии сыворотки крови различных контингентов обследованных

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

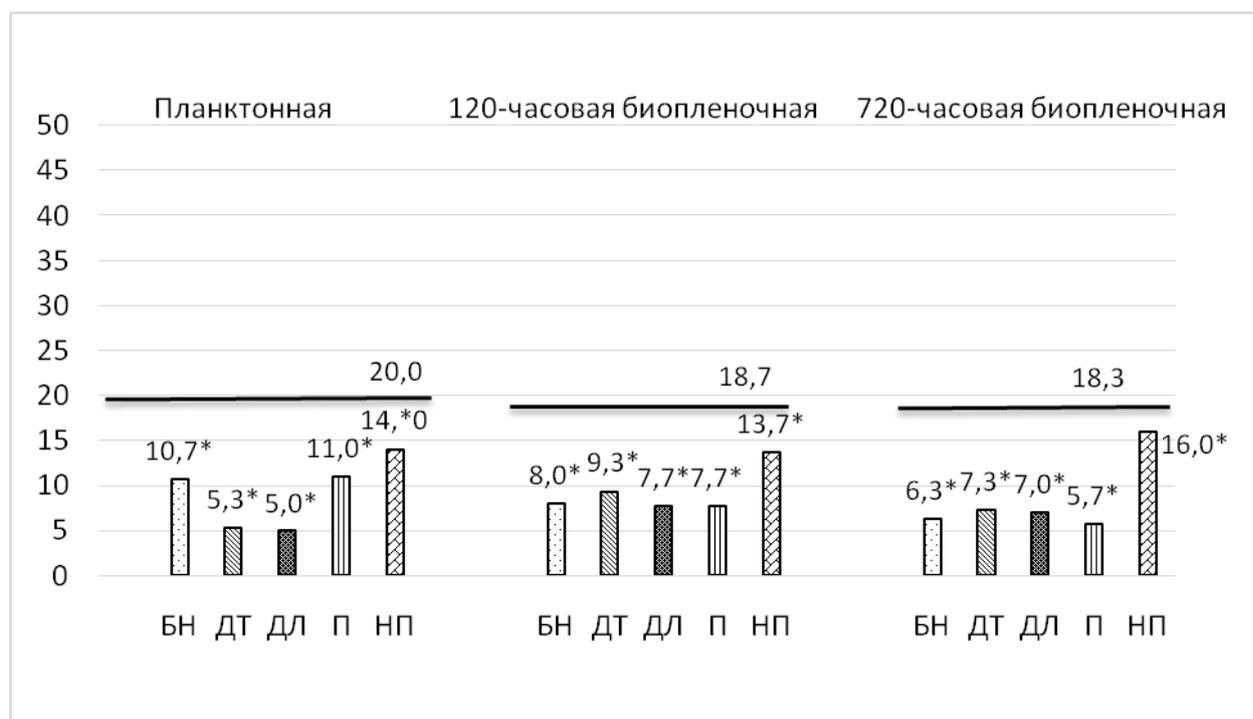


Рис. 4.1.3. – Показатели адгезии планктонных и биопленочных культур штамма *C. diphtheriae* (с «молчащим» *tox*-геном) при воздействии образцов сыворотки крови различных контингентов обследованных по оси ординат – уровень адгезивной активности (КОЕ/мл), по оси абсцисс – контингент обследованных (БН – 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

При исследовании воздействия образцов сыворотки крови различных контингентов обследованных на инвазивные свойства циркулирующего в популяции штамма *C. diphtheriae gravis tox+* (табл. 4.1.2., рис 4.1.4.) обнаружили снижение ($p \leq 0,05$) инвазивной активности планктонной культуры этого штамма при обработке сывороткой крови больных дифтерией и привитых противодифтерийными препаратами. При этом инвазивные свойства коринебактерий никак не изменялись под влиянием сыворотки крови бактерионосителей и непривитых. Инвазивная активность биопленочных культур этого штамма при исследовании воздействия на нее всех исследованных образцов сыворотки крови резко снижалась ($p \leq 0,05$).

При рассмотрении инвазивных свойств планктонной и биопленочных культур музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox+ №665* под воздействием всех исследованных образцов сыворотки (табл. 4.1.2., рис. 4.1.5.) наблюдали ее статистически значимое ($p \leq 0,05$) снижение.

При исследовании штамма *C. diphtheriae gravis* (с «молчащим» *tox*-геном) (табл.4.1.2., рис. 4.1.6.) установили, что инвазивность планктонной культуры снижалась ($p \leq 0,05$) под воздействием сыворотки крови больных дифтерией, бактерионосителей и непривитых и никак не изменялась под влиянием сыворотки крови привитых АКДС- и АДС-М-препаратами. Инвазивная активность биопленочных культур этого штамма снижалась ($p \leq 0,05$) под влиянием всех взятых в исследовании образцов сыворотки.

Учитывая различный характер воздействия образцов сыворотки крови больных дифтерией, бактерионосителей и привитых противодифтерийными препаратами на адгезивные и инвазивные свойства планктонных и биопленочных культур штаммов *C. diphtheriae*, закономерный интерес представляло выяснить, как отличались друг от друга использованные образцы сыворотки крови по содержанию в них факторов врожденного и адаптивного иммунитета.

Таблица 4.1.2. - Показатели инвазии планктонных и биопленочных культур штаммов *C. diphtheriae* при воздействии образцов сыворотки крови различных контингентов обследованных (КОЕ/мл±m)

Штаммы	Культура	Образцы сыворотки крови					Контроль
		БН	ДТ	ДЛ	П	НП	
<i>C. diphtheriae gravis tox+</i> (циркулирующий)	Планктонная	27,7±3,22	0,3±0,06*,**	0,7±0,02*,**	12,0±0,64*,**	24,7±1,05	24,3±0,42
	120-час. биопленочная	1,3±0,33*	1,0±0,01*	1,0±0,01*	0*	0,7±0,05*	18,0±1,08
	720-час. биопленочная	3,3±0,37*	0,7±0,09*,**	0,7±0,04*,**	0,7±0,02*,**	0,7±0,01*,**	16,7±2,36
<i>C. diphtheriae gravis tox+ №665</i>	Планктонная	3,1±0,56*	0,3±0,11*,**	0,7±0,09*,**	0,3±0,07*,**	5,7±0,71**	6,3±0,74
	120-час. биопленочная	0,7±0,07*	0,3±0,09*	0,7±0,04*	0,3±0,05*	0,7±0,11*	5,0±0,28
	720-час. биопленочная	0,7±0,02*	0,7±0,03*	2,0±0,06	0,7±0,01*	0,7±0,02*	4,0±0,58
<i>C. diphtheriae gravis</i> (с «молчащим» <i>tox-</i> геном)	Планктонная	26,0±1,15*	13,7±1,07*,**	13,3±0,96*,**	29,0±1,13	3,3±1,17*,**	34,7±2,05
	120-час. биопленочная	1,3±0,07*	2,3±0,15*	3,3±0,04*	1,7±0,05*	2,0±0,04*	34,0±2,87
	720-час. биопленочная	6,7±0,05*	2,7±0,02*	1,0±0,01*	1,3±0,05*	5,4±0,04*,**	20,3±2,17

Условные обозначения:

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

** - статистическая значимость отличий ($p \leq 0,05$) между показателями инвазии коринебактерий под воздействием образцов сыворотки крови различных контингентов обследованных (БН – бактерионосители, ДТ – дифтерия ротоглотки токсическая, ДЛ – дифтерия ротоглотки локализованная, П – привитые, НП – непривитые)

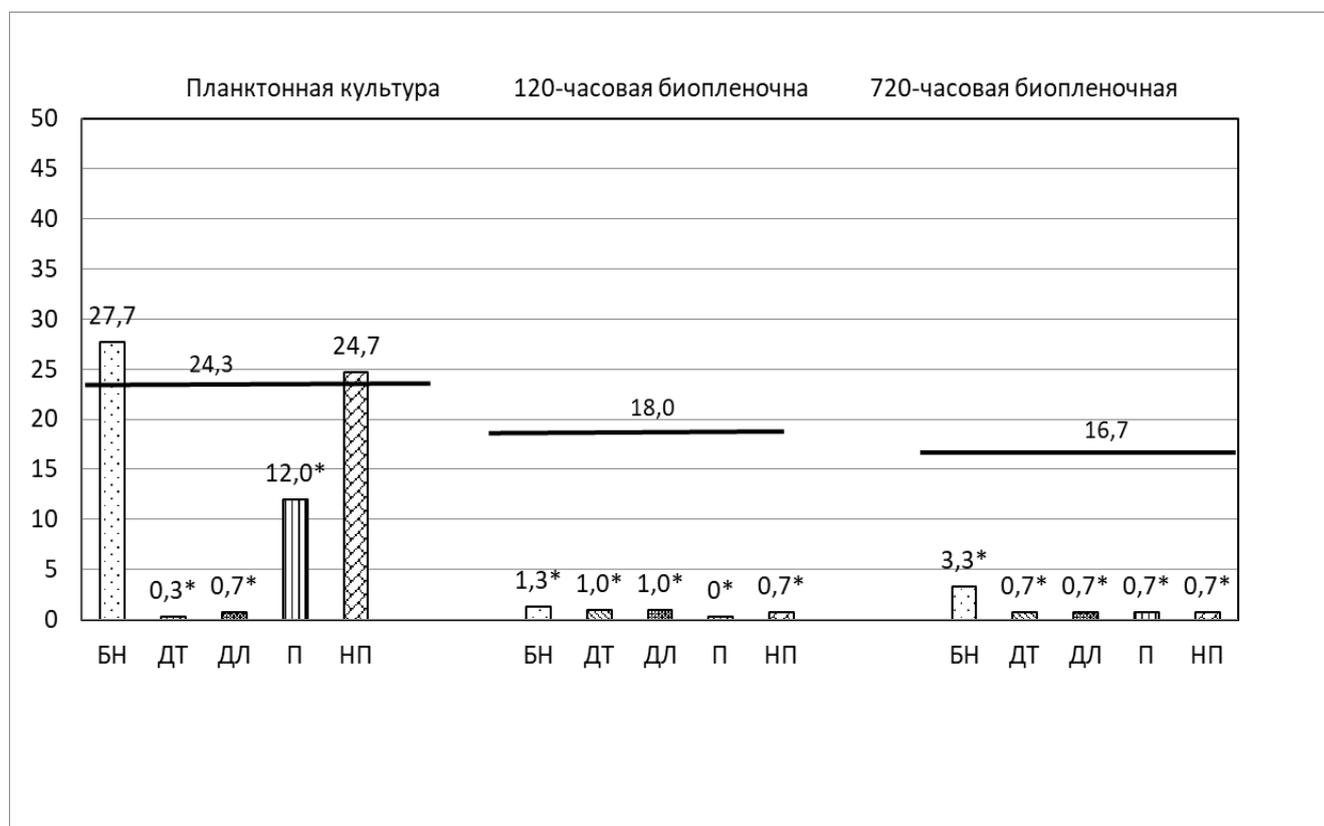


Рис. 4.1.4. – Показатели инвазии планктонных и биопленочных культур штамма *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий) при воздействии образцов сыворотки крови различных контингентов обследованных по оси ординат – уровень инвазивной активности (КОЕ/мл), по оси абсцисс – контингент обследованных (БН – бактерионосители; ДТ – дифтерия ротоглотки токсическая; ДЛ – дифтерия ротоглотки локализованная; П – привитые; НП – непривитые)

Условные обозначения:

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

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

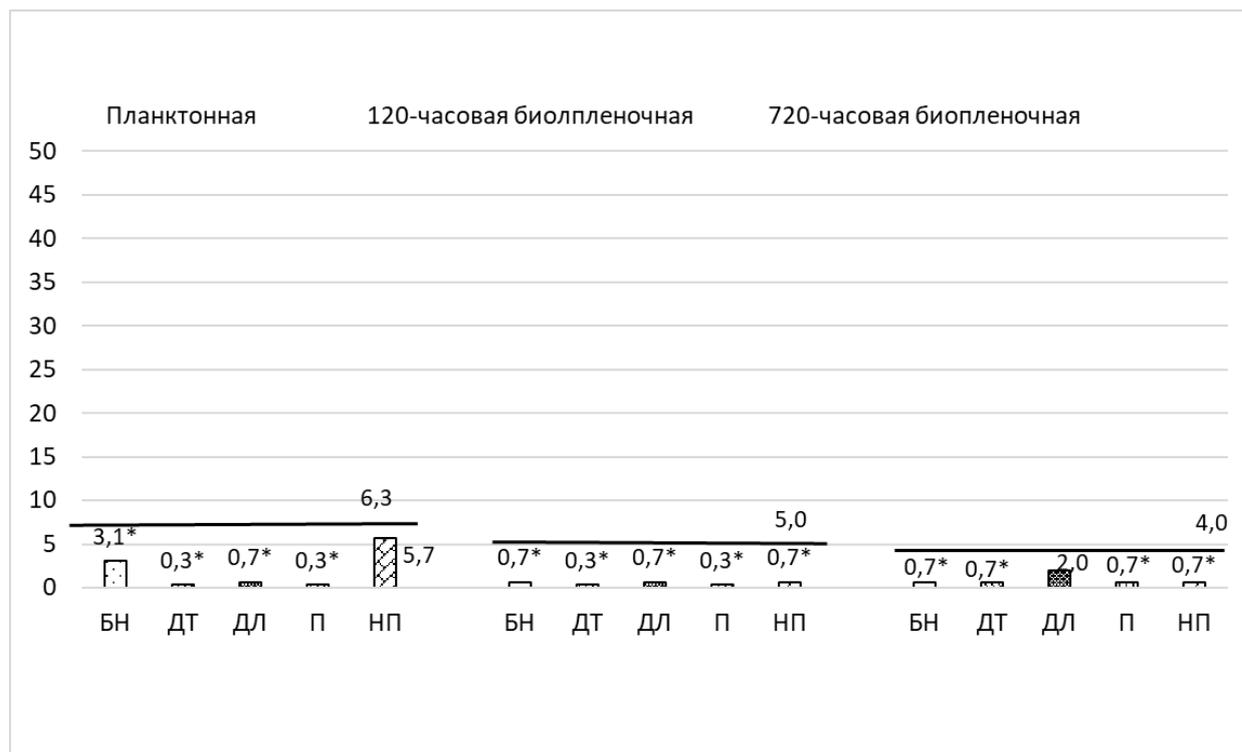


Рис. 4.1.5. – Показатели инвазии планктонных и биопленочных культур штамма *C. diphtheriae gravis tox+* № 665 при воздействии сыворотки крови различных контингентов обследованных

по оси ординат – уровень инвазивной 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 инвазии исследованных культур, не подвергшихся воздействию образцов сыворотки крови обследованных (контроль);

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

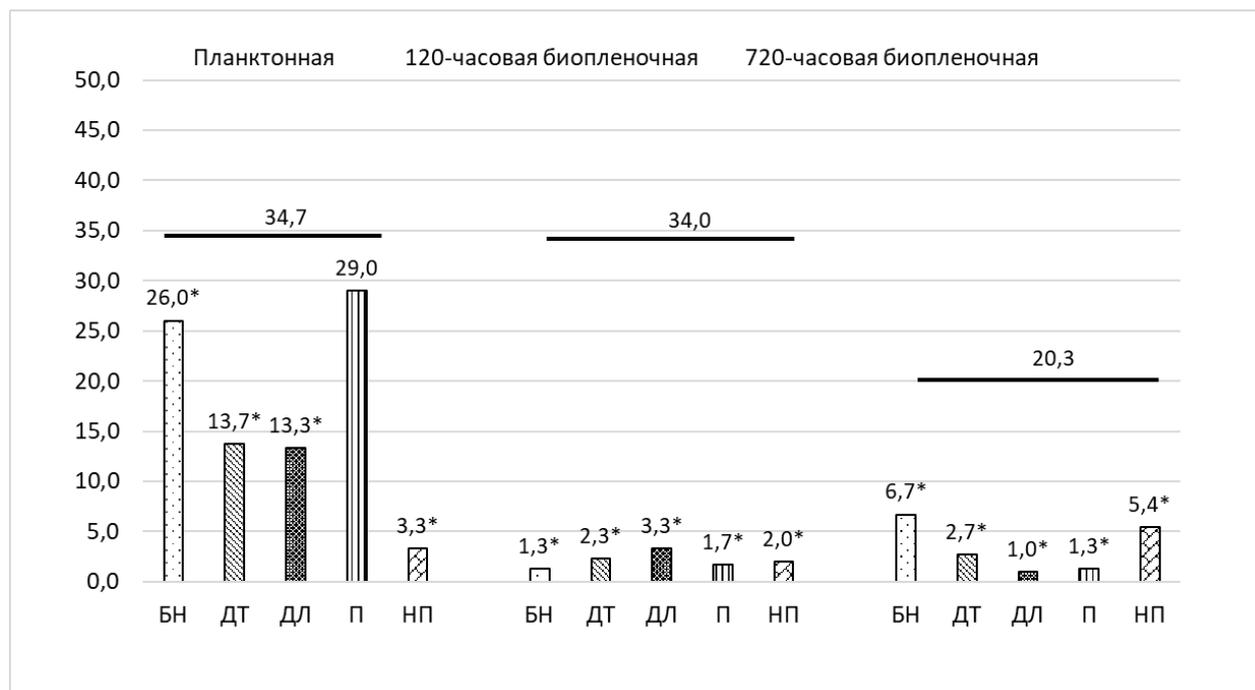


Рис. 4.1.6. – Показатели инвазии планктонных и биопленочных культур штамма *C. diphtheriae* (с «молчащим» *tox*-геном) при воздействии сыворотки крови различных контингентов обследованных

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

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

Условные обозначения:

— - показатель инвазии исследованных культур, не подвергшихся воздействию образцов сыворотки крови обследованных (контроль);

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

При определении факторов врожденного иммунитета (табл. 4.1.3.) обнаружили, что содержание С3-/С4-компонентов комплемента во всех исследованных образцах сыворотки крови находилось в пределах нормы и никаких отличий не имело в зависимости от контингента обследованных. При определении уровня лактоферрина установили, что максимальное его количество ($p \leq 0,05$) обнаружено в образцах сыворотки бактерионосителей ($1000 \pm 0,2$ нг/мл). Антитела к лактоферрину не обнаружены ни в одном из исследованных образцов сыворотки крови.

