

ФРОЛОВА ЯНА НИКОЛАЕВНА

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИОПЛЁНОК  
ШТАММОВ *C. DIPHTHERIAE GRAVIS* TOX<sup>+</sup>**

03.02.03 – «микробиология»

03.01.06 – «биотехнология»

(в том числе бионанотехнологии)

Автореферат

на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Ростов-на-Дону

2015

Работа выполнена на кафедре микробиологии и вирусологии № 2 Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Ростовский Государственный Медицинский Университет» Минздрава России

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук, профессор **Харсеева Галина Георгиевна**

доктор медицинских наук, профессор **Миронов Андрей Юрьевич**

**Официальные оппоненты:**

**Краева Людмила Александровна**, доктор медицинских наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по защите прав потребителей и благополучию человека России, ведущий научный сотрудник;

**Червинец Вячеслав Михайлович**, доктор медицинских наук, профессор, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России, заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии и иммунологии

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения России.

Защита состоится «25» сентября 2015 года в 13<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по защите прав потребителей и благополучию человека России по адресу:

142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск, кор. № 1, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по защите прав потребителей и благополучию человека России.

Учёный секретарь

диссертационного совета

кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** В настоящее время заболеваемость дифтерией в России и Европейских странах регистрируется на спорадическом уровне благодаря проводимой вакцинопрофилактике (Маркина С.С., 2006; Онищенко Г.Г., 2007; Максимова Н.М., 2008). Вакцинация населения противодифтерийными препаратами, содержащими дифтерийный анатоксин, способствует снижению уровня заболеваемости дифтерией, но не препятствует формированию бактерионосительства, поддерживающего скрытое течение эпидемического процесса (Кветная А.С., 2000; Костюкова Н.Н., 2001; Анохин В.А., 2004; Маркина С.С., 2005).

Учитывая невозможность полной элиминации возбудителя, опасность дифтерии не ослабевает. Подтверждением тому явился резкий подъём заболеваемости дифтерией в России в 1994-1996 г.г., обусловленный снижением уровня коллективного антитоксического иммунитета. В связи с этим необходим постоянный мониторинг циркулирующих штаммов *Corynebacterium diphtheriae* и проведение профилактических мероприятий, направленных на предотвращение возникновения и распространения данной инфекции (Маркина С.С., 1996; Максимова Н. М., 2006; Борисова О. Ю., 2009; Мазурова И.К., 2009).

Важное значение в расшифровке патогенетических механизмов развития дифтерии имеет характеристика биологических свойств возбудителя, факторов его патогенности, способности к адгезии, колонизации, персистенции на слизистых оболочках респираторного тракта (Костюкова Н.Н., 1999; Ott L., 2012; Харсеева Г.Г., 2014). Основная роль в развитии заболевания принадлежит дифтерийному токсину, однако ранние стадии инфекции обусловлены, прежде всего, поверхностными структурами бактериальной клетки *C. diphtheriae* (Hultgren S.J., 1993; Ott L., 2012), которые, по всей видимости, обуславливают её способность образовывать биоплёнки. Биоплёнки микроорганизмов ответственны за развитие многих хронических процессов (Вознесенский Н.А., 2008; Маянский А.Н., 2012; Costerton J. W., 1999; Parsek M.R., 2003). Процесс дифтерийного бактерионосительства может быть связан с формированием биоплёнок штаммами токсигенных коринебактерий и представителей условно-патогенной микрофлоры верхних дыхательных путей. Для борьбы с бактерионосительством используют антибиотики широкого спектра действия (эритромицин, сумамед, рифампицин, ципрофлоксацин), что является патогенетической основой элиминации возбудителя (Иванова В.В., 2000). Благодаря существованию в виде микробных сообществ — биоплёнок — бактерии более защищены от воздействия антибактериальных препаратов, а также факторов врождённого и адаптивного клеточного и гуморального иммунитета (Романова Ю.М. 2011; Maira-Litran, T., 2000; Lewis, K, 2012). В составе биоплёнок микроорганизмы выживают в присутствии антибиотиков, количество которых в 500-1000 раз превышает их

минимальную подавляющую концентрацию (МПК), а клетки иммунной системы — фагоциты — теряют свою способность как к завершённому, так и незавершённому фагоцитозу (Тец В.В., 2006; Бехало В.А., 2010; Peeters E., 2008; Li Ch., 2011). Поскольку отдельные клетки бактерий менее защищены, чем бактерии в составе биоплёнки, антибактериальный препарат, высокоактивный *in vitro* при тестировании в чистой культуре, в испытаниях *in vivo* при преобладании фенотипа биоплёнок может оказаться неэффективным. Возможно, это является одной из причин трудностей, возникающих при санации бактерионосителей, и поэтому изучение процесса биоплёнкообразования у *C. diphtheriae* открывает перспективы для разработки новых подходов к эффективному лечению и профилактике дифтерийного бактерионоительства и дифтерии.

**Степень разработанности темы исследования.** В настоящее время имеется обширный мировой и отечественный опыт по изучению возбудителя дифтерии, его основных биологических свойств, факторов патогенности и их роли в иммунитете и патогенезе заболевания. Для современной медицины остаётся недостаточно исследованным вопрос о причинах формирования бактерионоительства в человеческой популяции. Одним из возможных механизмов развития бактерионоительства может явиться способность *Corynebacterium diphtheriae* образовывать биоплёнки. Работы по исследованию свойств *Corynebacterium diphtheriae* в составе биоплёнок крайне малочисленны и посвящены исследованию способности к адгезии и формированию биоплёнки на абиогенных/биогенных поверхностях (Mandlik A., 2007), а также влиянию субингибирующих концентраций антибиотиков на процесс биоплёнкообразования (Gomes, D. L. R., 2013). Исследование механизмов формирования биоплёнок *Corynebacterium diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>*, устойчивости их в составе биоплёнок к ряду антибактериальных препаратов, характера воздействия на клетки иммунной системы человека, как в России, так и за рубежом по-прежнему остаются малоизученными. Рассмотрение всех этих аспектов позволит расширить представления о причинах и механизмах формирования дифтерийного бактерионоительства и поможет разработать более эффективные подходы к проведению санации бактерионосителей токсигенных штаммов коринебактерий.