При определении факторов адаптивного иммунитета установлено, что содержание противодифтерийных антибактериальных антител минимально ($p \geq 0,05$) в образцах сыворотки крови бактерионосителей и непривитых противодифтерийными препаратами. Содержание противодифтерийных антитоксических антител в образцах сыворотки крови бактерионосителей (СГТ – 1:316,2) максимально ($p \leq 0,05$) по сравнению с другими контингентами обследованных, в том числе, и привитыми АКДС- и АДС-М-препаратами. При этом в образцах сыворотки крови больных дифтерией ротоглотки уровень антитоксина (СГТ - 1:20,8) был ниже ($p \leq 0,05$), чем у больных дифтерией ротоглотки локализованной (СГТ – 1:47,9).

Следующим этапом работы явилось изучение влияния указанных факторов врожденного и адаптивного иммунитета на адгезивные свойства штаммов *C. diphtheriae*.

Для этого использовали коммерческие препараты комплемента (ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России, Россия, г. Пермь), лактоферрина (производитель Nuscult Biotechnology (НТВ) BV, Нидерланды) и антитоксина диагностического дифтерийного (ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России, Россия, г. Пермь).

Таблица 4.1.3. – Содержание факторов врожденного и адаптивного иммунитета в образцах сыворотки крови различных контингентов обследованных

Параметры сравнения Контингент обследованных	C3-/C4- компоненты системы комплемента (г/л)	Лактоферрин (нг/мл)	Антитела к лактоферрину (МЕ/мл)	Противодифтерийные антибактериальные антитела (МЕ/мл)	Противодифтерий ные антитоксические антитела (СГТ)
Бактерионосители	0,95/0,31	1000,0±0,2	<10	0,0023±0,0001	1:316,2 (234,4-426,5)
Дифтерия ротоглотки токсическая	1,53/0,38	760,3±0,1	<10	0,031±0,002	1:20,8 (19,9-21,87)
Дифтерия ротоглотки локализованная	1,26/0,35	754,2±0,1	<10	0,013±0,001	1:47,9 (42,67–53,70)
Привитые	1,03/0,23	800,4±0,1	<10	0,011±0,002	1:181,9 (154,54-229,08)
Непривитые	1,32/0,30	750,7±0,1	<10	0,006±0,001	<1:10

При определении влияния препарата компонента (цельного) на планктонные культуры исследованных штаммов *C. diphtheriae* (табл. 4.1.4.) обнаружили, что их адгезивные свойства во всех случаях достоверно ($p \leq 0,05$) понижались.

Таблица 4.1.4. - Влияние компонента на адгезивные свойства планктонных и биопленочных культур штаммов *C. diphtheriae* (КОЕ/мл \pm m)

Штаммы	Планктонная		120-час. биопленочная		720-час. биопленочная	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
<i>C. diphtheriae gravis tox+</i> (циркулирующий)	23,6 \pm 0,6	9,3 \pm 1,1*	23,0 \pm 1,0	10,6 \pm 1,15*	25,6 \pm 0,6	6,6 \pm 0,6*
<i>C. diphtheriae gravis tox+</i> №665	15,0 \pm 1,0	7,33 \pm 0,6*	14,6 \pm 0,57	6,3 \pm 0,6*	17,2 \pm 0,4	5,4 \pm 0,9*
<i>C. diphtheriae gravis tox+</i> №6765	3,3 \pm 0,7	0,66 \pm 0,6*	10,3 \pm 0,57	6,6 \pm 0,57*	5,0 \pm 0,8	2,3 \pm 0,3*
<i>C. diphtheriae mitis tox+</i> №269	17,6 \pm 0,6	1,3 \pm 0,6*	18,0 \pm 1,0	2,3 \pm 0,57*	23,6 \pm 0,6	2,5 \pm 0,6*
<i>C. diphtheriae gravis</i> (с «молчащим» <i>tox</i> -геном)	20,0 \pm 1,0	3,6 \pm 0,6*	22,0 \pm 1,0	5,6 \pm 1,15*	19,2 \pm 0,5	2,1 \pm 0,6*

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

При исследовании воздействия на адгезивные свойства исследованных штаммов *C. diphtheriae* препарата лактоферрина (табл. 4.1.5) в дозе 270 мг/л, соответствующей его нормальному содержанию в сыворотке крови людей, была обнаружена полная блокада адгезивности как планктонных, так и биопленочных культур всех исследованных штаммов коринебактерий.

При определении влияния препарата антитоксина диагностического дифтерийного в концентрации 5 МЕ/мл на адгезивные свойства токсигенных штаммов *C. diphtheriae* (табл. 4.1.6) никакого изменения адгезивности не обнаружено ни у одного из исследованных штаммов коринебактерий.

При проведении электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях (рис. 4.1.1.) исследованные образцы сыворотки крови сравнивали с молекулярными массами стандартных белков в диапазоне от 10 до 170 кДа. Обнаружено, что в зоне 26-43 кДа и 72-170 кДа интенсивность белковых пятен наиболее выражена в образцах сыворотки крови бактерионосителей по сравнению с другими контингентами обследованных. В диапазоне 20-10000 Да определяли сывороточные белки с помощью масс-спектрометрического метода (MALDI-TOF MS). Последовательность белков на 97-100 % соответствовала референсной. Кластерный анализ исследованных образцов сыворотки крови показал следующее (рис. 4.1.2.). Первую агломерацию образовал кластер, состоящий из показателя S1 - сыворотка крови больных дифтерией ротоглотки токсической и S2 - сыворотка крови больных дифтерией ротоглотки локализованной. К данному кластеру на втором шаге кластеризации присоединился показатель S4 - сыворотка крови привитых АКДС- и АДС-М-препаратами, на третьем - показатель S3 - сыворотка крови бактерионосителей. На последнем шаге кластеризации присоединился показатель S5 - сыворотка крови здоровых, не привитых АКДС- и АДС-М-препаратами. При идентификации белков сыворотки крови обследованных контингентов (Табл. 4.1.7) обнаружено, что в образцах сыворотки крови бактерионосителей более широко представлен спектр сывороточных белков,

Таблица 4.1.5. – Влияние препарата лактоферрина на адгезивные свойства планктонных и биопленочных культур штаммов *C. diphtheriae* (КОЕ/мл)

Штаммы	планктонная		120-час. биопленочная		720-час. биопленочная	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
<i>C. diphtheriae gravis</i> <i>tox+</i> (циркулирующий)	22,6±0,6	0	23,0±1,0	0	23,6±0,57	0
<i>C. diphtheriae gravis</i> <i>tox+</i> №665	15,3±1,0	0	14,6±0,57	0	15,0±1,0	0
<i>C. diphtheriae gravis</i> <i>tox+</i> №6765	3,3±0,7	0	10,3±0,57	0	3,3±0,75	0
<i>C. diphtheriae mitis</i> <i>tox+</i> №269	17,6±0,6	0	18,0±1,0	0	17,6±0,57	0
<i>C. diphtheriae gravis</i> (с «молчащим» <i>tox</i> - геном)	20,0±1,0	0	22,0±1,0	0	20,0±1,0	0

Таблица 4.1.6. - Влияние антитоксина диагностического дифтерийного на адгезивные свойства планктонных и биопленочных культур штаммов *C. diphtheriae* (КОЕ/мл±m)

Штаммы	Планктонная		120-час. биопленочная		720-час. биопленочная	
	Контроль	5 МЕ/мл	Контроль	5 МЕ/мл	Контроль	5 МЕ/мл
<i>C. diphtheriae</i> <i>gravis tox</i> ⁺ (циркулирующий)	26,6±2,1	27,6±1,5	23,0±1,0	23,0±1,0	25,6±0,6	22,3±0,6
<i>C. diphtheriae</i> <i>gravis tox</i> ⁺ № 665	19,0±1,0	21,6±0,6	14,6±0,6	14,3±0,6	17,2±0,4	13,0±0,6
<i>C. diphtheriae</i> <i>gravis tox</i> ⁺ № 6765	3,3±0,6	6,3±0,6	10,3±0,6	10,6±1,1	5,0±0,8	3,0±0,1
<i>C. diphtheriae mitis</i> <i>tox</i> ⁺ № 269	19,0±1,0	19,0±1,0	18,0±1,0	16,3±1,2	23,6±0,6	19,0±0,8
<i>C. diphtheriae</i> (с «молчащим» <i>tox</i> -геном)	25,0±1,0	24,3±1,5	22,0±1,0	21,0±1,0	19,2±0,5	15,3±0,6

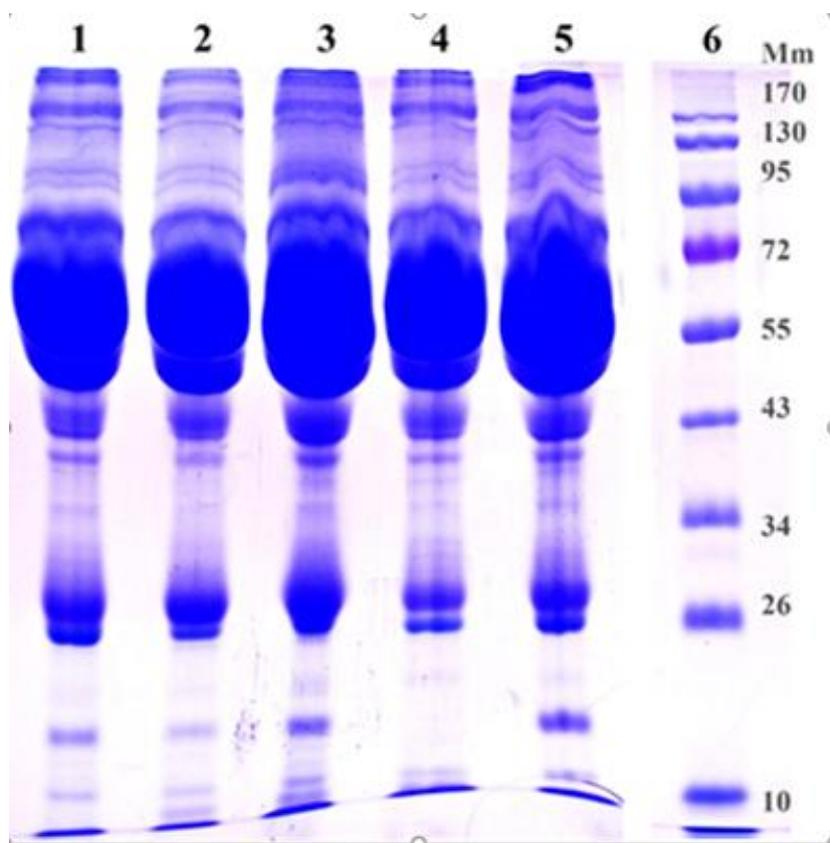


Рис. 4.1.1. – Электрофоретическое исследование в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях образцов сыворотки крови (разведение 1:3) различных контингентов обследованных (1 – дифтерия ротоглотки токсическая; 2 – дифтерия ротоглотки локализованная; 3 – бактерионосители; 4 – привитые АКДС- и АДС-М-препаратами; 5 – непривитые АКДС- и АДС-М-препаратами, 6 – стандартные белки)

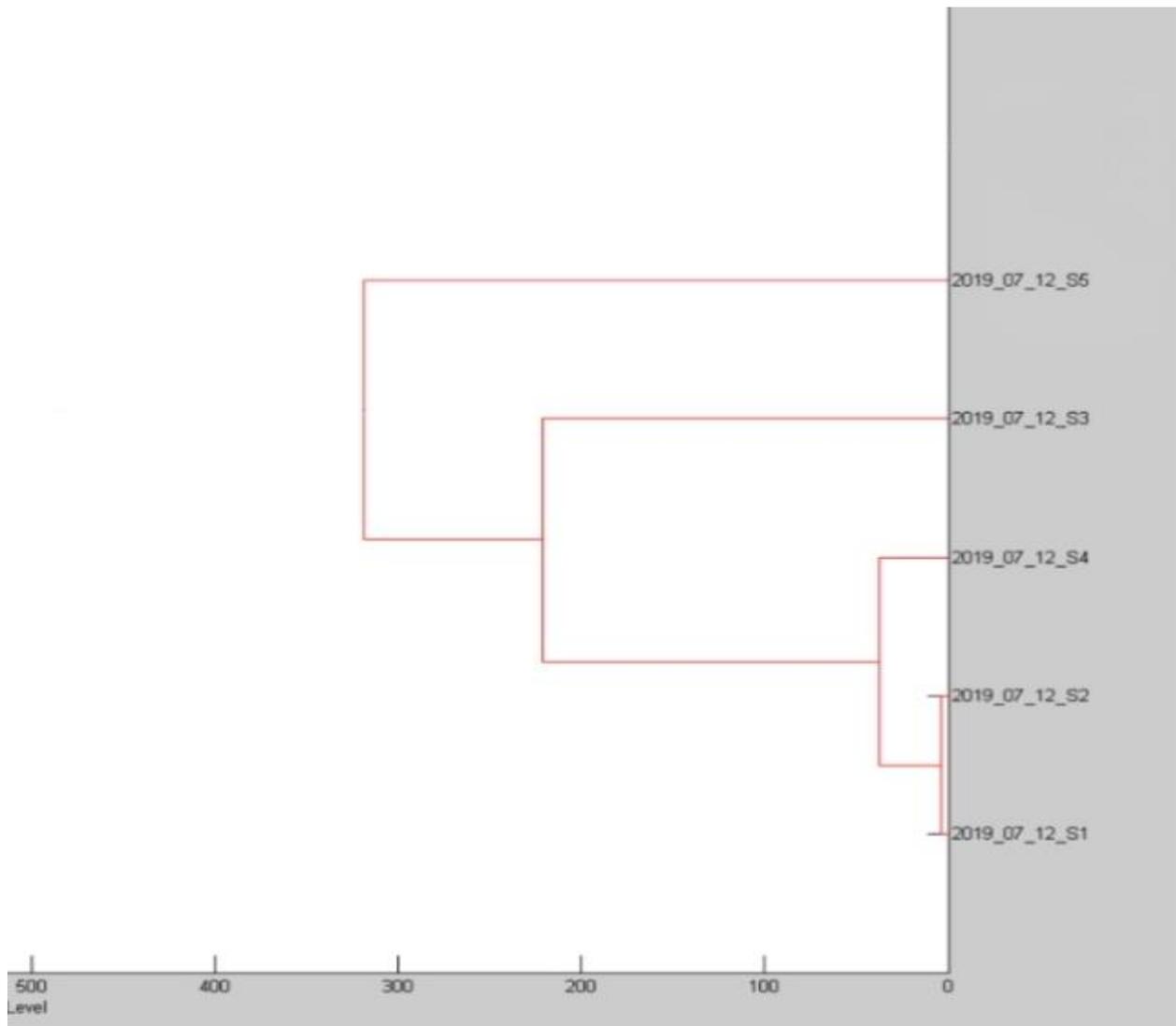


Рис. 4.1.2. - Дендрограмма масс-спектрометрического анализа образцов сыворотки крови различных контингентов обследованных (S1 – дифтерия ротоглотки токсическая; S2 – дифтерия ротоглотки локализованная; S3 – бактерионосители; S4 – привитые АКДС- и АДС-М-препаратами; S5 – непривитые АКДС- и АДС-М-препаратами)

Таблица 4.1.7. - Спектр белков сыворотки крови различных контингентов обследованных, идентифицированных MALDI-ToF-MS

Международное название белка	Молекулярная масса, Да	Score				
		ДТ	ДЛ	БН	П	НП
Humanin-like protein						
HMN1_HUMAN	2689	-	-	6	-	-
HMN2_HUMAN	3079	12	8	3	-	-
HMN3_HUMAN	2795	-	-	-	-	-
HMN4_HUMAN	3245	-	-	5	6	-
HMN5_HUMAN	2664	-	-	5	4	-
HMN6_HUMAN	2717	-	-	-	-	-
HMN8_HUMAN	2659	-	-	3	-	-
HMN10_HUMAN	2805	-	1	5	-	-
Всего обнаружено:		1	2	6	2	-
Beta-defensin						
DB134_HUMAN	7547	-	-	8	8	-
DB124_HUMAN	8053	-	13	8	-	-
D108C_HUMAN	8348	-	11	-	-	-
Putative beta-defensin 108A D108A_HUMAN	8384	-	13	-	-	-
Всего обнаружено:		-	3	2	1	-
Metallothionein						
MT1A_HUMAN	6115	20	14	5	12	13
MT1B_HUMAN	6110	-	-	7	12	18
MT1X_HUMAN	6009	12	-	13	8	11
MT1F_HUMAN	6081	-	13	12	7	29
MT1G_HUMAN	6135	-	-	10	-	-
MT1G_HUMAN	6136	-	-	4	7	19
MT1H_HUMAN	6034	8	-	-	10	10
M1BL1_HUMAN	6089	9	-	4	12	12
MT1L_HUMAN	6057	19	-	11	8	14
MT1H_HUMAN	6105	15	-	4	11	9
MT1X_HUMAN	6063	12	-	6	9	10
MT2_HUMAN	6037	10	14	9	6	12
MT3_HUMAN	6921	6	-	8	11	21
MT4_HUMAN	6503	13	12	7	12	18
Putative MT1DP_HUMAN	4979	22	10	26	5	16
Всего обнаружено:		11	5	14	14	14
IgA-inducing protein homolog IGIP_HUMAN	5933	-	-	6	-	-

Условные обозначения:

БН – бактерионосители, ДТ – дифтерия ротоглотки токсическая, ДЛ – дифтерия ротоглотки локализованная, П – привитые АКДС и АДС-М препаратами, НП – непривитые АКДС и АДС-М препаратами

обладающих способностью ингибировать апоптоз (Humanin-like protein) и связывать тяжелые металлы (Metallothionein), в том числе и железо.

4.2. Азоксимера бромид

Появление штаммов коринебактерий, обладающих резистентностью к антибактериальным препаратам [5, 36], диктует необходимость поиска новых средств, препятствующих циркуляции *C. diphtheriae* в популяции и, в частности, в организме бактерионосителей. Одним из таких средств может явиться антиадгезивная терапия, направленная на прерывание инфекционного процесса на начальном этапе вплоть до его прекращения за счет блокады адгезии и, как следствие, колонизации бактерий на слизистой оболочке входных ворот инфекции. 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 (АЗБ), обладающий разнообразной фармакологической активностью, в том числе, иммуномодулирующей, мембранопротекторной, детоксицирующей, антиоксидантной [37, 38]. Помимо этого известно, что АЗБ подавляет адгезию как токсигенных, так и нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae* к эритроцитам человека 0(I) группы крови [34]. Однако, учитывая, что при дифтерийном бактерионосительстве возбудитель локализуется и формирует биопленку на эпителии верхних дыхательных путей, представляло интерес выяснить, блокирует ли АЗБ адгезию как планктонных, так и биопленочных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae* к этим клеткам.

При исследовании воздействия АЗБ на адгезивные свойства штаммов токсигенных коринебактерий (табл. 4.2.1.) установлено, что при использовании его в концентрации 300 мг/л экспозиции воздействия 2 ч статистически значимого снижения адгезивных свойств обнаружено не было. В то же время при 8-ми ч

экспозиции под влиянием АЗБ адгезивность штаммов коринебактерий снижалась в десятки раз, при 18-ти ч – в сотни.

Таблица 4.2.1. - Показатели адгезии штаммов *C. diphtheriae* при воздействии азоксимера бромида

Параметры воздействия азоксимера бромида		Исследованные штаммы				
Концентрация (мг/л)	Экспозиция (ч)	<i>C. diphtheriae gravis tox+</i> (циркулирующих)	<i>C. diphtheriae gravis tox+</i> № 665	<i>C. diphtheriae gravis tox+</i> № 6765	<i>C. diphtheriae gravis tox+</i> («с молчащим <i>tox</i> -геном»)	<i>C. diphtheriae mitis tox+</i> №269
0	2	26,0±0,01	13,0±0,01	3,0±0,003	20,0±0,01	17,0±0,01
	8	3330,0±3,3*	2680,0±0,4*	2020,0±2,9*	1450,0±0,1*	1802,0±0,04*
	18	19330,0±3,3*	11330,0±3,3*	6000,0±5,8*	2770,0±0,3*	1890,0±0,3*
300	2	20,0±1,6	11,0±0,6	3,0±1,0	17,0±1,6	15,0±2,6
	8	53,6±2,5*	31,0±1,0*	31,0±1,0*	15,6±0,6	16,0±1,0
	18	13,3±1,5*	8,3±1,2*	8,3±1,2*	8,6±2,1*	9,6±1,2*
600	2	9,0±1,0	5,0±1,2	1,0±0,6	7,0±1,0	11,0±1,2
	8	25,0±1,0*	10,3±1,2*	5,3±1,5*	2,3±1,2*	4,6±1,2*
	18	0,7±1,2*	0,7±0,6*	0,3±0,6	0,7±0,6*	0,3±0,6*
1200	2	1,0±0,6	0	0	1,0±0,06	1,0±0,6
	8	1,0±0,6	0,3±0,6	0,7±0,6	0,7±0,6	0,3±0,6
	18	0	0	0	0	0

Примечание: показатели адгезии штаммов *C. diphtheriae* выражали в (КОЕ±m)

* - достоверность отличий ($p \leq 0,05$) между экспозициями 2 и 8 ч, 2 и 18 ч для каждого штамма

При исследовании антиадгезивной активности АЗБ в концентрации 600 мг/л наблюдали снижение адгезивных свойств коринебактерий в зависимости от временной экспозиции в сотни (8 ч) и тысячи (18 ч) раз. При использовании АЗБ в концентрации 1200 мг/л вне зависимости от временной экспозиции воздействия адгезивность всех исследованных штаммов коринебактерий снижалась фактически до нуля. Полученные данные показали, что антиадгезивный эффект АЗБ имел четкую зависимость от дозы препарата и экспозиции его воздействия.

Рассматривая эффект АЗБ на различные штаммы токсигенных коринебактерий, выявлено, что наиболее интенсивное снижение адгезивности к 8-му ч культивирования наблюдали у штаммов *C. diphtheriae mitis tox⁺* № 269 и *C. diphtheriae gravis* (с «молчащим» *tox*-геном), к 18-му ч - у штаммов *C. diphtheriae gravis tox⁺* (циркулирующий), *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665 и *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 6765.

При исследовании динамики адгезивной активности обнаружены ее существенные отличия у исходных штаммов коринебактерий и подвергшихся воздействию АЗБ. Так для всех исследованных исходных штаммов коринебактерий характерно постепенное нарастание ($p \leq 0,05$) адгезивности с увеличением времени культивирования, наиболее выраженное к 18-му ч. При воздействии АЗБ на штаммы *C. diphtheriae gravis tox⁺* (циркулирующий), *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665, *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 6765 их адгезивные свойства увеличивались ($p \leq 0,05$) к 8-му ч культивирования, а к 18-му ч - резко снижались ($p \leq 0,05$). В то же время адгезивные свойства штаммов *C. diphtheriae mitis tox⁺* № 269 и *C. diphtheriae gravis* (с «молчащим» *tox*-геном) к 8-му ч культивирования оставались неизменными (при дозе АЗБ 300 мг/л) или снижались ($p \leq 0,05$) (при дозе АЗБ 600 мг/л), а к 18 ч - значительно снижались ($p \leq 0,05$).

Далее провели сравнительное исследование эффективности воздействия АЗБ на планктонные и биопленочные культуры коринебактерий. При исследовании воздействия АЗБ на коринебактерии (табл. 4.2.2., рис. 4.2.1., 4.2.2.) в концентрации 1200 мг/л установили резкое, почти полное снижение адгезивных

Таблица 4.2.2. – Показатели адгезии штаммов *C. diphtheriae* при воздействии азоксимера бромида (1200 мг/л)

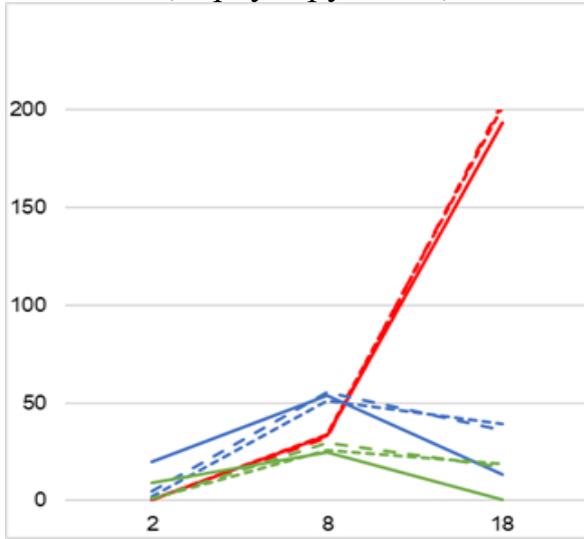
Штаммы	Планктонные культуры			120-час. биопленочные культуры			720-час. биопленочные культуры		
	2 ч	8 ч	18 ч	2 ч	8 ч	18 ч	2 ч	8 ч	18 ч
<i>C. diphtheriae gravis</i> <i>tox+</i> (циркулирующий)	1,0±0,6	1,0±0,6	0	0	1,6±0,05	3,6±0,6	0	2,0±1,0**	6,0±1,0**
<i>C. diphtheriae gravis</i> <i>tox+</i> №665	0	0,3±0,6	0	0	0,6±0,6	0,3±0,6	0	1,0±0,6	1,0±0,6
<i>C. diphtheriae gravis</i> <i>tox+</i> №6765	0	0,7±0,6	0	0	1,6±0,6	0,3±0,6	0	2,0±1,2	1,0±0,6
<i>C. diphtheriae gravis</i> <i>tox+</i> (с «молчащим» <i>tox</i> -геном)	1,0±0,06	0,7±0,6	0	0	0,3±0,6	0,3±0,6	0	1,0±0,6	1,0±0,6
<i>C. diphtheriae mitis</i> <i>tox+</i> №269	1,0±0,6	0,3±0,6	0	0	0,3±0,6	0,3±0,6	0	1,0±0,6	1,0±0,6

Показатели адгезии штаммов *C. diphtheriae* выражали в (КОЕ±m), п. 2.3.6.1

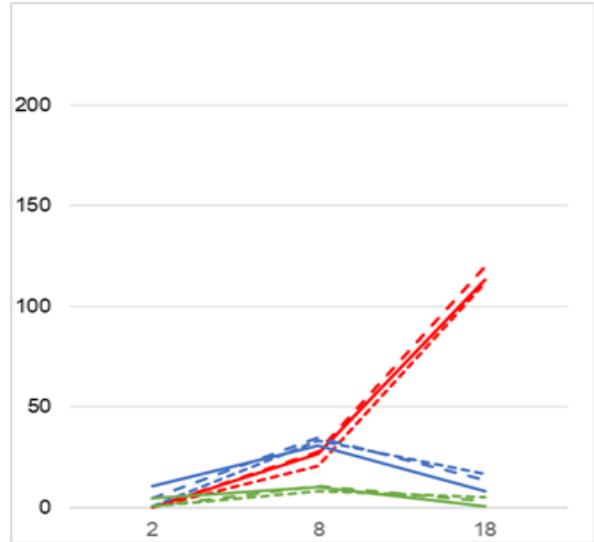
*- достоверность отличий ($p \leq 0,05$) между планктонной и биопленочными культурами внутри каждой временной экспозиции

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

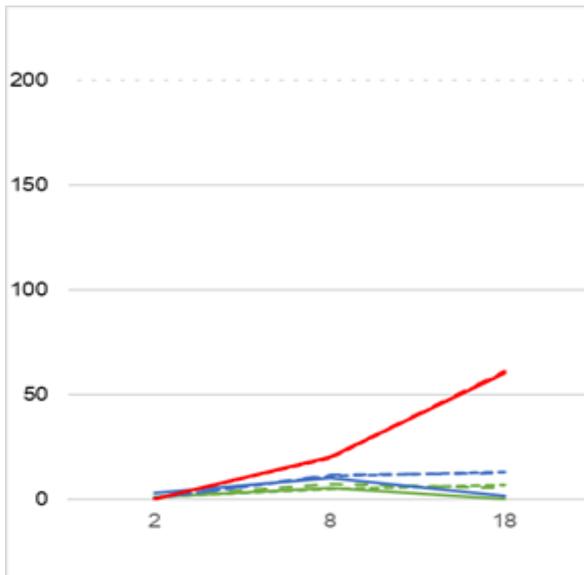
C. diphtheriae gravis tox+
(циркулирующий)



C. diphtheriae gravis tox+ № 665



C. diphtheriae gravis tox+ № 6765



Условные обозначения:

Планктонная культура

- без азоксимера бромид
- 300 мг/л азоксимера бромид
- 600 мг/л азоксимера бромид

120-час. биопленочная

- - - без азоксимера бромид
- - - 300 мг/л азоксимера бромид
- - - 600 мг/л азоксимера бромид

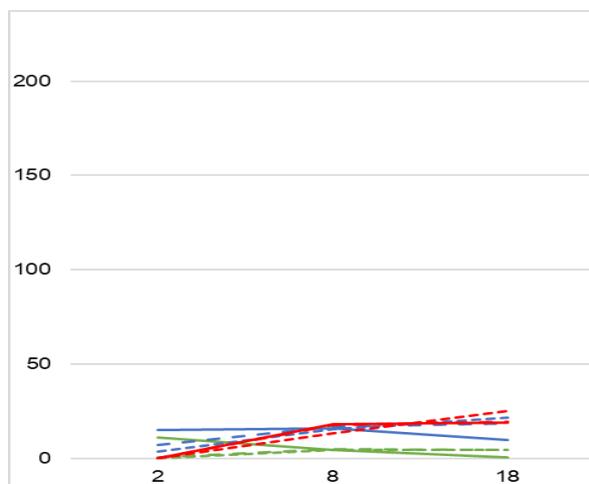
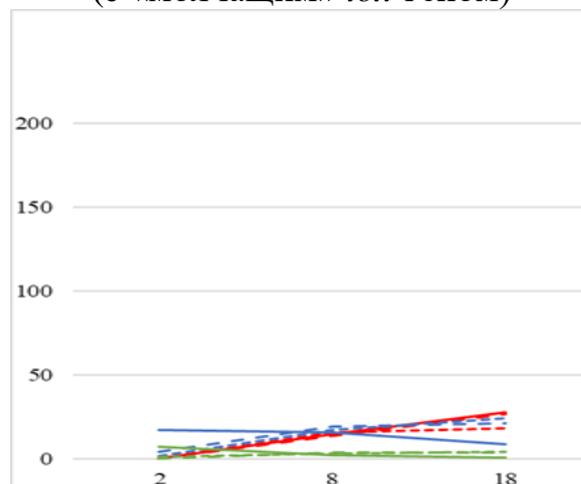
720-час. биопленочная

- · · без азоксимера бромид
- · · 300 мг/л азоксимера бромид
- · · 600 мг/л азоксимера бромид

по оси ординат – КОЕ/мл,

по оси абсцисс – экспозиция (ч)

Рис. 4.2.1. - Влияние азоксимера бромид на адгезивную активность планктонных и биопленочных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae*

C. diphtheriae mitis tox+ № 269*C. diphtheriae gravis*
(с «молчащим» *tox*-геном)

Условные обозначения:

Планктонная культура

— без азоксимера бромид
— 300 мг/л азоксимера бромид
— 600 мг/л азоксимера бромид

120-час. биопленочная

- - без азоксимера бромид
- - 300 мг/л азоксимера бромид
- - 600 мг/л азоксимера бромид

720-час. биопленочная

- - - без азоксимера бромид
- - - 300 мг/л азоксимера бромид
- - - 600 мг/л азоксимера бромид

по оси ординат – КОЕ/мл,
по оси абсцисс – экспозиция (ч)

Рис. 4.2.2. - Влияние азоксимера бромид на адгезивную активность планктонных и биопленочных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae*

свойств как планктонных, так и биопленочных культур всех исследованных штаммов *C. diphtheriae*. Так, адгезивность планктонных культур коринебактерий после 2-го и 8-го ч культивирования находилась в пределах 0-1,0 КОЕ/мл, тогда как к 18-му ч культивирования блокировалась полностью. Воздействие АЗБ на биопленочные культуры *C. diphtheriae* также приводило к резкому угнетению адгезии, но характеризовалось несколько иной динамикой этого процесса. Биопленочные (120- и 720-часовые) культуры всех исследованных штаммов

C. diphtheriae полностью утрачивали свою адгезивную активность под воздействием АЗБ при 2-х ч экспозиции культивирования. Однако при 8- и 18-ти ч экспозиции незначительную способность прикрепляться к клеткам Нер-2 наблюдали у всех взятых в исследование штаммов коринебактерий. При этом незначительное, хоть и достоверное ($p \leq 0,05$) увеличение адгезивности в динамике культивирования обнаружили только у 720-часовой биопленочной культуры циркулирующего в популяции штамма *C. diphtheriae* (до $2,0 \pm 1,0$ и $6,0 \pm 1,0$ к 8- и 18-му ч соответственно).

При воздействии на коринебактерии АЗБ в концентрации 600 мг/л установлен его выраженный антиадгезивный эффект на все исследованные штаммы коринебактерий: обнаружено снижение адгезивных свойств коринебактерий в 17 – 687 раз. При сравнительном исследовании антиадгезивного эффекта АЗБ на планктонные и биопленочные культуры коринебактерий (табл. 4.2.3., рис. 4.2.1., 4.2.2.) установлено, что адгезивные свойства 120- и 720-часовых биопленочных культур всех исследованных штаммов *C. diphtheriae* при 2-х ч экспозиции находились в пределах от 0 до $1,3 \pm 0,6$ КОЕ/мл и были ниже ($p \leq 0,05$) таковых по сравнению с планктонными культурами этих же штаммов ($1,0 \pm 0,6$ - $11,0 \pm 1,2$ КОЕ/мл). Исключение составил штамм *C. diphtheriae gravis tox⁺* №6765, у планктонных и биопленочных культур которого адгезивность не отличалась. Статистически достоверных отличий между адгезивными свойствами планктонных и биопленочных культур исследованных штаммов при экспозиции 8 ч не обнаружено, за исключением 120-часовой биопленочной культуры штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* (циркулирующий), у которого адгезивность превышала ($p \leq 0,05$) таковую планктонной культуры. Однако к 18-му ч культивирования адгезивность 120- и 720-часовых биопленочных культур была выше ($p \leq 0,05$), чем у планктонных культур всех исследованных штаммов *C. diphtheriae* в 12-24 и 14-27 раз соответственно.

Таблица 4.2.3. - Показатели адгезии штаммов *C. diphtheriae* при воздействии азоксимера бромиды (600 мг/л)

Штаммы	Планктонные культуры			120-час. биопленочные культуры			720-час. биопленочные культуры		
	2 ч	8 ч	18 ч	2 ч	8 ч	18 ч	2 ч	8 ч	18 ч
<i>C. diphtheriae</i> <i>gravis tox+</i> (циркулирующий)	9,0±1,0*	25,0±1,0**,**	0,7±1,2**,**	1,3±0,6*	29,6±2,5**,**	17,0±2,0**,**	1,0±0,1*	26,0±1,0**	18,6±1,5**,**
<i>C. diphtheriae</i> <i>gravis tox+</i> №665	5,0±1,2*	10,3±1,2**	0,7±0,6**,**	0,7±0,6*	10,6±1,2**	3,3±0,6**,**	1,0±0,6*	8,3±1,5**	5,3±0,6**,**
<i>C. diphtheriae</i> <i>gravis tox+</i> №6765	1,0±0,6	5,3±1,5**,**	0,3±0,6*	1,3±0,6	7,3±0,6**,**	5,3±2,0**,**	1,0±0,6	5,0±1,0**	7,0±1,0**,**
<i>C. diphtheriae</i> <i>gravis tox+</i> (с «молчащим» <i>tox</i> - геном)	7,0±1,0*	2,3±1,2**	0,7±0,6**,**	0,3±0,6*	3,7±0,6**	3,7±1,2**	1,0±0,6*	3,3±1,2**	4,3±0,6**,**
<i>C. diphtheriae mitis</i> <i>tox+</i> №269	11,0±1,2*	4,6±1,2**	0,3±0,6**,**	0,7±0,6*	5,0±1,0**	4,6±0,6**	0	4,3±0,6	4,6±1,2*

Показатели адгезии штаммов *C. diphtheriae* выражали в (КОЕ±m)

*- достоверность отличий ($p \leq 0,05$) между планктонной 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 биопленочных)

При динамическом исследовании адгезивная активность планктонных культур всех взятых в исследование штаммов коринебактерий увеличивалась к 8-му ч ($p \leq 0,05$) и снижалась ($p \leq 0,05$) к 18-му ч культивирования. В то же время при исследовании биопленочных культур такая динамика была характерна только для циркулирующего в популяции штамма *C. diphtheriae* и музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox+* №665. У остальных штаммов коринебактерий адгезивность постепенно нарастала в динамике культивирования.