**Цель исследования** - моделирование процесса биоплёнкообразования и характеристика основных биологических свойств *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* в составе биоплёнки.

#### **Задачи исследования:**

1. Исследовать способность возбудителя дифтерии к формированию биоплёнки.
2. Изучить структуру однородных микробных сообществ штаммов *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* при формировании биоплёнок *in vitro*.
3. Провести сравнительное исследование основных биологических (культуральных, фермен-

тативных, токсигенных) свойств типовой и биоплёночных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae*.

4. Изучить способность *C. diphtheriae* в составе биоплёнки индуцировать процессы апоптоза и фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов мышей *in vitro*.
5. Изучить чувствительность к антибактериальным препаратам возбудителя дифтерии в составе биоплёнки.

#### **Научная новизна результатов исследования**

1. Показана способность возбудителя дифтерии к формированию биоплёнки *in vitro*.
2. Впервые исследована морфология однородных микробных сообществ *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* при помощи электронной сканирующей микроскопии.
3. Впервые исследованы основные биологические (культуральные, ферментативные, токсигенные) свойства биоплёночных культур *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>*.
4. Впервые изучена способность возбудителя дифтерии в составе биоплёнки индуцировать процессы апоптоза и фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов мышей, а также показано регуляторное воздействие нейтрофилокинов (НфК) на данные процессы.
5. Исследована антибиотикочувствительность штаммов *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* в составе биоплёнки *in vitro*. Выявлены антибиотики, к которым сохранена чувствительность *C. diphtheriae* в составе биоплёнки *in vitro*. Разработан способ определения минимальной подавляющей концентрации антибактериального препарата (патент РФ на изобретение № 2491348 от 27.08.2013г.).

**Теоретическая и практическая значимость исследования.** Полученные данные расширяют представления о возможных механизмах длительной персистенции токсигенных штаммов *C. diphtheriae* в организме. Результаты, свидетельствующие о стимулирующем воздействии НфК на макрофаги (повышение их переваривающей активности и устойчивости к апоптогенному эффекту возбудителя дифтерии), могут быть использованы для разработки подходов к коррекции иммунного ответа с помощью цитокинов у бактерионосителей токсигенных штаммов *C. diphtheriae*. Данные об антибиотикочувствительности токсигенных штаммов *C. diphtheriae* возможно применять при назначении рациональной антибиотикотерапии бактерионосителей. Разработан и внедрён в практику способ определения минимальной подавляющей концентрации антибактериального препарата (патент РФ на изобретение № 2491348 от 27.08.2013г.), позволяющий более точно подобрать необходимый антибиотик, что позволит повысить эффективность санации бактерионосителей токсигенных штаммов *C. diphtheriae*.

**Методология и методы исследования.** Методология диссертационной работы спланирована в соответствии со структурой и задачами исследования. Предметом исследования явилось моделирование процесса биоплёнкообразования и характеристика основных биологических свойств *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* в составе биоплёнки. Объектом исследования послужили типовая и биоплёночные (120- и 720-часовые) культуры музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* № 665, полученного из ГИСК им. Л. А. Тарасевича, и циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>*, любезно предоставленного бактериологической лабораторией ФГУ «1002 ЦГСЭН СКВО» г. Ростова-на-Дону.

В ходе работы изучена способность возбудителя дифтерии к биоплёнкообразованию, структура биоплёнки, биологические свойства (культуральные, ферментативные, токсигенные) типовой и биоплёночных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae*, их влияние на клетки иммунной системы экспериментальных животных (беспородных белых мышей).

Научная литература, посвящённая исследованиям в области процессов биоплёнкообразования, проанализирована формально-логическими методами. В работе использованы бактериологические, электронно-микроскопические, молекулярно-генетические, биотехнологические и статистические методы исследования.

**Материалы и методы исследования.** В работе использованы типовая и биоплёночные (120- и 720-часовые) культуры музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* № 665, полученного из ГИСК им. Л. А. Тарасевича, и циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>*, выделенного от больного с диагнозом «локализованная форма дифтерии», предоставленного бактериологической лабораторией ФГУ «1002 ЦГСЭН СКВО» г. Ростова-на-Дону).

**Бактериологические методы.** Основные биологические свойства (морфологические, культуральные, ферментативные, токсигенные) типовых и биоплёночных культур *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* изучали согласно Методическим указаниям «Лабораторная диагностика дифтерии» (2008) и Приказу № 535 (1985).

**Электронно-микроскопические методы.** Изучение структуры биоплёнок музейного и циркулирующего штаммов токсигенного штаммов *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* проводили при помощи сканирующего электронного микроскопа S-450 (фирма «Hitachi», Япония) при ускоряющем напряжении 30 кВ.

**Молекулярно-генетические методы.** Идентификацию циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* проводили в соответствии с Методическим указаниям «Лабораторная диагностика дифтерии» (2008) и секвенированием по 16S рРНК (ЗАО «Синтол», г. Москва), согласно инструкции производителя оборудования. Наличие гена токсигенности у типовых и биоплёночных культур двух исследованных штаммов проводили с помощью ПЦР (тест-

система ООО «Литех»).

**Биотехнологические методы.** Моделирование процесса биоплёнкообразования штаммами *Corynebacterium diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* осуществляли в пластиковых (гидрофобных) и стеклянных (гидрофильных) пробирках, содержащих по 3 мл 20% сывороточного бульона, согласно методике P. L. Watnick, et. al. (2000).