Выраженный антиадгезивный эффект АЗБ на коринебактерии обнаружен и при использовании его в концентрации 300 мг/л. Так, у всех исследованных планктонных и биопленочных культур штаммов коринебактерий адгезивность снижалась в 7 – 365 раз. При сравнительном анализе адгезивности планктонных и биопленочных культур коринебактерий под воздействием АЗБ обнаружены следующие закономерности. Установлено (табл. 4.2.4., рис. 4.2.1., 4.2.2.), что при экспозиции 2 ч адгезивность как 120-, так и 720-часовых биопленочных культур всех исследованных штаммов *C. diphtheriae* коринебактерий достоверно ($p \leq 0,05$) ниже, чем планктонных культур этих же штаммов. При 8-ми ч экспозиции у планктонных и биопленочных культур всех исследованных штаммов коринебактерий адгезивность не отличалась. При экспозиции 18 ч адгезивные свойства всех 120- и 720-часовых биопленочных культур коринебактерий были достоверно ($p \leq 0,05$) выше, чем планктонных культур этих же штаммов. При изучении адгезивной активности в динамике культивирования установлено, что у планктонных культур всех взятых в исследование штаммов коринебактерий, за исключением штамма *C. diphtheriae gravis tox+* (с «молчащим» геном) и *C. diphtheriae mitis tox+* № 269, она увеличивалась к 8-му ч ($p \leq 0,05$) и снижалась ($p \leq 0,05$) к 18-му ч культивирования. При исследовании биопленочных культур аналогичные результаты были получены только в отношении циркулирующего в популяции штамма *C. diphtheriae* и музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox+* № 665. У других штаммов коринебактерий, взятых в исследование, адгезивность постепенно увеличивалась в динамике культивирования.

Таблица 4.2.4. - Показатели адгезии штаммов *C. diphtheriae* при воздействии азоксимера бромида (300 мг/л)

Штаммы	Планктонные культуры			120-час. биопленочные культуры			720-час. биопленочные культуры		
	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)	20,0±1,6*	53,6±2,5*,**	13,3±1,5*,**	5,0±2,0*	55,6±2,1**	36,3±2,1*,**	2,0±2,0*	51,0±2,6*,**	39,4±2,1*,**
<i>C. diphtheriae gravis</i> <i>tox+</i> №665	11,0±0,6*	31,0±1,0*,**	8,3±1,2*,**	5,0±1,0*	35,0±2,0*,**	13,6±3,1*,**	0,7±0,6*	33,6±2,5**	16,6±2,1*,**
<i>C. diphtheriae gravis</i> <i>tox+</i> №6765	3,0±1,0*	10,3±1,2**	1,6±1,2*,**	0,7±0,6*	11,6±1,2**	12,6±2,1*,**	0,7±0,6*	11,0±1,0**	13,0±3,0*,**
<i>C. diphtheriae gravis</i> <i>tox+</i> (с «молчащим» <i>tox</i> -геном)	17,0±1,6*	15,6±0,6*	8,6±2,1*,**	4,0±1,0*	19,0±2,0*,**	21,3±2,5*,**	1,7±1,5*	17,3±2,5**	24,3±2,1*,**
<i>C. diphtheriae mitis</i> <i>tox+</i> №269	15,0±2,6*	16,0±1,0	9,6±1,2*,**	7,0±1,0*	16,6±1,2**	18,6±2,5*,**	3,6±2,1*	15,3±2,1**	21,6±2,1*,**

Показатели адгезии штаммов *C. diphtheriae* выражали в (КОЕ±m) x10²

*- достоверность отличий (p≤0,05) между планктонной и биопленочными культурами внутри каждой временной экспозиции

** - достоверность отличий (p≤0,05) между экспозициями 2 ч и 8 ч, 2 ч и 18 ч для каждой культуры (планктонной и биопленочных)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возбудитель дифтерии при попадании в восприимчивый организм адаптируется к воздействию факторов врожденного и адаптивного иммунитета, повышая адгезивность и формируя биопленку. Под воздействием факторов врожденного и адаптивного иммунитета у больных с манифестированными формами дифтерии адгезивная активность токсигенных штаммов *C. diphtheriae* понижается, что не приводит к формированию биопленки и не препятствует выделению токсина. У бактерионосителей на фоне низкого содержания антибактериальных антител, высокого уровня антитоксических антител и лактоферрина, 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, что предрасполагает к формированию биопленки, понижению выделения токсина за ее пределы и, как следствие, длительной персистенции в организме.

Препарат АЗБ способствует подавлению адгезии как планктонных, так и биопленочных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae*. Антиадгезивное воздействие препарата АЗБ более выражено по отношению к планктонным культурам токсигенных штаммов *C. diphtheriae*, чем биопленочным и зависит от дозы препарата и экспозиции его воздействия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время благодаря проводимой вакцинопрофилактике дифтерия является редким заболеванием в России и других развитых странах [17]. Главным фактором патогенности *C. diphtheriae* является дифтерийный экзотоксин. Однако растущее число заболеваний, связанных с нетоксигенными штаммами *C. diphtheriae* в странах с низкой распространенностью дифтерии, указывает на роль в формировании патологического процесса иных факторов патогенности, помимо дифтерийного экзотоксина [180].

Начальным этапом развития дифтерийной инфекции является адгезия, которая необходима для размножения возбудителя и дальнейшей колонизации слизистой оболочки зева [16]. Для определения адгезивной активности исследованных штаммов *C. diphtheriae* использовали культуру клеток карциномы фарингеального эпителия Нер-2, не чувствительную к действию экзотоксина. Установлено, что в динамике исследования 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-го ($13,03 \pm 0,1 - 34,12 \pm 0,1$ КОЕ/мл) и 18-го ($18,9 \pm 0,03 - 203,3 \pm 3,3$ КОЕ/мл). 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 [133, 178, 180]. 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 процессы инвазии к 18 ч культивирования в культуре клеток Нер-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. При исследовании 120-часовых биопленочных культур штаммов коринебактерий обнаружили аналогичные результаты. 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 2-х ч экспозиции культивирования ($0,01 \pm 0,01$ - $0,25 \pm 0,002$ КОЕ/мл), незначительным увеличением к 8-му ч культивирования ($0,35 \pm 0,01$ - $5,62 \pm 0,47$ КОЕ/мл) и снижением к 18-му ч (0 - $3,54 \pm 0,07$ КОЕ/мл). Наиболее выраженный адгезивно-инвазивный потенциал обнаружен у циркулирующего среди населения токсигенного штамма *C. diphtheriae*. Это дает основание предположить, что на ранних стадиях инфекционного процесса 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. Причем самое 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 инфекционного процесса возбудитель, адаптировавшись, выходит из эпителиальных клеток и формирует биопленку. Межмикробный матрикс биопленки коринебактерий имеет, преимущественно, белковую природу [33], что может быть обусловлено участием в его формировании адгезинов белковой природы.

Следует отметить, что способностью к адгезии и инвазии обладали и

штаммы *C. pseudodiphtheriticum*. Штаммы недифтерийных коринебактерий, несмотря на отсутствие способности продуцировать токсин, могут быть связаны с развитием воспалительных заболеваний респираторного и урогенитального тракта, кожи, гнойно-септических процессов различной локализации и др. [169]. Установлено, что штаммы *C. pseudodiphtheriticum*, выделенные от обследованных с патологией респираторного тракта, обладали более высокой адгезивной активностью по сравнению с таковыми, выделенными от практически здоровых лиц. Исследованные штаммы *C. pseudodiphtheriticum*, помимо выраженной адгезивной активности, обладали и способностью к инвазии, что представлено на электронограмме, где отчетливо видна электронно-прозрачная клетка коринебактерий, внедрившаяся в цитоплазму клеток 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 создаёт этим микроорганизмам определённые преимущества, позволяя избежать защитного действия иммунной системы организма, а также антибактериальных препаратов.

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 цитопатический эффект на клетки СНО-К1 оказывали как токсигенные штаммы *C. diphtheriae*, так и штамм *C. diphtheriae* с «молчащим» тох-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.

Обращает на себя внимание факт обнаружения существенных различий характера ЦПД различных культур и штаммов коринебактерий. 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 их истончение и удлинение. Данный факт свидетельствовал о снижении интенсивности выделения дифтерийного токсина штаммами *C. diphtheriae* в составе биопленки по сравнению с планктонными культурами. Это может 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. 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, позволяющих полностью нейтрализовать 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 [179]. 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* адгезивная активность их планктонных культур увеличивалась ($p \geq 0,05$) в 1,3-2 раза, а биопленочных – понижалась ($p \geq 0,05$). В то же 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 [12]. 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 [32] 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 ($p \leq 0,05$) по сравнению с больными манифестированной формой дифтерии. В свою очередь известно, что антимикробные пептиды могут выступать в роли адъювантов, стимулируя адаптивный иммунный ответ [40], 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 [97].

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 ($p \leq 0,05$) 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, где видно, что наибольшим сходством 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 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 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 [51, 81, 94, 141, 160]. 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 [19]. 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. [103, 104]. 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 нами штаммов возбудителя дифтерии. По нашим данным 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.

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 менее эффективно действует 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 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: заведующей лабораторией гибридом, главному научному сотруднику д.б.н., профессору Л.П. Алексеевой и ведущему научному сотруднику, заведующей музея живых культур с центром патогенных для человека вибрионов к.б.н. О.С. Чемисовой.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ

CdiLAM	липоарабиноманнан
CHO-K1	клетки яичников китайского хомячка
DIP	поверхностный белок
FAS	фермент синтеза жирных кислот
FimH	фимбриальный антиген
Her-2	клетки карциномы фарингеального эпителия
Ig	иммуноглобулин
Lf	концентрация токсина/анатоксина в растворе
MAM	мультивалентная адгезивная молекула

SA	белковый стрептококковый антиген
Spa	тип фимбрий коринебактерий
TLR	толл-подобные рецепторы
АТФ	аденозинтрифосфат
АЗБ	азоксимера бромид
АДС-М	адсорбированный дифтерийно-столбнячный анатоксин с уменьшенным содержанием антигена
АКДС	адсорбированная коклюшно-дифтерийно-столбнячная вакцина
БН	бактерионосители
ГСЛ	гликосфинголипид
ДСН	додецилсульфат натрия
ДЛ	дифтерия ротоглотки локализованная
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ДТ	дифтерия ротоглотки токсическая
КОЕ	колониеобразующая единица
МЕ	международные единицы
МПК	минимальная подавляющая концентрация
НП	непривитые АКДС- и АДС-М-препаратами
П	привитые АКДС- и АДС-М-препаратами
ПААГ	полиакриламидный гель
ИФА	иммуноферментный анализ
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ЦПД	цитопатическое действие
ЦПМ	цитоплазматическая мембрана

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексахин, С.В. Прикладной статистический анализ / С.В. Алексахин, А.В. Бадлин, А.Б. Николаев, В.Ю. Строганов. - М.: ПРИОР, 2001. - 224 с.
2. Беляева, Н.М. Дифтерия / Н.М. Беляева, М.Х. Турьянов, И.П. Трякина, В.Г. Жуховицкий; Рос. мед. акад. последиплом. образования МЗ РФ. - Москва; Санкт-Петербург: Нестор-История. - 2012. – 268 с.
3. Брилис, В.И. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов / В.И. Брилис, Т.А. Брилине, Х.П. Ленцнер // Лабораторное дело. – 1986. - № 4. – С. 210-212.
4. Буреева, Н.Н. Многомерный статистический анализ с использованием ППП «STATISTICA» / Н.Н. Буреева. - Нижний Новгород: Издательство Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, 2007. - 112 с.
5. Воронина, Н.А. Антибиотикорезистентные штаммы недифтерийных коринебактерий, циркулирующие на территории Ростовской области / Н.А. Воронина, Г.Г. Харсеева, О.И. Сылка, Э.О. Мангутов // Проблемы медицинской микологии (приложение). – 2017. – Том 19. - № 2. – С.49.
6. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. - М.: Практика, 1999. - 459 с.
7. Государственная фармакопея Российской Федерации / М.: «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2008. – 704с.
8. Гублер, Е.В. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях / Е.В. Гублер, А.А. Генкин. - Л.: Медицина, 1973. - 141 с.
9. Данченко, Е.О. Оценка цитотоксичности фармацевтических субстанций с использованием клеточных культур / Е.О. Данченко // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2012. – № 2. – С. 22 – 31.

10. Еропкин, М.Ю. Культуры клеток как модельная система исследования токсичности и скрининга цитопротекторных препаратов / М.Ю. Еропкин, Е.М. Еропкина. – СПб. МОРСАР АВ, 2003. – 239 с.
11. Запорожец, Т.С. Ингибирование адгезии *C. diphtheriae* к букальному эпителию человека гликолиз гидролазами из морских гидробионтов / Т.С. Запорожец, И.Д. Макаренкова, И.Ю. Бакунина и др. // Биомедицинская химия. - 2010. - Том 56. - № 3. - С. 350-358.
12. Кветная, А.С. Адаптационные механизмы формирования бактерионосительства *Corynebacterium diphtheriae* / А.С. Кветная, В.В. Иванова, Т.Б. Корженевская // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. –2000. – № 4, Прил. – С. 31-36.
13. Костюкова, Н.Н. Адгезия у *Corynebacterium diphtheriae* / Н.Н. Костюкова, Н.А. Переверзев // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1985. - № 11. - С. 70-72.
14. Костюкова, Н. Н. Адгезия *Corynebacterium diphtheriae* / Н.Н. Костюкова, С.Р. Карась // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1987. – № 5. - С. 72-74.
15. Костюкова, Н. Н. Адгезивная активность дифтерийных штаммов в зависимости от особенностей вызываемого ими инфекционного процесса / Н. Н. Костюкова, Карась С. Р. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1991. - № 11. – С. 24-27.
16. Костюкова, Н. Н. Уроки дифтерии. / Н. Н. Костюкова // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1999. - № 2. – С. 92-96.
17. Костюкова, Н.Н. Дифтерийное бактерионосительство / Н.Н. Костюкова, В.А. Бехало // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2018. – Том 17. - № 5 – С. 60-70.
18. Лабинская, А.С. Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций / под ред. А.С. Лабинской, Н.Н. Костюковой, С.М. Ивановой. – М.: Медицина, 2012. – 1152 с.

19. Лабушкина, А.В. Противодифтерийный иммунитет у детей с аллергическими заболеваниями / А.В. Лабушкина, Г.Г. Харсеева, Е.П. Москаленко // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. – 2009. - №4. – С. 144-148.
20. Лабушкина, А.В. Иммуноферментный метод определения противодифтерийных антибактериальных антител в слюне / А.В. Лабушкина, Г.Г. Харсеева, А.Р. Квасов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2010. - №2. – С. 32-35.
21. Ланкин, Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Ланкин. - М.: Высшая школа, 1990. - 352 с.
22. Мельников, В.Г. Поверхностные структуры грампозитивных бактерий в межклеточном взаимодействии и пленкообразовании. // В.Г. Мельников // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2010. - № 2. – С. 119-123.
23. МР 4.2.00.20-11. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Фенотипическая идентификация бактерий рода *Corynebacterium*. Методические рекомендации; утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 11.05.2011. – М., 2011. – 55 с.
24. МУК 4.2.3065-13. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции: методические указания (утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом РФ Г.Г. Онищенко 14.07.2013г.). – М. - 2013. – 35 с.
25. Николь, Н. Электронные таблицы EXCEL 5.0 / Н. Николь, Р. Альбрехт // Практическое пособие. - М.: Эком, 1996. - 352 с.
26. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений: приказ Министерства Здравоохранения СССР от 22 апреля 1985 г. № 535. – М., 1985. – 125 с.
27. Омельченко, В.П. Медицинская информатика. Руководство к практическим занятиям: учебное пособие. Глава 10. Статистическая обработка результатов

- медико-биологического исследования. Омельченко В.П., Демидова А.А. - М: ГЭОТАР-Медиа, 2017. - С. 324-356.
28. Покровский, В.И. Дифтерия болезнь забытая, но не исчезнувшая / В.И. Покровский, Г.Г. Фокина // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2016. - №4. - С. 4-11.
29. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 21 марта 2014 г. № 252н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям»
30. Салатич, А.И. Статистические методы в здравоохранении и медицине. Методические разработки для учебных ординаторов медицинских институтов / А.И. Салатич. – Ростов н/Д., 1978. - 109 с.
31. Фрешни, Р. Культура животных клеток: практическое руководство / Р. Фрешни. – 5-е изд. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2010. – 714 с.
32. Харсеева, Г.Г. Биологические свойства *Corynebacterium diphtheriae* в составе биопленки / Г.Г. Харсеева, А.Ю. Миронов, Я.Н. Фролова, А.В. Лабушкина // Иммунология, аллергология, инфектология. – 2012. - №4. – С. 88-91.
33. Харсеева, Г.Г. Способность к формированию биопленки возбудителем дифтерии / Харсеева Г. Г., Миронов А. Ю., Фролова Я. Н., Лабушкина А. В. // Клиническая лабораторная диагностика. - 2013. - №2. - С.36-38.
34. Харсеева, Г.Г. Влияние полиоксидония на адгезивные свойства *Corynebacterium diphtheriae* / Г.Г. Харсеева, Е.П. Москаленко, Э.Л. Алутина, А.М. Бревдо // Журн. микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии. – 2009. - № 2. – С. 11-15.
35. Харсеева, Г.Г. Апоптоз макрофагов как один из механизмов патогенного действия возбудителя дифтерии / Г.Г. Харсеева, Э.Л. Алутина, Г.И. Васильева // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2012. - № 5. – С. 63-66.
36. Харсеева, Г.Г. Чувствительность к антибиотикам штаммов *Corynebacterium non diphtheriae*, выделенных в стационарах Ростова-на-Дону и Ростовской области // Г.Г. Харсеева, Н.А. Воронина, Т.Д. Гасретова, С.Ю. Тюкавкина, О.И. Сылка,

- А.Ю. Миронов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2017. – Том 62. - № 8. – С. 502-506.
37. Харит, С.М. Азоксимера бромид – безопасный и эффективный препарат при лечении острых респираторных инфекций верхних дыхательных путей у детей: обзор результатов двойных слепых плацебо-контролируемых рандомизированных клинических исследований I и II фазы / С.М. Харит, А.Н. Галустян // Педиатрия, приложение к журналу *consilium medicum*. – 2017. - № 2. – С. 55-61.
38. Хаитов, Р.М. Современные представления о механизме действия полиоксидония / Р.М. Хаитов, Б.В. Пенегин // Иммунология. – 2005. - № 4. – С. 197-200.
39. Хэй, Р. Сохранение и оценка качества клеток // в кн.: Культура живых клеток. Методы. / Под ред. Фрешни Р. – М.: Мир, 1989. – С. 108 – 166.
40. Чеботарь, И.В. Стратегии выживания бактерий в условиях контакта с антибиотиками / И.В. Чеботарь, Ю.А. Бочарова, А.С. Гурьев, А.Н. Маянский // Клиническая лабораторная диагностика. – 2020. – Том 65. - № 2. – С. – 116-121.
41. Abbot, E.L. Pili mediate specific adhesion of *Streptococcus pyogenes* to human tonsil and skin / E.L. Abbot, W.D. Smith, G.P Siou, C. Chiriboga, R.J. Smith, J.A. Wilson, B.H. Hirst, M.A. Kehoe // *Cell. Microbiol.* – 2007. – Vol. 9. - № 7. – P. 1822-1833.
42. Almant, M. Clustering of *Escherichia coli* type-1 fimbrial adhesins by using multimeric heptyl α -Dmannoside probes with a carbohydrate core / M. Almant, V. Moreau, J. Kovensky, J. Bouckaert, S.G. Gouin // *Chemistry*. – 2011. – Vol. 17. - № 36. – P. 10029-10038.
43. Almant, M. *Escherichia coli* type-1 fimbrial adhesins by using multimeric heptyl α -Dmannoside probes with a carbohydrate core / M. Almant, V. Moreau, J. Kovensky, J. Bouckaert, S.G. Gouin, // *Clustering of Chemistry*. – 2011. - Vol. 36. - № 17. - P.10029-10038.
44. Alteri, C.J. *Mycobacterium tuberculosis* produces pili during human infection / C.J. Alteri, J. Xicohténcatl-Cortes, S. Hess, G. Caballero-Olín, J.A. Girón, R.L. Friedman. J. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2007. – Vol. 104. - № 12. - P. 5145-5150.