**Статистическая обработка данных.** Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью персонального компьютера IBM PC/XT и статистического пакета «Statistica 6.0» для Windows XP с использованием параметрических и непараметрических методов статистики.

**Личное участие автора в получении результатов.** Автору принадлежит ведущая роль в выборе направления исследования, анализе и обобщении полученных результатов. В работах, выполненных в соавторстве, автором лично проведено моделирование процессов, мониторинг основных параметров, аналитическая и статистическая обработка, научное обоснование и обобщение полученных результатов. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования: постановка задач, способы их решения, обсуждение результатов в научных публикациях и докладах и их внедрение в практику.

#### **Результаты исследования внедрены в работу:**

- лаборатории бактериологических методов исследования ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» (имеется акт внедрения),
- использованы при чтении лекций и проведении лабораторных занятий со студентами, интернами, ординаторами, курсантами факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов на кафедре микробиологии и вирусологии № 2 ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России (имеется акт внедрения)

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Возбудитель дифтерии способен к формированию биоплёнки *in vitro*.
2. На электронно-микроскопическом уровне установлена обратная корреляция размеров бактериальных клеток токсигенных штаммов *C. diphtheriae* с интенсивностью образования матрикса.
3. При сравнительном анализе биологических свойств (культуральных, ферментативных, токсигенных) типовой и биоплёночных культур возбудителя дифтерии выявлены отличия по культуральным свойствам.
4. Возбудитель дифтерии в составе биоплёнки ингибирует функциональную активность

макрофагов и индуцирует процессы их апоптоза; препараты нейтрофилокинов оказывают регуляторное влияние на апоптоз и фагоцитарную активность макрофагов.

5. Наиболее эффективными (по данным МПК) антимикробными препаратами в отношении возбудителя дифтерии в составе биоплёнки *in vitro* являются гентамицин, а также канамицин и ванкомицин.

**Степень достоверности и апробация результатов исследования.** О достоверности полученных результатов работы свидетельствует достаточный объём проведённых исследований по изучению основных биологических свойств типовых и биоплёночных культур двух исследованных штаммов *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>*, проведённый с использованием бактериологических, электронно-микроскопических, молекулярно-генетических, биотехнологических, статистических методов исследования, характеризующихся высокой специфичностью и чувствительностью. Комплексное исследование типовых и биоплёночных (120- и 720- часовых) культур музейного и циркулирующего штаммов *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* позволило получить результаты, сопоставимые с данными литературы, что свидетельствует об их достоверности.

Диссертация апробирована на совместном заседании кафедры микробиологии и вирусологии № 2 и координационного совета ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол № 3 от 17. 03. 2015 г.).

**Материалы и результаты исследований доложены на:**

1. «65-ой Итоговой научной конференции молодых учёных ГБОУ ВПО РостГМУ» 22 апреля 2011 г., г. Ростов-на-Дону;
2. «Всероссийской научно-практической конференции с международным участием по медицинской микробиологии и клинической микологии (XVI Кашкинские чтения)» 19-21 июня 2013 г., г. Санкт-Петербург;
3. Региональной научно-практической конференции с международным участием «Проблемы антибиотикорезистентности возбудителей внутрибольничных инфекций» 9 июля 2013 г., г. Ростов-на-Дону;
4. Всероссийской научно-практической конференции «Воздушно-капельные инфекции: микробиология, биотехнология, иммунология, эпидемиология» 26 мая 2014 г., г. Ростов-на-Дону;
5. Всероссийском конкурсе «Лучшая научная статья — 2014» с вручением Диплома «Призёра» в номинации «Медицинские науки» за научную работу «Чувствительность к антибиотикам биоплёночных культур токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae*» (поста-

новление № 14/2 экспертного совета от 25.04.2014 г.) с последующим размещением конкурсной статьи в международном депозитарии научных изданий Университета Лунда — DOAJ (Лунд, Швеция) (Электронный ресурс: <http://e-koncept.ru/en/2014/54330.htm?download>);

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано всего 14 научных работ, из них – 6 тезисов и 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, 1 работа - в зарубежной печати. В публикациях содержится полный объём информации, касающейся темы диссертации. Получен патент РФ на изобретение № 2491348 от 27. 08. 2013 г. «Способ определения минимальной подавляющей концентрации антибактериального препарата».

**Структура и объём диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций, списка цитируемой литературы. Работа включает 118 страниц текста, 13 таблиц, 13 рисунков. Список литературы содержит 186 источника, из них - 66 отечественных и 120 зарубежных.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы

Объектом исследования послужили типовая и биоплёночные (120- и 720-часовые) культуры музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* № 665, полученного из ГИСК им. Л. А. Тарасевича, и циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>*, выделенного от больного с диагнозом «локализованная форма дифтерии», предоставленного бактериологической лабораторией ФГУ «1002 ЦГСЭН СКВО» г. Ростова-на-Дону. Идентификацию циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* проводили в соответствии с МУ «Лабораторная диагностика дифтерии» (2008) и секвенированием по 16S рРНК (ЗАО «Синтол», г. Москва).

Культивирование штаммов дифтерийных бактерий осуществляли в пластиковых (гидрофобных) и стеклянных (гидрофильных) микробиологических пробирках, содержащих по 3 мл мясо-пептонного бульона с добавлением 20% сыворотки крупно-рогатого скота (КРС) (рН 7,2-7,4). Тестирование штаммов на способность формировать биоплёнки проводили по методике P. L. Watnick, et. al. (2000). Интенсивность биоплёнкообразования штаммами возбудителя дифтерии оценивали, измеряя оптическую плотность окрашенной жидкости (ОП) на микропланшетном ридере при длине волны 540 нм. Жизнеспособность дифтерийных бактерий в биоплёнке определяли по уровню высеваемости биоплёночной культуры на кровяно-теллуриновом агаре через 48, 72, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264, 288, 312, 336, 360, 384, 408, 432, 456, 480, 504, 528, 552, 576, 600, 624, 648, 672, 696 и 720 часов культивирования.

Морфологические свойства *C. diphtheriae* проверяли в мазках, окрашенных по методу Грама, Нейссера и уксусно-метиленовой синькой Лёффлера. Электроно-микроскопическое исследование препаратов осуществляли путём погружения в среду культивирования нержавеющей подложки для поверхностной адгезии бактериальных клеток, формирующих биоплёнку. Образцы биоплёночной культуры токсигенных штаммов *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* № 665 и *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* (циркулирующий), адгезированные к подложке, подвергали химической фиксации. Образцы биоплёнки помещали на предметный столик сканирующего электронного микроскопа и напыляли золотом в напылительной вакуумной установке EicoIB-3 ioncoater (фирма «Eico», Япония) при ионном токе 6-8 мА. Полученные образцы исследовали в сканирующем электронном микроскопе S-450 (фирма «Hitachi», Япония) при ускоряющем напряжении 30 кВ. Культуральные свойства дифтерийных микробов исследовали при посеве культур на КТА и 20% сывороточный агар согласно МУ «Лабораторная диагностика дифтерии» (2008) и Приказу № 535 (1985). Ферментативные свойства изучали путём определения ферментов цистиназы (на среде Пизу), уреазы (гидролиз мочевины на скошенном агаре Кристенсена), а также по способности расщеплять глюкозу, сахарозу, мальтозу, крахмал, вызывать редукцию нитратов. Дезоксирибонуклеазную (ДНК-азную) активность бактериальных клеток определяли с помощью специальной среды – агара для теста на ДНКазу с толуидиновым синим (производство фирмы «HiMedia Laboratories Pvt.Ltd», Индия). Токсинообразование дифтерийных микробов определяли с помощью теста Элека (2003). Определение гена токсигенности штаммов *C. diphtheriae* проводили с использованием ПЦР.

Количественное определение содержания белка в составе биоплёночных микробных сообществ проводили по методике Lowry O.H. (1951), суммарную концентрацию углеводов – по методу Dubois M. (1956).

Влияние нейтрофилокинов (НфК) на клетки дифтерийных микробов оценивали согласно методу (Васильева Г.И., 2010). Фагоцитарную активность макрофагов определяли путём подсчёта фагоцитарного числа (ФЧ), фагоцитарного индекса (ФИ), индекса завершённости фагоцитоза. Апоптогенную активность типовых и биоплёночных культур музейного и циркулирующего штаммов *C. diphtheriae* в отношении перитонеальных макрофагов мышей изучали до и после добавления НфК *in vitro* по характерным морфологическим изменениям в клетках при окрашивании по Май-Грюнвальду и докрасиванием по Романовскому-Гимзе.

Чувствительность к антибиотикам типовых и биоплёночных культур музейного и циркулирующего штаммов *C. diphtheriae* определяли методом серийных разведений (микрометодом) в жидкой питательной среде (МУК 4.2.1890-04, Москва, 2004).

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью персональ-

ного компьютера *IBMPC/XT* и статистического пакета «Statistica 6.0» для *Windows XP* с использованием параметрических и непараметрических методов статистики.

### Результаты исследования

Для получения экспериментальной модели биоплёнки музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* № 665 и циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* использовали разные условия культивирования. В ходе сравнительного анализа интенсивности биоплёнкообразования штаммами *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* при культивировании их в пластиковых и стеклянных пробирках выявлены различия (рис. 1).

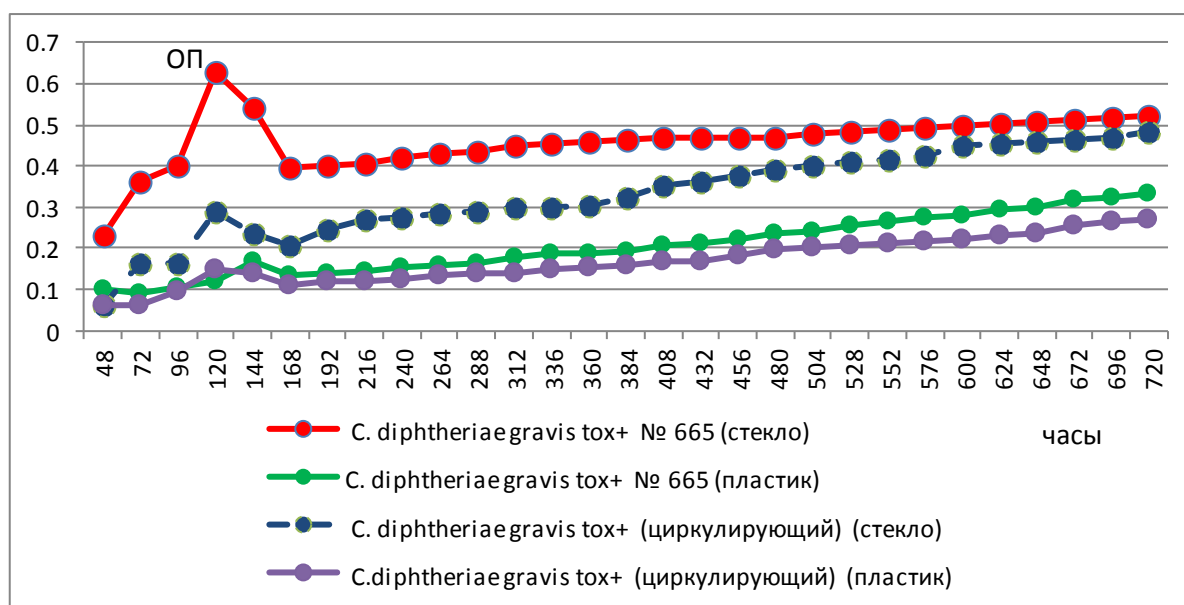


Рис. 1. Оптическая плотность (ОП) массы биоплёнки штаммов *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>*