45. Anantharaman, V. Evolutionary history, structural features and biochemical diversity of the NlpC/P60 superfamily of enzymes / V. Anantharaman, L. Aravind // *Genome Biology*. – 2003. – Vol. 4 - № 2 - P. 11-15.
46. Anderson, B.N. Weak rolling adhesion enhances bacterial surface colonization. / B.N. Anderson, A.M. Ding, L.M. Nilsson, K. Kusuma, V. Tchesnokova, V. Vogel, [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2007. - № 189. – P. 1794-1802.
47. Antunes, C. A. *Caenorhabditis elegans* star formation and negative chemotaxis induced by infection with corynebacteria / C. A. Antunes, L. Clark, M. T. Wanuske, E. Hacker, L. Ott, L. Simpson-Louredo, [et al.] // *Microbiology*. – 2016. – Vol. – 162. – P. 84–93.
48. Arciola, C.R. Perspectives on DNA vaccines. Targeting staphylococcal adhesins to prevent implant infections / C.R. Arciola, P. Speziale, L. Montanaro, // *J. Artif Organs*. – 2009. - Vol. 32. - №. 9 – P. 635-641.
49. Aronson, M. Prevention of colonization of the urinary tract of mice with *Escherichia coli* by blocking of bacterial adherence with methyl alpha-D-mannopyranoside / M. Aronson, O. Medalia, L. Schori, D. Mirelman, N. Sharon, I. Ofek // *J Infect Dis*. – 1979. – Vol. 139. - № 3. – P. 329-332.
50. Barocchi, M.A. A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses / M.A. Barocchi, J. Ries, X. Zogaj, C. Hemsley, B. Albiger, A. Kanth, [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2006. – Vol. 10 - № 3. – P. 2857-2862.
51. Bodzioch, M. Evidence for potential functionality of nuclearly-encoded humanin isoforms / M. Bodzioch, K. Lapicka-Bodzioch, B. Zapala, W. Kamysz, B. Kiec-Wilk, A. Dembinska-Kiec // *Genomics*. - 2009. – Vol. 94. - № 10. – P. 247-256.
52. Bortner, C.D. Apoptotic volume decrease and the incredible shrinking cell / C.D. Bortner, J.A. Cidlowski // *Cell Death Differ.* – 2002. – Vol. 9. - № 12. – P. 1307-1310.
53. Braga, P. C. Sub-MIC concentrations of cefodizime interfere with various factors affecting bacterial virulence / P. C. Braga, M. D. Sasso, M. T. Sala // *J. Antimicrob Chemother.* 2000. - Vol. 45. - № 1 - P. 15–25.

54. Bravo, D. Type IV(B) pili are required for invasion but not for adhesion of *Salmonella enterica* serovar Typhi into BHK epithelial cells in a cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-independent manner / D. Bravo, C.J. Blondel, A. Hoare, L. Leyton, M.A. Valvano // *Contreras I. Microb. Pathog.* – 2011. - Vol. 51. - №. 5 - P. 373-377.
55. Budzik, J.M. Assembly of pili on the surface of *Bacillus cereus* vegetative cells / J.M. Budzik, L.A. Marrafini, O. Schneewind // *Mol. Microbiol.* – 2007. – Vol. 66. - № 2 - P. 495-510.
56. Burger, O. A high molecular mass constituent of cranberry juice inhibits *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus / O. Burger, I. Ofek, M. Tabak, E.I. Weiss, N. Sharon, I. Neeman // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* - 2000. - Vol. 29. - № 4 – P. 295-301.
57. Burger, O. Inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus by a high-molecular-weight constituent of cranberry juice. / O. Burger, E. Weiss, N. Sharon, M. Tabak, I. Neeman, I. Ofek // *Crit. Rev Food Sci. Nutr.* - 2002. - Vol. 42 (Suppl). - №. 3 – P. 279-284.
58. Burkovski, A. Cell envelope of *Corynebacteria*: structure and influence on pathogenicity / A. Burkovski // *ISRN Microbiology.* – 2013. – Vol. 2013. - Article ID 935736. - P. 11.
59. Cachia, P.J. Synthetic peptide vaccine and antibody therapeutic development: prevention and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* / P.J. Cachia, R.S. Hodges // *Biopolymers.* – 2003. - Vol. 71 - №.2 – P. 141-168.
60. Cegelski, L. The biology and future prospects of antivirulence therapies / L. Cegelski, G.R. Marshall, G.R. Eldridge, S.J. Hultgren // *Nat Rev Microbiol.* – 2008. – Vol. 6. - № 1. – P. 17-27.
61. Chen, S.L. Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: a comparative genomics approach / S.L. Chen, C.S. Hung, J. Xu, C.S. Reigstad, V. Magrini, A. Sabo, D. Blasiar, [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2006. – Vol.103. - №15. – P. 5977-82.

62. Cho, J.A. Insights on the trafficking and retro-translocation of glycosphingolipid-binding bacterial toxins / J.A. Cho, D.J. Chinnapen, E. Aamar, Y.M. te Welscher, W.I. Lencer, R. Massol // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2012. – Vol. 2. - P. 51.
63. Chorell, E. Design and synthesis of C-2 substituted thiazolo and dihydrothiazolo ring-fused 2-pyridones: pilicides with increased antivirulence activity / E. Chorell, J.S. Pinkner, G. Phan, S. Edvinsson, F. Buelens, H. Remaut, G. Waksman [et al] // *J Med Chem.* – 2010. – Vol. 53. № 15. – P. 5690-5695.
64. Chorell, E. Design and synthesis of fluorescent pilicides and curlicides: bioactive tools to study bacterial virulence mechanisms / E. Chorell, J.S. Pinkner, C. Bengtsson, S. Edvinsson, C.K. Cusumano, E. Rosenbaum, L.B. Johansson [et al.] // *Chemistry.* – 2012. – Vol. 18. - № 15 – P. 4522-4532.
65. Chorell, E. Mapping pilicide anti-virulence effect in *Escherichia coli*, a comprehensive structure-activity study / E. Chorell, J.S. Pinkner, C. Bengtsson, T.S. Banchelin, S. Edvinsson, A. Linusson, S.J. Hultgren, F. Almqvist // *Bioorg Med Chem.* – 2012. – Vol. 20. - № 9. – P. 3128-3142.
66. Colombo, A. V. *Corynebacterium diphtheriae* surface proteins as adhesins to human erythrocytes / A.V. Colombo, R. Jr. Hirata, C.M. de Souza, L.H. Monteiro-Leal, J.O. Previato, L.C. Formiga, A.F. Andrade, A.L. Mattos-Guaraldi // *FEMS Microbiology Letters.* – 2001. – Vol. 197 - № 2. – P. 235–239.
67. Cossart, P. Sortase, a universal target for therapeutic agents against Gram-positive bacteria? / P. Cossart, R. Jonquieres // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2000. - Vol. 97. - № 10 – P. 5013–5015.
68. Cozens, D. Anti-adhesion methods as novel therapeutics for bacterial infections / D. Cozens, R.C. Read // *Expert Rev Anti Infect Ther.* – 2012. – Vol. 10. - № 12. – P.1457-1468.
69. Cusumano, Z. T., Innovative Solutions to Sticky Situations: Antiadhesive Strategies for Treating Bacterial Infections / Z. T. Cusumano, R. D. Klein, S. J. Hultgren // *Microbiology Spectrum.* – 2016. – Vol. 4. - № 2.
70. Cusumano, C.K. Bacterial adhesion--a source of alternate antibiotic targets / C.K. Cusumano, S.J. Hultgren // *IDrugs.* – 2009. – Vol. 12. - № 11. – P. 699-705.

71. Daffe, M. The cell envelope of corynebacteria. / Daffe, M. L. Eggeling, M. Bott // Handbook of *Corynebacterium glutamicum* – 2005. - P. 121–148.
72. Dal S.M, The combination of the SH metabolite of erdosteine (a mucoactive drug) and ciprofloxacin increases the inhibition of bacterial adhesiveness achieved by ciprofloxacin alone / S. M. Dal, C. Bovio, M. Culici, P.C. Braga // Drugs Exp Clin Res. - 2002. - Vol. 28. - №.2-3 - P. 75-82.
73. Dramsi, S. Assembly and role of pili in group B streptococci / S. Dramsi, E. Caliot, I. Bonne, S. Guadagnini, M.C. Prévost, M. Kojadinovic, L. Lalioui, [et al.]// Mol. Microbiol. – 2006. – Vol. 60. - № 6 – P. 1401-1413.
74. Dramsi, S. Sorting sortases: a nomenclature proposal for the various sortases of Gram-positive bacteria / S. Dramsi, P. Trieu-Cuot, H. Bierne // Research in Microbiology. – 2005. – Vol. 156. - № 3. – P. 289–297.
75. Eggeling, L. Structure and synthesis of the cell wall / L. Eggeling, S. Gurdyal B. Alderwick, L. Aldrwick // Corynebacteria: Genomics and Molecular Biology (Edited by: A. Burkovski) - Ed. Caister Academic Press. – 2008. - P. 267–294.
76. Escaich, S. Novel agents to inhibit microbial virulence and pathogenicity / S. Escaich // Expert Opin Ther Pat. - 2010. - Vol. 20. - № 10. - P.1401-1418.
77. Firon, N. Aromatic alpha-glycosides of mannose are powerful inhibitors of the adherence of type 1 fimbriated *Escherichia coli* to yeast and intestinal epithelial cells / N. Firon, S. Ashkenazi, D. Mirelman, I. Ofek, N. Sharon // Infect Immun. – 1987. – Vol. 55. - № 2. – P. 472-476.
78. Frey, J. Biological safety concepts of genetically modified live bacterial vaccines. / J. Frey // Vaccine. - 2007. - Vol. 30. - № 25. - P. 5598-5605.
79. Gao, X. Novel fusion protein protects against adherence and toxicity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in mice / X. Gao, K. Cai, T. Li, Q. Wang, X. Hou, R. Tian, [et al.] // Vaccine. - 2011. - Vol. 38. - № 29. - P. 6656-6663.
80. Gaspar, A.H. Assembly of distinct pilus structures on the surface of *Corynebacterium diphtheriae* / A.H. Gaspar, H. Ton-That // J. Bacteriol. 2006. – Vol. 188. - № 4. – P. 1526-1533.

81. Gaudet, P. Phylogenetic-based propagation of functional annotations within the Gene Ontology consortium / P. Gaudet, M.S. Livstone, S.E. Lewisand, P.D. Thomas // Briefings in bioinformatics. – 2011. – Vol. 12. - № 5. – P. 449-462.
82. Gaudreau, M.C. Protective immune responses to a multi-gene DNA vaccine against *Staphylococcus aureus* / M.C. Gaudreau, P. Lacasse, B.G. Talbot // Vaccine. - 2007. - Vol. 25. - №.5 - P. 814-824.
83. Gebhardt, H. The key role of the mycolic acid content in the functionality of the cell wall permeability barrier in *Corynebacteriaceae* / H. Gebhardt, X. Meniche, M. Tropis, R. Krämer, M. Daffé, S. Morbach // Microbiology. – 2007. – Vol. 153 - № 5. - P. 1424–1434.
84. Ghosh, S. An adhesion protein of *Salmonella enterica* serovar Typhi is required for pathogenesis and potential target for vaccine development / S. Ghosh, K. Chakraborty, T. Nagaraja, S. Basak, H. Koley, S. Dutta, [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2011. – Vol. 108. - № 8. – P. 3348-3353.
85. Gomes, D.L. SubMICs of penicillin and erythromycin enhance biofilm formation and hydrophobicity of *Corynebacterium diphtheriae* strains / D.L. Gomes, R.S. Peixoto, E.A. Barbosa, F. Napoleão, P.S. Sabbadini, K.R. [et al.] // J. Med. Microbiol. – 2013. - Vol. 62. - № Pt 5. – P. 754-760.
86. Han, Z. Structure-based drug design and optimization of mannoside bacterial FimH antagonists / Z. Han, J.S. Pinkner, B. Ford, R. Obermann, W. Nolan, S.A. Wildman [et al.] // J Med Chem. – 2010. – Vol. 53. - № 12. – P. 4779-92.
87. Hansmeier, N. T. Mapping and comprehensive analysis of the extracellular and cell surface proteome of the human pathogen *Corynebacterium diphtheriae* / N. Hansmeier, T.C. Chao, J. Kalinowski, A. Pühler, A. Tauch // Proteomics. - 2006. – Vol. 6. - № 8. – P. 2465-2476.
88. Hard, G. C. Comparative toxic effect of the surface lipid of *Corynebacterium ovis* on peritoneal macrophages / G. C. Hard // Infect Immun. – 1975. – Vol. 12. - № 6. - P. 1439–1449.

89. Hirata, R. Jr. Intracellular viability of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains in HEp-2 cells / R. Jr. Hirata, F. Napoleao, L.H. Monteiro-Leal., [et al.] // FEMS Microbiol. Lett. - 2002. - № 215. - P. 115–119.
90. Hartlova, A. Membrane rafts: a potential gateway for bacterial entry into host cells / A. Hartlova, L. Cervený, M. Hubálek, Z. Krocová, J. Stulík // Microbiol Immunol. – 2010. – Vol. 54. - № 4. – P. 237-245.
91. Hunolstein, V.C. Penicillin tolerance amongst non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* isolated from cases of pharyngitis / V.C. Hunolstein, F. Scopetti, A. Efstratiou, K. Engler // J. Antimicrob Chemother. – 2002. – Vol. 50. - № 1. – P. 125-128.
92. Hur, J. A vaccine candidate for post-weaning diarrhea in swine constructed with a live attenuated *Salmonella* delivering *Escherichia coli* K88ab, K88ac, FedA, and FedF fimbrial antigens and its immune responses in a murine model // J. Hur, B.D. Stein, J.H. Lee // Can J Vet Res. – 2012. – Vol. 76. - № 3. – P. 186-194.
93. Hur, J. Development of a novel live vaccine delivering enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbrial antigens to prevent post-weaning diarrhea in piglets / J. Hur, J.H. Lee // Vet Immunol Immunopathol. – 2012. – Vol. 146. - № 3-4. P. 283-288.
94. Ibraim, I.C. Transcriptome profile of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in response to iron limitation / Ibraim, I.C., M. T. D. Parise, D. Parise, M. Z. T. Sfeir, T. L. de Paula Castro, A. R. Wattam [et al.] // BMC Genomics. – 2019. – Vol. 20 - № 663. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6018-1>.
95. Indrigo, J. Cord factor trehalose 6,6-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages / J. Indrigo, R. L. Hunter, J. K. Actor // Microbiology. – 2003. – Vol. 149. - № 8. – P.2049–2059.
96. Jantscher-Krenn, E. The human milk oligosaccharide disialyllacto-N-tetraose prevents necrotizing enterocolitis in neonatal rats / E. Jantscher-Krenn, M. Zharebtsov, C. Nissan, K. Goth, Y.S. Guner, N. Naidu // Gut. – 2012. – Vol. 61. - № 10. – P. 1417-1425.

97. Kanwar, J. R. Multifunctional Iron Bound Lactoferrin and Nanomedicinal Approaches to Enhance Its Bioactive Functions / J. R. Kanwar, K. Roy, Y. Patel et. al. // *Molecules*. - 2015. - №20. - P. 9703-9731.
98. Klančnik, A. Antiadhesion activity of juniper (*Juniperus communis* L.) preparation against *Campylobacter jejuni* evaluated with PCR-based methods / A. Klančnik, Š. Zorko, N. Toplak, M. Kovač, F. Bucar, B. Jeršec, S. Smole Možina // *Phytother Res*. – 2018. – Vol. 32. - № 3. – P. 542-550.
99. Krachler A.M. Functional characterization of the interaction between bacterial adhesin multivalent adhesion molecule 7 (MAM7) protein and its host cell ligands / A.M. Krachler, K. Orth. // *J Biol Chem*. – 2011. – Vol. 286. - № 45. – P. 38939-38947.
100. Krachler, A.M. In vitro characterization of multivalent adhesion molecule 7-based inhibition of multidrug-resistant bacteria isolated from wounded military personnel / A.M. Krachler, K. Mende, C. Murray, K. Orth // *Virulence*. – 2012. – Vol. 3. - № 4. P. 389-399.
101. Krachler, A.M. Outer membrane adhesion factor multivalent adhesion molecule 7 initiates host cell binding during infection by gram-negative pathogens / A.M. Krachler, H. Ham, K. Orth // *Proc Natl Acad Sci U S A*. - 2011. – Vol. 108. № 28. P. 11614- 11619.
102. Krachler, A.M. Targeting the bacteria-host interface: strategies in anti-adhesion therapy / A.M. Krachler, K. Orth // *Virulence*. – 2013. – Vol. 4. - № 4. - P. 284-94.
103. Krachler, AM. Turnabout is fair play: use of the bacterial Multivalent Adhesion Molecule 7 as an antimicrobial agent / AM. Krachler, H. Ham, K. Orth // *Virulence*. - 2012. – Vol. 3. - № 1. – P. 68-71.
104. Klein, T. FimH antagonists for the oral treatment of urinary tract infections: from design and synthesis to in vitro and in vivo evaluation / T. Klein, D. Abgottspon, M. Wittwer, S. Rabbani, J. Herold, X. Jiang, S. Kleeb, C. Lüthi, [et al.] // *J. Med. Chem*. - 2010. - № 53. – P. 8627-8641.
105. Labbate, M. Quorum-sensing regulation of adhesion in *Serratia marcescens* MG1 is surface dependent // M. Labbate, H. Zhu, L. Thung, R. Bandara, M.R. Larsen, M.D.