Наиболее интенсивно процесс формирования биоплёнки у двух исследованных штаммов происходил на стекле (гидрофильной поверхности), чем на пластике (гидрофобной). При культивировании в стеклянных пробирках интенсивность образования массы биоплёнки музейным штаммом *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* № 665 колебалась в диапазоне от 0,233 до 0,524, циркулирующим - от 0,062 до 0,481 и была выше, чем при культивировании на пластике (0,101-0,331 и 0,060-0,269 соответственно). Динамика образования матрикса на стекле и пластике имела общие закономерности: значения ОП резко увеличивались к 120-му часу культивирования, снижались к 168 часу и постепенно нарастали далее до 720-го часа культивирования. Вероятно, повышенная степень колонизации дифтерийными микробами поверхности стекла связана с его адгезивными свойствами. Стекло в отличие от пластика гидрофильно и биологически инертно, что обеспечивало, по всей вероятности, более интенсивное прикрепление микробных клеток. Из пластика могут экстрагироваться водорастворимые органические соединения, а для стекла данный процесс не характерен.

При исследовании динамики показателей ОП планктонных клеток музейного и циркулирующего штаммов *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* при культивировании как в стеклянных, так и в пластиковых пробирках выявлена иная закономерность (рис. 2).

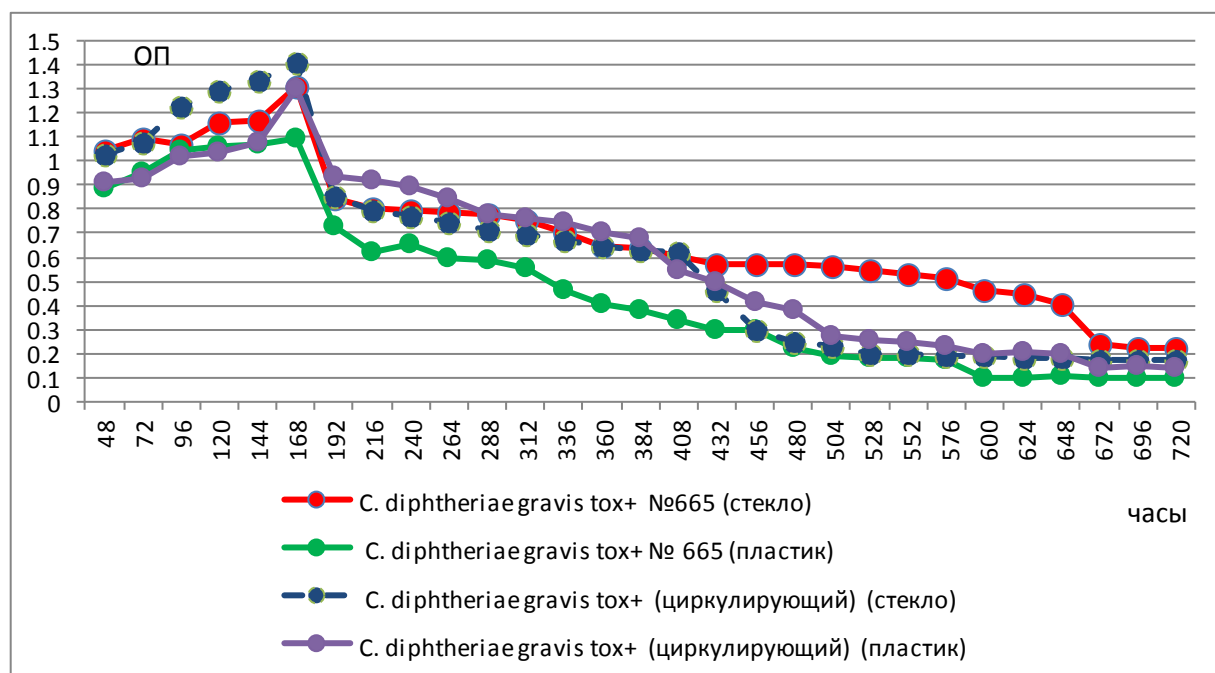


Рис. 2. Оптическая плотность (ОП) планктонных клеток штамма *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>*

В начале культивирования (до 168-го часа) наблюдали положительную тенденцию роста ОП планктонной культуры, а затем - резкое её снижение до 720 часа. Уменьшение оптической плотности планктонных клеток на поздних сроках культивирования свидетельствовало об отмирании большей части популяции бактерий.

Анализ динамики жизнеспособных свойств биоплёночных культур *C. diphtheriae* показал, что уровень высеваемости коринебактерий из массы биоплёнки на кровяно-теллуритовый агар до 168 часа культивирования у двух исследованных штаммов был низким ( $0,12 \times 10^6$ - $2,0 \times 10^6$  КОЕ/мл). Однако, к 192 часу роста происходило резкое его увеличение ( $5,5 \times 10^6$ - $19,0 \times 10^6$  КОЕ/мл), особенно у штаммов, выросших в стеклянных пробирках. Для планктонных культур характерна обратная закономерность: высокие показатели высеваемости двух исследованных штаммов обнаружены на ранних сроках культивирования (до 168 часа), низкие – на более поздних (до 720 часа).