- Willcox, M. Givskov, S.A. Rice, S. Kjelleberg // *J. Bacteriol.* – 2007. – Vol. 189. - № 7. – P. 2702–2711.
106. Labrecque, J. Effects of a high-molecular-weight cranberry fraction on growth, biofilm formation and adherence of *Porphyromonas gingivalis* / J. Labrecque, C. Bodet, F. Chandad, D. Grenier // *J Antimicrob Chemother.* – 2006. – Vol. 58. № 2. – P. 439-443.
107. Laemmli, U. K. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation / U.K. Laemmli, F. Beguin, G. Gujer-Kellenberger // *J. Mol. Biol.* – 1970. – Vol. 47. - № 1. - P 69 – 74.
108. Langermann, S. Prevention of mucosal *Escherichia coli* infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination / S. Langermann, S. Palaszynski, M. Barnhart, G. Auguste, J.S. Pinkner, J. Burlein, S. Koenig [et al.] // *Science.* – 1997. – Vol. 276. - № 5312. – P. 607-611.
109. Langermann, S. Vaccination with FimH adhesin protects cynomolgus monkeys from colonization and infection by uropathogenic *Escherichia coli* / S. Langermann, R. Möllby, J.E. Burlein, S.R. Palaszynski, C.G. Auguste, A. DeFusco, [et al.] // *J Infect Dis.* – 2000. – Vol. 181. № 2 P. 774-778.
110. Li, T. Different type I fimbrial genes and tropisms of commensal and potentially pathogenic *Actinomyces* spp. with different salivary acidic proline-rich protein and statherin ligand specificities. / T. Li, M.K. Khah, S. Slavnic, I. Johansson, N. Strömberg // *Infect. Immun.* – 2001. – Vol. 69. - № 12. – P. 7224–7233.
111. Lillehoj, E.P. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin as an adhesin for Muc1 mucin / E.P. Lillehoj, B.T. Kim, K.C. Kim // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* – 2002. – Vol. 282. № 4. – P. 751-756.
112. Lindén, S.K. MUC1 limits *Helicobacter pylori* infection both by steric hindrance and by acting as a releasable decoy / S.K. Lindén, Y.H. Sheng, A.L. Every, K.M. Miles, E.C. Skoog, T.H. Florin / Sutton, M.A. McGuckin. // *PLoS Pathog.* – 2009. – Vol. 5 № 10. – e 1000617.
113. Lopes, T. Complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strain Cp267, isolated from a llama // T. Lopes, A. Silva, R. Thiago, A. Carneiro, F.A.

- Dorella, F.S. Rocha, [et al.] // J. Bacteriol. – 2012. – Vol. 194. - № 13. – P. 3567–3568.
114. Lorenzo-Gómez, M.F. Evaluation of a therapeutic vaccine for the prevention of recurrent urinary tract infections versus prophylactic treatment with antibiotics / M.F. Lorenzo-Gómez, B. Padilla-Fernández, F.J. García-Criado, J.A. Mirón-Canelo, A. Gil-Vicente, A. Nieto-Huertos, J.M. Silva-Abuin // Int Urogynecol J. – 2013. – Vol. 24. № 1. – P. 127-134.
115. Luft, J.H. Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use, and mechanism of action / J.H. Luft. - The Anatomical Record. - 1971. – Vol. 3 - № 171. – P. 369–415.
116. Mandlik, A. *Corynebacterium diphtheriae* employs specific minor pilins to target human pharyngeal epithelial cells / A. Mandlik, A. Swierczynski, A. Das, H. Ton-That // Mol. Microbiol. – 2007. – Vol. 64. № 1. – P. 111-124.
117. Mandlik, A. Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development // A. Mandlik, A. Swierczynski, A. Das, H. Ton-That // Trends Microbiol. – 2008. – Vol. 16. - № 1. - P. 33-40.
118. Marchand, C. H. Biochemical disclosure of the mycolate outer membrane of *Corynebacterium glutamicum* // C.H. Marchand, C. Salmeron, R. Bou Raad, X. Méniche, M. Chami, M. Masi, [et al.] // J. Bacteriol. – 2012. – Vol. 194. - № 3. – P. 587–597.
119. Margalit, M. Enzyme replacement therapy in the management of longstanding skeletal and soft tissue salmonella infection in a patient with Gaucher's disease / M. Margalit, N. Ash, A. Zimran, H. Halkin // Postgrad Med J. – 2002. – Vol. 78. - № 923. – P. 564-565.
120. Mishra, A. Sortase catalyzed assembly of distinct heteromeric fimbriae in *Actinomyces naeslundii* / A. Mishra, A. Das, J.O. Cisar, H. Ton-That // J. Bacteriol. – 2007. – Vol. 189. - № 8. - P. 3156-3165.
121. Moreira, L. O. Novel lipoarabinomannan-like lipoglycan (CdiLAM) contributes to the adherence of *Corynebacterium diphtheriae* to epithelial cells // L. O. Moreira, A.

- L. Mattos-Guaraldi, A. F. Andrade // Arch Microbiol. – 2008. – Vol. 19. - № 5. – P. 521–530.
122. Mulvey, G. Glycan mimicry as a basis for novel anti-infective drugs / G. Mulvey, P.I. Kitov, P. Marcato, D.R. Bundle, G.D. Armstrong // Biochimie. – 2001. – Vol. 83. - № 3. – P. 841-847.
123. Nallapareddy, S.R. Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis* / S.R. Nallapareddy, K.V. Singh, J. Sillanpää, D.A. Garsin, M. Höök, S.L. Erlandsen, B.E. Murray // J. Clin. Invest. – 2006. – Vol. 116. - № 10. – P. 2799-2807.
124. Navarre, W.W. Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope / W.W. Navarre, O. Schneewind // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1999. – Vol. 63. - № 1. – P. 174–229.
125. Nelson, A. RrgA is a pilus-associated adhesin in *Streptococcus pneumoniae* / A.L. Nelson, J. Ries, F. Bagnoli, S. Dahlberg, S. Fälker, S. Rounioja, J. Tschöp, [et al.] // Mol. Microbiol. – 2007. - Vol. 66. - № 2. – P. 329-340.
126. O'May, C. The swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* is blocked by cranberry proanthocyanidins and other tannin-containing materials / C. O'May, N. Tufenkji // Appl Environ Microbiol. – 2011. – Vol. 77. - № 9. – P. 3061-3067.
127. Ofek, I. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems / I. Ofek, D.L. Hasty, N. Sharon // FEMS Immunol Med Microbiol. – 2003. – Vol. 38. - № 3. – P. 181-91.
128. Oliveira, A. Insight of Genus *Corynebacterium*: Ascertainning the Role of Pathogenic and Non-pathogenic Species // A. Oliveira, L.C. Oliveira, F. Aburjalle, L. Benevides, S. Tiwari, S. B. Jamal, A. Silva, [et al.] // frontiers in Microbiology. – 2017. – Vol. 8. – Article 1937.
129. Ott, L. *Corynebacterium diphtheriae* invasion-associated protein (DIP1281) is involved in cell surface organization, adhesion and internalization in epithelial cells / L. Ott, M. Höller, R.G. Gerlach, M. Hensel, J. Rheinlaender, T.E. Schäffer, A. Burkovski // BMC Microbiology. – 2010. – Vol. 10: 2.
130. Ott, L. Strain-specific differences in pili formation and the interaction of *Corynebacterium diphtheriae* with host cells / L. Ott, M. Höller, J. Rheinlaender,

- T.E. Schäffer, M. Hensel, A. Burkovski // BMC Microbiology. - 2010. – Vol. 10: 257.
131. Ott, L. Induction of NFκB transduction pathway in response to *Corynebacterium diphtheriae* infection / L. Ott, B. Scholz, M. Höller, K. Hasselt, A. Ensser, A. Burkovski // Microbiology. – 2013. – Vol. 159. – P. 126-135.
132. Ott, L. *Corynebacterium diphtheriae* and Related Toxigenic Species / L. Ott, A. Burkovski. - Dordrecht: Springer, 2014. // Toxigenic *Corynebacteria*: Adhesion, Invasion and Host Response. - p. 143–170.
133. Ott, L. Analysis of *Corynebacterium diphtheriae* macrophage interaction: Dispensability of corynomycolic acids for inhibition of phagolysosome maturation and identification of a new gene involved in synthesis of the corynomycolic acid layer / L. Ott, E. Hacker, T. Kunert, I. Karrington, P. Etschel, R. Lang, V. Wiesmann, [et al.] // PLoS One. – 2017. – Vol. 12. - № 7. – e0180105
134. Ott, L. Adhesion properties of toxigenic corynebacteria / L. Ott // AIMS Microbiol. – 2018. – Vol. 4. - № 1. – P. 85-103.
135. Pansegrau, W. Assembly of pili in Gram-positive bacteria / W. Pansegrau, F. // Curr Top Microbiol Immunol. – 2017. – Vol. 404. – P. 203-233.
136. Parker, P. Bovine Muc1 inhibits binding of enteric bacteria to Caco-2 cells / P. Parker, L. Sando, R. Pearson, K. Kongsuwan, R.L. Tellam, S. Smith // Glycoconj J. – 2010. – Vol. 27. - № 1 P. 89-97.
137. Pastores, G.M. An openlabel, noncomparative study of miglustat in type I Gaucher disease: efficacy and tolerability over 24 months of treatment / G.M. Pastores, N.L. Barnett, E.H. Kolodny // Clin Ther. – 2005. – Vol. 27. № 8. – P. 1215 - 1227.
138. Paul, A. R. Predictive modelling of a novel anti-adhesion therapy to combat bacterial colonisation of burn wounds / A. R. Paul, M. Ryan, E. K. Huebinger, A-M. Krachler, S. Jabbari // PLoS Comput Biol – 2018. – Vol. 14. - № 5. – P. e1006071.
139. Peron, G. The antiadhesive activity of cranberry phytocomplex studied by metabolomics: Intestinal PAC-A metabolites but not intact PAC-A are identified as markers in active urines against uropathogenic *Escherichia coli* / G. Peron, S. Sut, A.

- Pellizzaro, P. Brun, D. Voinovich, I Castagliuolo, S Dall'Acqua // *Fitoterapia*. – 2017. – Vol. 122 – P. 67-75.
140. Peixoto, RS Functional characterization of the collagen-binding protein DIP2093 and its influence on host-pathogen interaction and arthritogenic potential of *Corynebacterium diphtheria* / R.S. Peixoto, C.A. Antunes, L.S. Louredo, [et al.] // *Microbiology*. – 2017. - № 163. – P. 692–701.
141. Peng, E.D. Iron and Zinc Regulate Expression of a Putative ABC Metal Transporter in *Corynebacterium diphtheriae* / E.D. Peng, D.M. Oram, M.D. Battistel, L.R. Lyman, D.I. Freedberg, M.P. Schmitt // *J Bacteriol*. – 2018. – Vol. 200. - № 10. -e00051-18.
142. Pinkner, J.S. Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uropathogenic bacteria / J.S. Pinkner, H. Remaut, F. Buelens, E. Miller, V. Aberg, N. Pemberton, M. Hedenström, [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2006. – Vol. 103. № 47. – P. 17897-17902.
143. Pizarro-Cerda, J. Bacterial adhesion and entry into host cells / J. Pizarro-Cerda, P. Cossart // *J. Cell*. - 2006. – Vol. 124. - № 4. – P. 715–727.
144. Pompilio, A. Subinhibitory concentrations of moxifloxacin decrease adhesion and biofilm formation of *Stenotrophomonas maltophilia* from cystic fibrosis / A. Pompilio, C. Catavittello, C. Picciani, P. Confalone, R. Piccolomini, V. Savini, E. Fiscarelli, [et al.] // *J. Med Microbiol*. - 2010. – Vol. 59. - № 1. – P. 76-81.
145. Pruzzo, C. Bacterial adhesins in the prophylaxis and therapy of infections / C. Pruzzo, G. Satta // *Quad Sclavo Diagn* – 1986. – Vol. 22. - № 1. – P. 68-77.
146. Puech, V. Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane / V. Puech, M. Chami, A. Lemassu, M.A. Lanéelle, B. Schiffler, P. Gounon, N. Bayan, [et al.] // *Microbiology*. – 2001. – Vol. 147. - № 5. – P. 1365–1382.
147. Puliti, M. Experimental model of infection with non-toxigenic strains of *Corynebacterium diphtheriae* and development of septic arthritis / M. Puliti, C. von Hunolstein, M. Marangi, F. Bistoni, L. Tissi // *J. Med. Microbiol*. – 2006. – Vol. 55. - № 2. – P. 229-235.

148. Radin, N.S. Preventing the binding of pathogens to the host by controlling sphingolipid metabolism / Radin, N.S. // *MicrobesInfect.* - 2006. – Vol. 8. № 3. - P. 938-945.
149. Radmacher, E. Two functional FAS-I type fatty acid synthesis in *Corynebacterium glutamicum* / E. Radmacher, L.J. Alderwick, G.S. Besra, A.K. Brown, K.J. Gibson, H. Sahm, L. Eggeling // *Microbiology.* – 2005. – Vol. 151. - № 7. P. 2421–2427.
150. Richards, S.J. Probing bacterial-toxin inhibition with synthetic glycopolymers prepared by tandem post-polymerization modification: role of linker length and carbohydrate density / S.J. Richards, M.W. Jones, M. Hunaban, D.M. Haddleton, M.I. Gibson // *Angew Chem Int Ed Engl.* – 2012. – Vol. 51. - № 31. - P. 7812-7816.
151. Richards, S.J. Probing bacterial-toxin inhibition with synthetic glycopolymers prepared by tandem post-polymerization modification: role of linker length and carbohydrate density / S.J. Richards, M.W. Jones, M. Hunaban, D.M. Haddleton, M.I. Gibson // *Angew Chem Int Ed Engl.* – 2012. – Vol. 51. - № 31. – P. 7812-7816.
152. Rock, C. O. *Escherichia coli* as a model for the regulation of dissociable (type II) fatty acid biosynthesis / C. O. Rock, J. E. Cronan // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 1996. – Vol. 1302. - № 1. – P. 1–16.
153. Rogers, E. A. Adhesion by pathogenic *Corynebacteria* / E. A. Rogers, A. Das, H. Ton-That // *Adv Exp Med Biol.* – 2011. – Vol. 715. – P. 91–103.
154. Sabbadini, P. S. *Corynebacterium diphtheriae* 67-72p hemagglutinin, characterized as the protein DIP0733, contributes to invasion and induction of apoptosis in Hep-2 cells / P.S. Sabbadini, M.C. Assis, E. Trost, D.L. Gomes, L.O. Moreira, C.S. Dos Santos, G.A. Pereira, [et al.] // *Microbial Pathogenesis.* – 2012. – Vol. 52. - № 3. – P. 165–176.
155. Sangal, V Adherence and invasive properties of *Corynebacterium diphtheriae* strains correlates with the predicted membrane-associated and secreted proteome / V. Sangal, J. Blom, I.C. Sutcliffe, [et al.] // *BMC Genomics.* – 2015. - № 16. – P. 765–780.
156. Schierholt, A. Bi- and trivalent glycopeptide mannopyranosides as inhibitors of type 1 fimbriae-mediated bacterial adhesion: variation of valency, aglycon and scaffolding

- / A. Schierholt, M. Hartmann, T.K. Lindhorst // Carbohydr Res. – 2011. – Vol. 346. - № 12. – P. 1519-1526.
157. Scott, J.R. Pili with strong attachments: Gram-positive bacteria do it differently / J.R. Scott, D. Zähler // Mol Microbiol. – 2006. – Vol. 62. - № 2. P. 320-30.
158. Sharon, N. Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases / N. Sharon // Biochim Biophys Acta. – 2006. – Vol. 1760. – № 4. - P. 527-537.
159. Sharon, N. Safe as mother's milk: carbohydrates as future antiadhesion drugs for bacterial diseases / N. Sharon, I. Ofek // Glycoconj J. – 2000. – Vol. 17. - № 7-9. – P. 659-664.
160. Sharma, N.C. Diphtheria / N.C. Sharma, A. Efstratiou, I. Mokrousov, A. Mutreja, B. Das, T. Ramamurthy // Nat Rev Dis Primers. – 2019. – Vol. 5. - № 1. – P. 81.
161. Sheth, H.B. Development of an anti-adhesive vaccine for *Pseudomonas aeruginosa* targeting the C-terminal region of the pilin structural protein / Sheth, H.B. L.M. Glasier, N.W. Ellert, P. Cachia, W. Kohn, K.K. Lee, W. Paranchych, [et al.] // Biomed Pept Proteins Nucleic Acids. – 1995. – Vol. 1. – № 3. - P.141-148.
162. Shmueli, H. Cranberry components for the therapy of infectious disease / H. Shmueli, I. Ofek, E.I. Weiss, Z. Ronen, Y. Hourri-Haddad // Curr Opin Biotechnol. – 2012. – Vol. 23. - № 2 – P. 148-152.
163. Shoaf-Sweeney, K.D. Adherence, anti-adherence, and oligosaccharides preventing pathogens from sticking to the host / K.D. Shoaf-Sweeney, R.W. Hutkins // Adv Food Nutr Res. – 2009. – Vol. 55. P. 101-61.
164. Sjöquist, J. Localization on protein A in the bacteria / J. Sjöquist, J Movitz, I.B. Johansson, H. Hjelm // J. Biochem. – 1972. – Vol. 30. - № 1. – P. 190-194.
165. Svensson, A. Design and evaluation of pilicides: potential novel antibacterial agents directed against uropathogenic *Escherichia coli* / A. Svensson, A. Larsson, H. Emtenäs, M. Hedenström, T. Fex, S.J. Hultgren, J.S. Pinkner, [et al.] // Chembiochem. – 2001. – Vol. 2. - № 12. – P. 915-8.
166. Svensson, M. Glycolipid depletion in antimicrobial therapy / M. Svensson, B. Frendeus, T. Butters, F. Platt, R. Dwek, C. Svanborg. // Mol Microbiol. – 2003. – Vol. 47. – № 2. - P. 453-61.

167. Svensson, M. Glycolipid depletion in antimicrobial therapy / M. Svensson, B. Frendeus, T. Butters, F. Platt, R. Dwek, C. Svanborg // *Mol Microbiol.* – 2003. – Vol. 47. № 2. – P. 453-461.
168. Svensson, M. Glycolipid receptor depletion as an approach to specific antimicrobial therapy / M. Svensson, F.M. Platt, C. Svanborg, // *FEMS Microbiol Lett.* – 2006. – Vol. 258. - № 1. – P. 1-8.
169. Tauch, A. Molecular armory or niche factors: virulence determinants of *Corynebacterium* species / A. Tauch, A. Burkovski // *FEMS Microbiol Lett.* – 2015. - № 362. – P. 1–6.
170. Telford, J.L. Pili in Gram-positive pathogens / J.L. Telford, M.A. Barocchi, I. Margarit, R. Rappuoli, G. Grandi // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2006. – Vol. 4. - № 7. – P. 509-519.
171. Therrien, R. Lack of protection of mice against *Staphylococcus aureus* despite a significant immune response to immunization with a DNA vaccine encoding collagen-binding protein / R. Therrien, P. Lacasse, G. Grondin, B.G. Talbot // *Vaccine.* – 2007. – Vol. 25/ - № 7. - P. 5053-5061.
172. Toivanen, M. Binding of *Neisseria meningitidis* pili to berry polyphenolic fractions / Toivanen, M. A. Ryyänen, S. Huttunen, J. Duricová, K. Riihinen, R. Törrönen, S. Lapinjoki, C. Tikkanen-Kaukanen // *J Agric Food Chem.* – 2009. – Vol. 57. - № 8. – P. 3120-3127.
173. Ton-That, H. Assembly of pili on the surface of *C. diphtheriae* / H. Ton-That, O. Schneewind // *Mol. Microbiol.* – 2003. – Vol. 50. - № 4. – P. 1429–1438.
174. Tsuge, Y. Deletion of cg_1596 and cgR_2070, encoding NlpC/P60 proteins, causes a defect in cell separation in *Corynebacterium glutamicum* R / Y. Tsuge, H. Ogino, H. Teramoto, M. Inui, H. Yukawa // *J. Bacteriol.* – 2007. – Vol. 190. - № 24. - P. 8204-8214.
175. Varga, J.J. Type IV pili-dependent gliding motility in the Gram-positive Pathogen *Clostridium perfringens* and other *Clostridia* / J.J. Varga, V. Nguyen, D.K. O'Brien, K. Rodgers, R.A. Walker, S.B. Melville // *Molecular. Microbiology.* – 2006. – Vol. 62. - № 3. – P. 680–694.

176. Wagner, C. Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica* / C. Wagner, M. Hensel // Adv Exp Med Biol. – 2011. – Vol. 715. – P. 17-34.
177. Watnick, P. Biofilm, city of microbes / P. Watnick, R. Kolter // J. Bacteriol. - 2000. - № 182. - P. 2675-2679.
178. Weerasekera, D. The C-terminal coiled-coil domain of *Corynebacterium diphtheriae* DIP0733 is crucial for interaction with epithelial cells and pathogenicity in invertebrate animal model systems / D. Weerasekera, F. Stengel, H. Sticht, A. L. de Mattos Guaraldi, A. Burkovski, C. Azevedo Antunes // BMC Microbiol. – 2018. – Vol. 18. - № 1:106.
179. Weerasekera, D. Beyond diphtheria toxin: cytotoxic proteins of *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium diphtheriae* / D. Weerasekera, J. Möller, M. E. Kraner, K.A. Antunes, A.L. Matos-Guaraldi, A. Burkovski // Microbiologi. – 2019. - doi: [10.1099/mic.0.000820](https://doi.org/10.1099/mic.0.000820)
180. Weerasekera, D. Of mice and men: Interaction of *Corynebacterium diphtheriae* strains with murine and human phagocytes / D. Weerasekera, T. Fastner, R. Lang, A. Burkovski, L. Ott // Virulence. – 2019. – Vol. 10. - № 1. – P. 414-428.
181. Wizemann, T.M. Adhesins as targets for vaccine development / T.M. Wizemann, J.E. Adamou, S. Langermann // Emerg Infect Dis. – 1999. – Vol. 5. - № 3. – P. 395-403.
182. Wojnicz, D. Effects of subinhibitory concentrations of amikacin and ciprofloxacin on the hydrophobicity and adherence to epithelial cells of uropathogenic *Escherichia coli* strains / Wojnicz, D. S. Jankowski // Int J Antimicrob Agents. – 2007. – Vol. 29. - № 6. – P. 700-704.
183. Yanagawa, R. Electron microscopy of fine structure of *Corynebacterium renale* with special reference to pill / R. Yanagawa, K. Otsuki, T. Tokui // Japanese Journal of Veterinary Research. – 1968. – Vol. 16. - № 1. – P. 31–37.
184. Yang, K. Corynebacteria as a cause of pulmonary infection: a case series and literature review / K. Yang, R. L. Kruse, W. V. Lin, D. M. Musher // Pneumonia. – 2018. – 10:10.

185. Yeung, M. K. Identification of a gene involved in assembly of *Actinomyces naeslundii* T14V type 2 fimbriae / M.K. Yeung, J.A. Donkersloot, J.O. Cisar, P.A. Ragsdale // *Infect. Immun.* – 1998. – Vol. 66. - № 4. – P. 1482–1491.
186. Younson, J. The rational design of an anticaries peptide against *Streptococcus mutans* / J. Younson, C. Kelly // *Mol Divers.* – 2004. – Vol. 8. – №2 P.121-126.
187. Zasada, A.A., Contemporary microbiology and identification of *Corynebacteria* spp. causing infections in human / A.A. Zasada, E. Mosiej // *Letters in Applied Microbiology.* 2018. – Vol. 66. – P. 472-483.
188. Zhang, C. *Escherichia coli* K88ac fimbriae expressing heat-labile and heat-stable (STa) toxin epitopes elicit antibodies that neutralize cholera toxin and STa toxin and inhibit adherence of K88ac fimbrial E. coli / C. Zhang, W. Zhang // *Clin Vaccine Immunol.* – 2010. – Vol. 17. № 12 – P. 1859-1867.
189. Zigangirova, N.A. Target-specific screening of antivirulence preparations for chronic infection therapy / N.A. Zigangirova, A.L. Gintsburg // *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* – 2011. – Vol. 4. – P. 107-15.
190. Zundler, S. Anti-Adhesion Therapies in Inflammatory Bowel Disease-Molekular and Clinical Aspects / S. Zundler, E. Becker, C. Weidinger, B. Siegmund // *frontiers in Immunology.* – 2017. – Vol. 8. – Article 891.

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. Алексеева, Э.Л. Алутина // Проблемы медицинской микологии (приложение). – Санкт-Петербург, 2019. – Том 21. – № 2. – С. 35-36.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. СТАТИСТИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ

Таблица 1

Влияние сыворотки крови бактерионосителей и больных дифтерией на показатели адгезии (КОЕ/мл) штамма *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий)

планктонная культура	Сыворотка крови					
	БН	ДТ	ДЛ	П	НП	Контроль
M±m	46,7±8,98	0,3±0,13	0,3±0,12	18,7±0,88	25,3±0,33	24,5±0,43
Me	46	0,3	0,3	19,0	25,0	24,5
[25-75]	27-67	0-1,0	0-1,0	17,0-20,0	25,0-26,0	9,0-26,0
БН		0,00041	0,00041	0,031	0,148	0,038
ДТ	0,00041		1,0	0,415	0,139	0,0041
ДЛ	0,0004	1,0		0,415	0,139	0,0039
Привитые	0,0315	0,415	0,415		0,979	0,978
Непривитые	0,148	0,139	0,139	0,979		0,999
Контроль	0,0389	0,079	0,079	0,978	0,999	
p (Kruskal-Wallis) p=0,001						
120-час. биопленочная	БН	ДТ	ДЛ	П	НП	Контроль
M±m	16,0±1,18	8,3±0,88	9,0±1,05	17,3±2,37	21,0±1,03	23,7±4,35
Me	16,0	8,0	9,0	17,0	21,0	24,0
[25-75]	15-17	7-10	8,0-10,0	17,0-18,0	20,0-21,0	23,0-24,0
БН		0,00016	0,00016	0,594	0,00068	0,00016
ДТ	0,00016		0,958	0,00015	0,00015	0,00015
ДЛ	0,00016	0,958		0,00015	0,00015	0,00015
Привитые	0,594	0,00015	0,00015		0,00752	0,0200
Непривитые	0,00068	0,00015	0,00015	0,00075		0,058
Контроль	0,00016	0,00015	0,00015	0,00020	0,058	
p (Kruskal-Wallis) p=0,066						
720-час. биопленочная	БН	ДТ	ДЛ	П	НП	Контроль
M±m	13,3±0,88	10,0±0,1	10,3±0,49	20,3±1,08	19,0±1,03	25,3±1,15
Me	13,0	10,0	10,0	20,0	19,0	25,0
[25-75]	12,0-15,0	10,0-10,0	10,0-11,0	20,0-21,0	18,0-20,0	25,0-26,0
БН		0,00045	0,0099	0,00015	0,00017	0,00015
ДТ	0,0045		0,99	0,00015	0,00015	0,00015
ДЛ	0,0099	0,99		0,00015	0,00015	0,00015
Привитые	0,00015	0,00015	0,00015		0,435	0,00025
Непривитые	0,00017	0,00015	0,00015	0,435		0,00016
Контроль	0,00015	0,00015	0,00015	0,00025	0,00016	
p (Kruskal-Wallis) p=0,058						

Условные обозначения: жирным шрифтом обозначено достоверное различие между группами при попарном сравнении с поправкой Бонферрони при $p \leq 0,05$;

БН – бактерионосители; ДТ – дифтерия ротоглотки токсическая; ДЛ – дифтерия ротоглотки локализованная; П – привитые АКДС- и АДС-М-препаратами; НП – непривитые АКДС- и АДС-М-препаратами.

Влияние сыворотки крови бактерионосителей и больных дифтерией на показатели адгезии (КОЕ/мл) *C. diphtheriae gravis tox+* № 665

Типовая культура	Сыворотка крови					
	БН	ДТ	ДЛ	П	НП	Контроль
М±m	22,5±2,05	1,7±0,67	5,7±1,20	9,0±1,15	13,7±0,67	14,7±0,56
Me	22,5	1,0	5,0	9,0	13,0	14,5
[25-75]	18,0-27,0	1,0-3,0	4,0-8,0	7,0-11,0	13,0-15,0	14,0-15,0
БН		0,00015	0,00015	0,00019	0,0057	0,0027
ДТ	0,00015		0,572	0,065	0,0012	0,00022
ДЛ	0,00015	0,572		0,736	0,0378	0,0048
Привитые	0,00019	0,0652	0,736		0,413	0,120
Непривитые	0,0057	0,0012	0,037	0,413		0,996
Контроль	0,0027	0,00022	0,0048	0,120	0,99	
p (Kruskal-Wallis) p=0,007						
120-час. биопленочная	БН	ДТ	ДЛ	П	НП	Контроль
М±m	7,0±0,96	4,7±0,31	7,0±0,47	13,7±1,15	12,0±1,03	14,0±1,14
Me	7,0	5,0	7,0	14,0	12,0	14,0
[25-75]	6,0-8,0	4,0-5,0	6,0-8,0	13,0-14,0	11,0-13,0	13,0-15,0
БН		0,061	1,0	0,00016	0,00030	0,00016
ДТ	0,061		0,061	0,00015	0,00015	0,00015
ДЛ	1,0	0,061		0,00016	0,00030	0,00016
Привитые	0,00016	0,00015	0,00016		0,26	0,99
Непривитые	0,00030	0,00015	0,00030	0,260		0,129
Контроль	0,00016	0,00015	0,00016	0,996	0,129	
p (Kruskal-Wallis) p=0,083						
720-час. биопленочная	БН	ДТ	ДЛ	П	НП	Контроль
М±m	4,0±0,37	11,7±1,24	9,7±0,48	6,3±0,58	7,0±0,46	18,0±1,16
Me	4,0	12,0	10,0	6,0	7,0	18,0
[25-75]	3,0-5,0	10,0-13,0	9,0-10,0	6,0-7,0	6,0-8,0	17,0-19,0
БН		0,00016	0,00030	0,114	0,029	0,00015
ДТ	0,00016		0,214	0,00043	0,00011	0,00020
ДЛ	0,00030	0,214		0,0148	0,058	0,00015
Привитые	0,114	0,00043	0,0148		0,958	0,00015
Непривитые	0,029	0,0011	0,058	0,958		0,00015
Контроль	0,00015	0,00020	0,00015	0,00015	0,00015	
p (Kruskal-Wallis) p=0,064						

Условные обозначения: жирным шрифтом обозначено достоверное различие между группами при попарном сравнении с поправкой Бонферрони при $p \leq 0,05$;

БН – бактерионосители; ДТ – дифтерия ротоглотки токсическая; ДЛ – дифтерия ротоглотки локализованная; П – привитые АКДС- и АДС-М-препаратами; НП – непривитые АКДС- и АДС-М-препаратами.

Влияние сыворотки крови бактерионосителей и больных дифтерией на показатели адгезии (КОЕ/мл) штамма *C. diphtheriae gravis tox+* № 6765

Типовая культура	Сыворотка крови					
	БН	ДТ	ДЛ	П	НП	Контроль
М±m	3,67±0,33	0	0,67±0,12	2,0±0,47	2,0±0,48	3,67±0,33
Me	4,0	0	1,0	2,0	2,0	4,0
[25-75]	3,0-4,0	0	0-1,0	1,0-3,0	1,0-3,0	3,0-4,0
БН		0,00052	0,00024	0,108	0,108	1,0
ДТ	0,00052		0,849	0,0419	0,0419	0,00052
ДЛ	0,0024	0,849		0,261	0,261	0,00246
Привитые	0,108	0,0419	0,261		1,0	0,108
Непривитые	0,108	0,0419	0,261	1,0		0,108
Контроль	1,0	0,00052	0,0024	0,108	0,108	
p (Kruskal-Wallis) p=0,127						
120-час. биопленочная	БН	ДТ	ДЛ	П	НП	Контроль
М±m	5,3±0,48	2,33±0,14	4,0±0,59	8,33±1,11	7,67±0,43	9,67±1,02
Me	5,0	3,0	4,0	8,0	8,0	10,0
[25-75]	5,0-6,0	1,0-3,0	3,0-5,0	8,0-9,0	7,0-8,0	9,0-10,0
БН		0,0053	0,353	0,0053	0,030	0,00034
ДТ	0,0056		0,167	0,00016	0,00017	0,00015
ДЛ	0,353	0,167		0,00034	0,00011	0,00016
Привитые	0,0053	0,00016	0,00034		0,893	0,353
Непривитые	0,030	0,00017	0,0011	0,893		0,0728
Контроль	0,00034	0,00015	0,00016	0,353	0,0728	
p (Kruskal-Wallis) p=0,067						
720-час. биопленочная	БН	ДТ	ДЛ	П	НП	Контроль
М±m	3,33±0,67	0,67±0,09	1,33±0,13	4,33±0,28	4,0±0,41	4,33±0,25
Me	3,0	1,0	1,0	4,0	4,0	4,0
[25-75]	2,0-5,0	0-1,0	1,0-2,0	4,0-5,0	3,0-4,0	4,0-5,0
БН		0,028	0,129	0,732	0,932	0,732
ДТ	0,028		0,932	0,0028	0,0060	0,0028
ДЛ	0,129	0,932		0,0128	0,028	0,0128
Привитые	0,732	0,00288	0,0128		0,996	1,0
Непривитые	0,932	0,0060	0,028	0,996		0,996
Контроль	0,732	0,00288	0,0128	1,0	0,996	
p (Kruskal-Wallis) p=0,297						

Условные обозначения: жирным шрифтом обозначено достоверное различие между группами при попарном сравнении с поправкой Бонферрони при $p \leq 0,05$;

БН – бактерионосители; ДТ – дифтерия ротоглотки токсическая; ДЛ – дифтерия ротоглотки локализованная; П – привитые АКДС- и АДС-М-препаратами; НП – непривитые АКДС- и АДС-М-препаратами.

Влияние сыворотки крови бактерионосителей и больных дифтерией на показатели адгезии (КОЕ/мл) штамма *C. diphtheriae mitis tox+* № 269

Типовая культура	Сыворотка крови					
	БН	ДТ	ДЛ	П	НП	Контроль
M±m	10,7±0,67	3,3±0,13	2,0±0,44	16,0±1,04	16,7±1,17	17,7±1,56
Me	10,0	3,0	2,0	16,0	17,0	18,0
[25-75]	10,0-12,0	3,0-4,0	1,0-3,0	15,0-17,0	15,0-18,0	17,0-18,0
БН		0,00016	0,00015	0,00051	0,00026	0,00017
ДТ	0,00016		0,619	0,00015	0,00015	0,00015
ДЛ	0,00015	0,619		0,00015	0,00015	0,00015
Привитые	0,00051	0,00015	0,00015		0,963	0,402
Непривитые	0,00026	0,00015	0,00015	0,963		0,832
Контроль	0,00017	0,00015	0,00015	0,402	0,832	
p (Kruskal-Wallis) p=0,084						
120-час. биопленочная	БН	ДТ	ДЛ	П	НП	Контроль
M±m	7,0±0,17	8,3±0,38	7,3±0,91	11,7±0,96	13,0±0,83	22,0±1,15
Me	4,0	8,0	7,0	12,0	13,0	22,0
[25-75]	6,0-8,0	8,0-9,0	7,0-8,0	10,0-13,0	12,0-14,0	20,0-24,0
БН		0,762	0,999	0,0056	0,00080	0,00015
ДТ	0,762		0,909	0,522	0,00565	0,00015
ДЛ	0,999	0,909		0,00976	0,00124	0,00015
Привитые	0,0056	0,0522	0,00976		0,762	0,00015
Непривитые	0,00080	0,00565	0,00124	0,762		0,00016
Контроль	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00016	
p (Kruskal-Wallis) p=0,084						
720-час. биопленочная	БН	ДТ	ДЛ	П	НП	Контроль
M±m	9,0±,07	4,0±0,63	14,0±1,27	3,7±0,13	4,0±0,40	23,0±1,36
Me	9,0	4,0	14,0	4,0	4,0	23,0
[25-75]	8,0-10,0	3,0-5,0	13,0-15,0	3,0-4,0	3,0-5,0	22,0-24,0
БН		0,00045	0,00045	0,00030	0,00045	0,00015
ДТ	0,00045		0,00015	0,997	1,0	0,00015
ДЛ	0,00045	0,00015		0,00015	0,00015	0,00015
Привитые	0,00030	0,997	0,00015		0,997	0,00015
Непривитые	0,00045	1,0	0,00015	0,997		0,00015
Контроль	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	
p (Kruskal-Wallis) p=0,104						

Условные обозначения: жирным шрифтом обозначено достоверное различие между группами при попарном сравнении с поправкой Бонферрони при $p \leq 0,05$;

БН – бактерионосители; ДТ – дифтерия ротоглотки токсическая; ДЛ – дифтерия ротоглотки локализованная; П – привитые АКДС- и АДС-М-препаратами; НП – непривитые АКДС- и АДС-М-препаратами.