При продолжительных сроках культивирования музейного и циркулирующего штаммов *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* между уровнем высеваемости бактерий из матрикса и планктонной культуры исследованных штаммов выявлена обратная закономерность. У циркулирующего штамма возбудителя дифтерии по сравнению с музейным количество матрикса (ОП - 0,290), образуемого на 120 час, ниже, но при высеve из него выросло

достаточно большое количество клеток бактерий ( $3,31 \times 10^6$  КОЕ/мл). Для музейного штамма высокое содержание матрикса (ОП - 0,630) на 120 час культивирования совпадало с более низкой, по сравнению с циркулирующим штаммом, высеваемостью клеток бактерий ( $2,9 \times 10^6$  КОЕ/мл). Аналогичные результаты получены и при изучении биоплёночных культур двух исследованных штаммов до 720 часа культивирования. Возможно, это связано с более высокой способностью циркулирующего штамма возбудителя дифтерии адаптироваться к условиям окружающей среды, быть более конкурентноспособным в борьбе за рецепторы адгезии в организме и, как следствие, формировать биоплёнку.

Электронно-микроскопическое исследование препаратов биоплёнок *C. diphtheriae* проводили на 120- и 720-й часы культивирования, что соответствовало пикам формирования матрикса музейным и циркулирующим штаммами *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* соответственно, при длительном их культивировании *in vitro* (рис. 3 (А, Б), 4 (А, Б)).

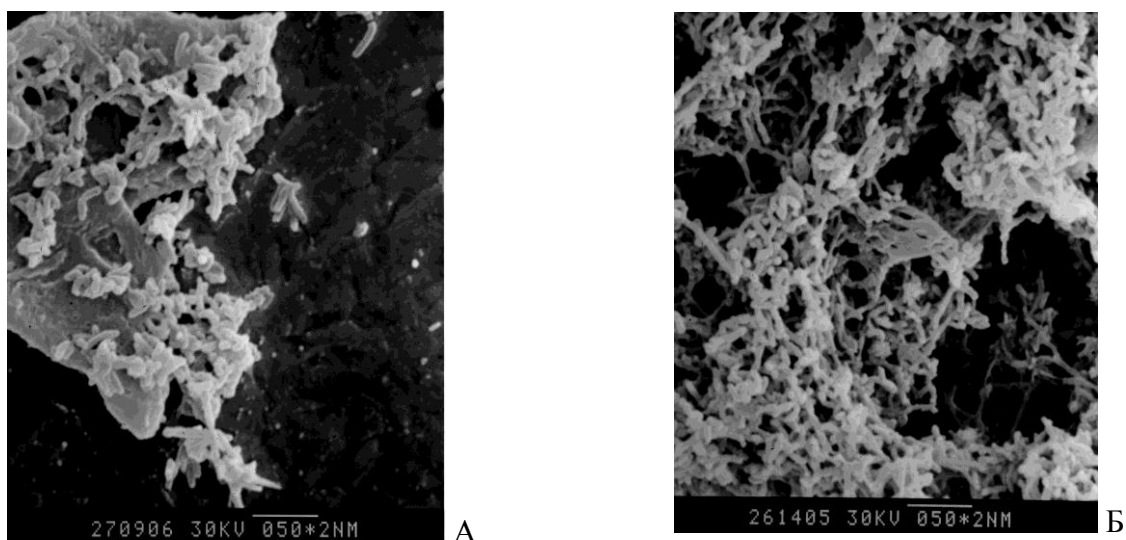


Рис. 3. Электронно-микроскопическое исследование 120-час. (А) и 720-час. (Б) биоплёночных культур штамма *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* № 665 при увеличении  $\times 3000$

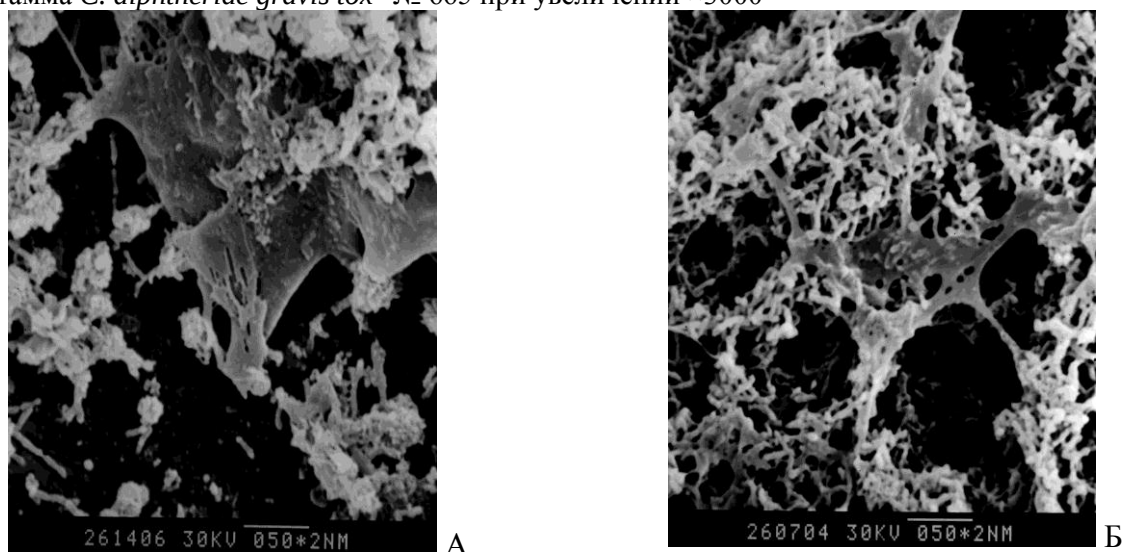


Рис. 4. Электронно-микроскопическое исследование 120-час. (А) и 720-час. (Б) биоплёночных культур штамма *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* (циркулирующий) при увеличении  $\times 3000$ .

В процессе формирования биоплёнки штаммами *C. diphtheriae tox<sup>+</sup>* количество синтезированных углеводов не изменялось, тогда как, содержание белка увеличивалось в 5-7 раз по сравнению с типовыми культурами двух исследованных штаммов. Возможно, это связано с интенсивным образованием поверхностных структур (пили, фимбрии, адгезины) бактериальных клеток *C. diphtheriae*, формирующих биоплёнку.

Использование сканирующей микроскопии позволило получить изображения, отражающие особенности морфологии биоплёночных культур возбудителя дифтерии.

Образованные *C. diphtheriae* биоплёнки представляли собой погруженные в матрикс конгломераты клеток, которые варьировали по плотности, создавая открытые области, являющиеся, вероятно, водными каналами. Матрикс имел вид множества слизистых, соединяющихся между собой «тяжей паутины», которые покрывали микробные клетки общим слоем.

Клетки бактерий как музейного, так и циркулирующего штаммов *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* в процессе биоплёнкообразования обладали разобшённым во времени процессом формирования матрикса, что сопровождалось изменением их размеров и пространственной организации.

При анализе изменений размеров бактерий музейного и циркулирующего штаммов *C. diphtheriae* при формировании биоплёнки установлена их обратная корреляция с интенсивностью образования матрикса. При максимальном содержании матрикса, которое приходилось на разные сроки культивирования для двух исследованных штаммов возбудителя дифтерии, наблюдали уменьшение размеров клеток коринебактерий.

На пике образования матрикса (120-й час) длина клеток бактерий музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* № 665 составляла  $1,4 \pm 0,08$  мкм. При более длительных сроках культивирования данного штамма (720-й час) содержание матрикса меньше, однако длина клеток достоверно ( $p \leq 0,05$ ) больше ( $1,7 \pm 0,1$  мкм). При исследовании размеров клеток циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* обнаружена аналогичная закономерность: при максимальном количестве массы биоплёнки, который у данного штамма приходился на 720-й час культивирования, длина клеток ( $1,3 \pm 0,05$  мкм) меньше ( $p \leq 0,05$ ), чем на более раннем (120-й час) этапе биоплёнкообразования ( $1,6 \pm 0,05$  мкм).

При сравнении культуральных свойств типовой и биоплёночных культур исследованных штаммов возбудителя дифтерии обнаружено, что диаметр колоний биоплёночных культур музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* № 665, выросших на кровяно-теллуриновом агаре, был меньше (1-2 мм), чем типовой культуры этого же штамма

(3-4 мм). Размеры колоний типовой и биоплёночных культур циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* одинаковы (2-4 мм).

Колонии биоплёночных культур двух исследованных штаммов *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* отличались от типовых по цвету (чёрные с оттенком серого по центру), консистенции (маслянистая), характеру поверхности (глянцевая, блестящая) и края (волнистый).

Изменение морфологических и культуральных свойств биоплёночных культур исследованных штаммов *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* могло быть связано с тем, что клетки в составе биоплёнки растут значительно медленнее, чем планктонные (Burnolle M., 2006; Black C.E., 2010). В результате происходит замедление метаболических процессов, приводящее к диссоциации R-формы колоний в S-форму. В дальнейшем идёт запуск механизмов адаптации возбудителя дифтерии к условиям окружающей среды, а, именно, устойчивости к антибиотикам (Black C.E., 2010). При этом создаются условия для длительной персистенции возбудителя дифтерии в организме бактерионосителей, что осложняет проводимую антибиотикотерапию.

Процесс биоплёнкообразования не влиял на способность *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* продуцировать дифтерийный экзотоксин. Все исследованные типовые, и биоплёночные (120- и 720-час.) культуры музейного и циркулирующего штаммов *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* положительны в иммунопреципитационном тесте Элека, что указывает на их способность вырабатывать токсин. Присутствие *tox<sup>+</sup>*-гена обнаружено в ПЦР во всех исследованных (как типовых, так и биоплёночных) культурах возбудителя дифтерии.

Исследование антибиотикочувствительности штаммов *C. diphtheriae* к препаратам, рекомендованным для лечения дифтерии (ванкомицину, цефотаксиму, анаэроцефу (цефокситину), гентамицину, цефтриаксону, линкомицину, канамицину, цефазолину, бензилпенициллину) показало, что типовая культура циркулирующего штамма *C. diphtheriae* обладает меньшей чувствительностью к указанным препаратам (от  $0,4 \pm 0,05$  до  $7,8 \pm 1,0$  мг/л), чем аналогичная культура музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* № 665 (МПК от  $0,1 \pm 0,2$  до  $2,6 \pm 0,9$  мг/л). При длительном культивировании музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* № 665 чувствительность его 120-часовой биоплёночной культуры к трём антибактериальным препаратам (анаэроцефу, цефтриаксону, цефазолину), а 720-часовой к шести (ванкомицину, цефотаксиму, анаэроцефу, цефтриаксону, цефазолину, канамицину) ниже ( $p \leq 0,05$ ), чем типовой культуры. Чувствительность биоплёночных культур циркулирующего штамма *C. diphtheriae* также ниже по сравнению с типовой в отношении анаэроцефа и бензилпенициллина (у 120-часовой), и цефтриаксона и бензилпенициллина (у 720-часовой) (табл. 1).