Влияние сыворотки крови бактерионосителей и больных дифтерией на показатели адгезии (КОЕ/мл) штамма *C. diphtheriae gravis* (с «молчащим» тох-геном)

Типовая культура	Сыворотка крови					
	БН	ДТ	ДЛ	П	НП	Контроль
M±m	10,7±0,33	5,3±1,20	5,0±0,58	1,0±0,67	14,0±1,13	20,0±2,31
Me	11,0	6,0	5,0	11,0	14,0	20,0
[25-75]	10,0-11,0	3,0-7,0	4,0-6,0	10,0-12,0	13,0-15,0	19,0-21,0
БН		0,0017	0,0010	0,999	0,047	0,00016
ДТ	0,0017		0,999	0,0010	0,00016	0,00015
ДЛ	0,0010	0,999		0,00069	0,00016	0,00015
Привитые	0,999	0,0010	0,00069		0,0825	0,00016
Непривитые	0,047	0,00016	0,00016	0,0825		0,00069
Контроль	0,00016	0,00016	0,00015	0,00016	0,00069	
p (Kruskal-Wallis) p=0,075						
120-час. биопленочная	БН	ДТ	ДЛ	П	НП	Контроль
M±m	8,0±0,43	9,3±1,11	7,7±0,45	7,7±0,56	13,7±0,95	18,7±1,07
Me	8,0	9,0	8,0	8,0	14,0	19,0
[25-75]	7,0-9,0	9,0-10,0	7,0-8,0	7,0-8,0	12,0-15,0	18,0-19,0
БН		0,472	0,999	0,996	0,000197	0,00015
ДТ	0,472		0,260	0,260	0,00078	0,00015
ДЛ	0,996	0,260		1,0	0,00017	0,00015
Привитые	0,996	0,260	1,0		0,00017	0,00015
Непривитые	0,00019	0,00078	0,00017	0,00017		0,00030
Контроль	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00030	
p (Kruskal-Wallis) p=0,229						
720-час. биопленочная	БН	ДТ	ДЛ	П	НП	Контроль
M±m	6,3±0,29	7,3±0,15	7,0±0,48	5,7±0,41	16,0±0,52	18,3±1,14
Me	6,0	7,0	7,0	6,0	16,0	18,0
[25-75]	6,0-7,0	7,0-8,0	6,0-8,0	5,0-6,0	16,0-16,0	18,0-16,0
БН		0,413	0,775	0,775	0,00015	0,00015
ДТ	0,4132		0,983	0,057	0,00015	0,00015
ДЛ	0,775	0,983		0,165	0,00015	0,00015
Привитые	0,775	0,057	0,165		0,00015	0,00015
Непривитые	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015		0,0064
Контроль	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,0064	
p (Kruskal-Wallis) p=0,105						

Условные обозначения: жирным шрифтом обозначено достоверное различие между группами при попарном сравнении с поправкой Бонферрони при $p \leq 0,05$;

БН – бактерионосители; ДТ – дифтерия ротоглотки токсическая; ДЛ – дифтерия ротоглотки локализованная; П – привитые АКДС- и АДС-М-препаратами; НП – непривитые АКДС- и АДС-М-препаратами.

Влияние сыворотки крови бактерионосителей и больных дифтерией на показатели инвазии (КОЕ/мл) штамма *C. diphtheriae gravis tox+* (циркулирующий)

Типовая культура	Сыворотка крови					
	БН	ДТ	ДЛ	П	НП	Контроль
M±m	27,7±3,22	0,3±0,06	0,7±0,02	12,0±0,64	24,7±1,05	24,3±0,42
Me	27,0	0,3	10,	12,0	24,0	24,0
[25-75]	21,0-35,0	0-1,0	0-1,0	11,0-13,0	24,0-26,0	24,0-25,0
БН		0,00015	0,00015	0,000794	0,911	0,747
ДТ	0,00015		0,999	0,0382	0,00016	0,00015
ДЛ	0,00015	0,999		0,0410	0,00017	0,00015
Привитые	0,00079	0,000382	0,0410		0,0187	0,00725
Непривитые	0,911	0,00016	0,00017	0,0187		0,999
Контроль	0,747	0,00015	0,00015	0,00724	0,999	
p (Kruskal-Wallis) p=0,040						
120-час. биопленочная	БН	ДТ	ДЛ	П	НП	Контроль
M±m	1,3±0,33	1,0±0,01	1,0±0,01	0	0,7±0,05	18,0±1,08
Me	1,0	1,0	1,0	0	1,0	18,0
[25-75]	1,0-2,0	1,0-1,0	1,0-1,0	0	0-1,0	17,0-19,0
БН		0,966	0,966	0,0771	0,642	0,00015
ДТ	0,966		1,0	0,256	0,966	0,00015
ДЛ	0,966	1,0		0,256	0,966	0,00015
Привитые	0,077	0,256	0,256		0,642	0,00015
Непривитые	0,642	0,966	0,966	0,642		0,00015
Контроль	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	
p (Kruskal-Wallis) p=0,120						
720-час. биопленочная	БН	ДТ	ДЛ	П	НП	Контроль
M±m	3,3±0,3	0,7±0,09	0,7±0,04	0,7±0,02	0,7±0,01	16,7±2,36
Me	3,0	1,0	1,0	1,0	1,0	17,0
[25-75]	3,0-4,0	0-1,0	0-1,0	0-1,0	0-1,0	16,0-17,0
БН		0,00012	0,00012	0,00012	0,00012	0,00015
ДТ	0,00012		1,0	1,0	1,0	0,00015
ДЛ	0,00012	1,0		1,0	1,0	0,00015
Привитые	0,00012	1,0	1,0		1,0	0,00015
Непривитые	0,00012	1,0	1,0	1,0		0,00015
Контроль	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	
p (Kruskal-Wallis) p=0,221						

Условные обозначения: жирным шрифтом обозначено достоверное различие между группами при попарном сравнении с поправкой Бонферрони при $p \leq 0,05$;

БН – бактерионосители; ДТ – дифтерия ротоглотки токсическая; ДЛ – дифтерия ротоглотки локализованная; П – привитые АКДС- и АДС-М-препаратами; НП – непривитые АКДС- и АДС-М-препаратами.

Влияние сыворотки крови бактерионосителей и больных дифтерией на показатели инвазии (КОЕ/мл) штамма *C. diphtheriae gravis tox+* № 665

Типовая культура	Сыворотка крови					
	БН	ДТ	ДЛ	П	НП	Контроль
M±m	3,05±0,56	0,33±0,11	0,67±0,09	0,33±0,07	5,67±0,71	6,33±0,74
Me	4,0	0,3	1,0	0,3	5,0	6,5
[25-75]	3,0-4,0	0-1,0	0-1,0	0-1,0	5,0-7,0	6,0-7,0
БН		0,0110	0,0258	0,0110	0,128	0,00050
ДТ	0,0110		0,999	1,0	0,00037	0,00016
ДЛ	0,0258	0,999		0,999	0,00064	0,00016
Привитые	0,0110	1,0	0,999		0,00035	0,00016
Непривитые	0,128	0,00037	0,00064	0,00037		0,958
Контроль	0,0050	0,00016	0,00016	0,00016	0,958	
p (Kruskal-Wallis) p=0,017						
120-час. биопленочная	БН	ДТ	ДЛ	П	НП	Контроль
M±m	0,67±0,07	0,33±0,09	0,67±0,04	0,33±0,05	0,67±0,11	5,0±0,28
Me	1,0	0,3	1,0	0,3	1,0	5,0
[25-75]	0-1,0	0-1,0	0-1,0	0-1,0	0-1,0	4,0-6,0
БН		0,988	1,0	0,988	1,0	0,00019
ДТ	0,988		0,988	1,0	0,988	0,00016
ДЛ	1,0	0,988		0,988	1,0	0,00019
Привитые	0,988	1,0	0,988		0,988	0,00016
Непривитые	1,0	0,988	1,0	0,988		0,00019
Контроль	0,00019	0,00016	0,00019	0,00019	0,00019	
p (Kruskal-Wallis) p=0,100						
720-час. биопленочная	БН	ДТ	ДЛ	П	НП	Контроль
M±m	0,67±0,02	0,67±0,03	2,0±0,06	0,67±0,01	0,67±0,02	4,0±0,58
Me	1,0	1,0	2,0	1,0	1,0	4,0
[25-75]	0-1,0	0-1,0	1,0-3,0	0-1,0	0-1,0	3,0-5,0
БН		1,0	0,308	1,0	1,0	0,00162
ДТ	1,0		0,308	1,0	1,0	0,00016
ДЛ	0,308	0,308		0,308	0,308	0,0565
Привитые	1,0	1,0	0,308		1,0	0,00162
Непривитые	1,0	1,0	0,308	1,0		0,00162
Контроль	0,00162	0,00162	0,0565	0,00162	0,00162	
p (Kruskal-Wallis) p=0,447						

Условные обозначения: жирным шрифтом обозначено достоверное различие между группами при попарном сравнении с поправкой Бонферрони при $p \leq 0,05$;

БН – бактерионосители; ДТ – дифтерия ротоглотки токсическая; ДЛ – дифтерия ротоглотки локализованная; П – привитые АКДС- и АДС-М-препаратами; НП – непривитые АКДС- и АДС-М-препаратами.

Влияние сыворотки крови бактерионосителей и больных дифтерией на показатели инвазии (КОЕ/мл) штамма *C. diphtheriae gravis tox+* № 6765

Типовая культура	Сыворотка крови					
	БН	ДТ	ДЛ	П	НП	Контроль
М±m	0	0	0	0	0	0
Me	0	0	0	0	0	0
[25-75]	0	0	0	0	0	0
БН	0	0	0	0	0	0
ДТ	0	0	0	0	0	0
ДЛ	0	0	0	0	0	0
Привитые	0	0	0	0	0	0
Непривитые	0	0	0	0	0	0
Контроль	0	0	0	0	0	0
p (Kruskal-Wallis) p=0						
120-час. биопленочная	БН	ДТ	ДЛ	П	НП	Контроль
М±m	0	0	0	0	0	0
Me	0	0	0	0	0	0
[25-75]	0	0	0	0	0	0
БН	0	0	0	0	0	0
ДТ	0	0	0	0	0	0
ДЛ	0	0	0	0	0	0
Привитые	0	0	0	0	0	0
Непривитые	0	0	0	0	0	0
Контроль	0	0	0	0	0	0
p (Kruskal-Wallis) p=0						
720-час. биопленочная	БН	ДТ	ДЛ	П	НП	Контроль
М±m	0,67±0,02	0	0	0,67±0,04	0,67±0,01	0,67±0,06
Me	1,0	0	0	1,0	1,0	1,0
[25-75]	0-1,0	0	0	0-1,0	0-1,0	0-1,0
БН		0,538	0,538	1,0	1,0	1,0
ДТ	0,538		1,0	0,538	0,538	0,538
ДЛ	0,538	1,0		0,538	0,538	0,538
Привитые	1,0	0,538	0,538		1,0	1,0
Непривитые	1,0	0,538	0,538	1,0		1,0
Контроль	1,0	0,538	0,538	1,0	1,0	
p (Kruskal-Wallis) p=2,359						

Условные обозначения: жирным шрифтом обозначено достоверное различие между группами при попарном сравнении с поправкой Бонферрони при $p \leq 0,05$;

БН – бактерионосители; ДТ – дифтерия ротоглотки токсическая; ДЛ – дифтерия ротоглотки локализованная; П – привитые АКДС- и АДС-М-препаратами; НП – непривитые АКДС- и АДС-М-препаратами.

Влияние сыворотки крови бактерионосителей и больных дифтерией на показатели инвазии (КОЕ/мл) штамма *C. diphtheriae mitis tox+* № 269

Типовая культура	Сыворотка крови					
	БН	ДТ	ДЛ	П	НП	Контроль
М±m	24,7±0,88	10,7±0,33	15,0±0,58	26,6±0,33	30,0±1,14	31,0±2,37
Me	25,0	11,0	15,0	26,0	30,	31,0
[25-75]	23,0-26,0	10,0-11,0	14,0-16,0	26,0-27,0	29,0-31,0	30,0-32,0
БН		0,00015	0,00015	0,375	0,00043	0,00020
ДТ	0,00015		0,00208	0,00015	0,00015	0,00015
ДЛ	0,00015	0,00208		0,00015	0,00015	0,00015
Привитые	0,375	0,00015	0,00015		0,00752	0,00011
Непривитые	0,00043	0,00015	0,00015	0,00752		0,817
Контроль	0,00020	0,00015	0,00015	0,00011	0,817	
p (Kruskal-Wallis) p=0,063						
120-час. биопленочная	БН	ДТ	ДЛ	П	НП	Контроль
М±m	1,0±0,01	1,7±0,04	1,3±0,11	1,3±0,10	1,0±0,01	30,7±2,74
Me	1,0	2,0	1,0	1,0	1,0	31,0
[25-75]	1,0-1,0	1,0-2,0	1,0-2,0	1,0-2,0	1,0-1,0	30,0-31,0
БН		0,538	0,947	0,947	1,0	0,00015
ДТ	0,538		0,947	0,947	0,538	0,00015
ДЛ	0,947	0,947		1,0	0,947	0,00015
Привитые	0,947	0,947	1,0		0,947	0,00015
Непривитые	1,0	0,538	0,947	0,947		0,00015
Контроль	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	
p (Kruskal-Wallis) p=0,384						
720-час. биопленочная	БН	ДТ	ДЛ	П	НП	Контроль
М±m	1,0±0,01	6,0±0,58	3,3±0,07	3,3±0,04	5,3±0,05	24,0±1,13
Me	1,0	6,0	3,0	3,0	5,0	24,0
[25-75]	1,0-1,0	5,0-7,0	3,0-4,0	3,0-4,0	5,0-6,0	23,0-25,0
БН		0,538	0,538	1,0	1,0	1,0
ДТ	0,538		1,0	0,538	0,538	0,538
ДЛ	0,538	1,0		0,538	0,538	0,538
Привитые	1,0	0,538	0,538		1,0	1,0
Непривитые	1,0	0,538	0,538	1,0		1,0
Контроль	1,0	0,538	0,538	1,0	1,0	
p (Kruskal-Wallis) p= p=0,067						

Условные обозначения: жирным шрифтом обозначено достоверное различие между группами при попарном сравнении с поправкой Бонферрони при $p \leq 0,05$;

БН – бактерионосители; ДТ – дифтерия ротоглотки токсическая; ДЛ – дифтерия ротоглотки локализованная; П – привитые АКДС- и АДС-М-препаратами; НП – непривитые АКДС- и АДС-М-препаратами.

Влияние сыворотки крови бактерионосителей и больных дифтерией на показатели инвазии (КОЕ/мл) штамма *C. diphtheriae gravis* (с «молчащим» *tox*-геном)

Типовая культура	Сыворотка крови					
	БН	ДТ	ДЛ	П	НП	Контроль
М±m	26,0±1,15	13,7±1,07	13,3±0,96	29,0±1,13	3,3±1,17	34,7±2,05
Me	26,0	14,0	13,0	29,0	30,0	34,0
[25-75]	25,0-27,0	12,0-15,0	12,0-15,0	28,0-30,0	29,0-32,0	34,0-36,0
БН		0,00015	0,00015	0,125	0,0158	0,00018
ДТ	0,00015		0,999	0,00015	0,00015	0,00015
ДЛ	0,00015	0,999		0,00015	0,00015	0,00015
Привитые	0,125	0,00015	0,00015		0,807	0,00214
Непривитые	0,0158	0,00015	0,00015	0,807		0,0158
Контроль	0,00018	0,00015	0,00015	0,00021	0,0158	
p (Kruskal-Wallis) p=0,072						
120-час. биопленочная	БН	ДТ	ДЛ	П	НП	Контроль
М±m	1,3±0,07	2,3±0,15	3,3±0,04	1,7±0,05	2,0±0,04	34,0±2,87
Me	1,0	2,0	3,0	2,0	2,0	34,0
[25-75]	1,0-2,0	2,0-3,0	3,0-4,0	1,0-2,0	1,0-3,0	33,0-35,0
БН		0,588	0,0656	0,992	0,874	0,00015
ДТ	0,588		0,588	0,874	0,992	0,00015
ДЛ	0,056	0,588		0,137	0,308	0,00015
Привитые	0,992	0,874	0,137		0,992	0,00015
Непривитые	0,874	0,992	0,308	0,992		0,00015
Контроль	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	
p (Kruskal-Wallis) p=0,229						
720-час. биопленочная	БН	ДТ	ДЛ	П	НП	Контроль
М±m	6,7±0,05	2,7±0,02	1,0±0,01	1,3±0,05	5,4±0,04	20,3±2,17
Me	7,0	3,0	1,0	1,0	6,0	20,0
[25-75]	6,0-7,0	2,0-3,0	1,0-1,0	1,0-1,0	5,0-6,0	20,0-21,0
БН		0,413	0,775	0,775	0,00015	0,00015
ДТ	0,413		0,983	0,0577	0,00015	0,00015
ДЛ	0,775	0,983		0,165	0,00015	0,00015
Привитые	0,775	0,057	0,165		0,00015	0,00015
Непривитые	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015		0,00648
Контроль	0,00015	0,00015	0,00015	0,00015	0,00648	
p (Kruskal-Wallis) p=0,060						

Условные обозначения: жирным шрифтом обозначено достоверное различие между группами при попарном сравнении с поправкой Бонферрони при $p \leq 0,05$;

БН – бактерионосители; ДТ – дифтерия ротоглотки токсическая; ДЛ – дифтерия ротоглотки локализованная; П – привитые АКДС- и АДС-М-препаратами; НП – непривитые АКДС- и АДС-М-препаратами.