Таблица 1. Антибиотикочувствительность типовых и биоплёночных культур штаммов *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* (МПК мг/л)

| Антибиотик             | <i>C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup></i> № 665 |                                     |                                     | <i>C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup></i> |                                     |                                     |
|------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
|                        | Типовая культура                                   | Биоплёночная культура (120-часовая) | Биоплёночная культура (720-часовая) | Типовая культура                             | Биоплёночная культура (120-часовая) | Биоплёночная культура (720-часовая) |
| Ванкомицин             | 0,9±0,5                                            | 2,0±1,6                             | 7,0±1,3*                            | 1,3±0,3                                      | 2,3±1,2                             | 1,7±0,6**                           |
| Цефотаксим             | 2,6±0,9                                            | 1,2±0,6                             | 6,7±1,0*                            | 7,8±1,0**                                    | 6,4±0,8**                           | 6,2±0,7                             |
| Анаэроцеф (цефокситин) | 0,1±0,2                                            | 4,1±0,4*                            | 4,5±0,6*                            | 0,5±0,04                                     | 1,0±0,2**                           | 0,3±0,04**                          |
| Гентамицин             | 1,1±1,0                                            | 1,0±1,0                             | 1,0±0,7                             | 1,0±0,7                                      | 1,8±0,6                             | 1,8±0,6                             |
| Цефтриаксон            | 2,2±0,5                                            | 5,7±1,5*                            | 4,0±0,9*                            | 4,5±1,0                                      | 5,8±0,8                             | 9,0±1,2**                           |
| Линкомицин             | 0,15±0,3                                           | 0,78±0,2                            | 0,06±0,003                          | 6,1±0,9**                                    | 7,0±1,1**                           | 7,7±1,3**                           |
| Канамицин              | 0,33±0,04                                          | 0,5±0,1                             | 1,6±0,4*                            | 1,0±0,2**                                    | 1,0±0,3                             | 1,8±0,6                             |
| Цефазолин              | 0,25±0,05                                          | 0,5±0,05*                           | 1,0±0,2*                            | 1,0±0,2**                                    | 1,2±0,4                             | 1,1±0,3                             |
| Бензилпенициллин       | 0,19±0,3                                           | 1,6±0,7                             | 0,8±0,04                            | 0,4±0,05                                     | 4,3±2,1*                            | 4,1±1,0**                           |

Условные обозначения:

\* - достоверные отличия ( $P \leq 0,05$ ) между МПК антибиотика в отношении типовой и биоплёночных культур,

\*\* - достоверные отличия ( $P \leq 0,05$ ) между МПК антибиотика в отношении соответствующих культур музейного и циркулирующего штаммов *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>*.

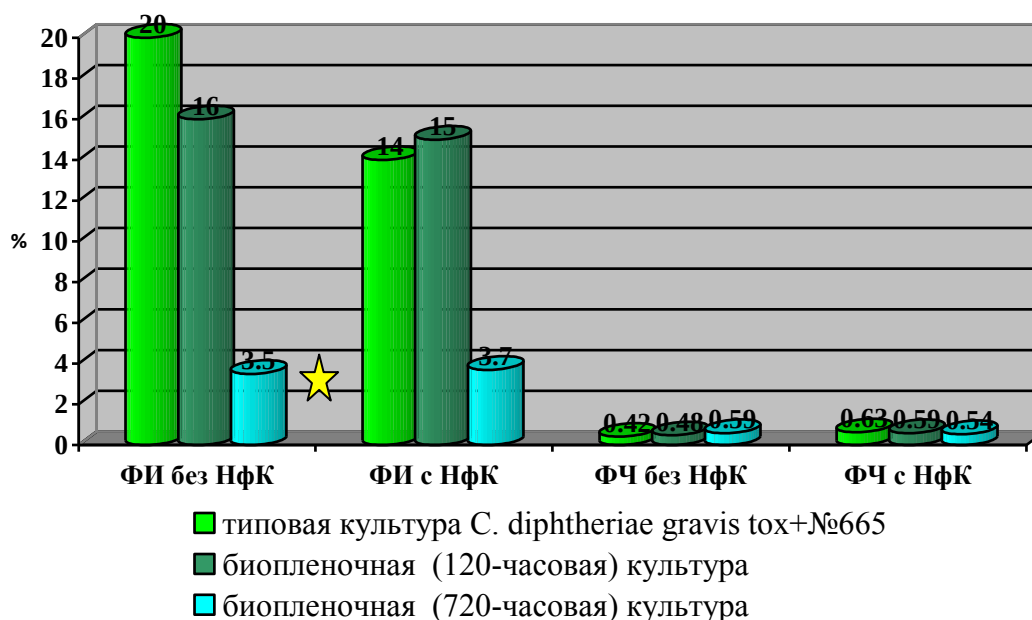
При этом чувствительность типовой культуры циркулирующего штамма возбудителя дифтерии по отношению к цефотаксиму, линкомицину, канамицину и цефазолину ниже ( $p \leq 0,05$ ), чем аналогичной культуры музейного штамма. Подобная тенденция отмечалась и у биоплёночных культур *C. diphtheriae*: чувствительность к цефотаксиму и линкомицину (у 120-часовой) и цефтриаксону, линкомицину, бензилпенициллину (у 720-часовой культуры) ниже ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с аналогичными культурами музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* № 665.

Возможно, это связано с тем, что на фоне существующей персистенции токсигенных штаммов *C. diphtheriae* при лечении различных воспалительных заболеваний используют антибиотики широкого спектра действия, что и может послужить причиной развития множественной антибиотикорезистентности возбудителя и, в том числе, исследованного нами циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>*. Биоплёнки имеют гетерогенный матрикс, который не только образует единую структуру, но и заполняет межклеточное пространство, образуя трёхмерную фильтрующую систему. В результате биоплёнки экранируют пептидогликан и угнетают доставку антибактериальных препаратов к бактериальным клеткам. Использованные нами антибактериальные препараты обладают способностью полностью или частично нарушать как синтез пептидогликана (цефазолин, цефотаксим, бензилпенициллин), так и ингибировать фермент транспептидазу, участвующую в биосинтезе мукопептида кле-

точной стенки (ванкомицин, цефтриаксон, анаэроцеф). Вследствие этого, МПК антибиотика повышается, а чувствительность биоплёночной культуры снижается (Чеботарь И.В., 2012). Вероятное использование данных антимикробных препаратов при лечении дифтерийной инфекции может привести к формированию антибиотикорезистентных культур бактерий, входящих в состав биоплёнки *C. diphtheriae*.

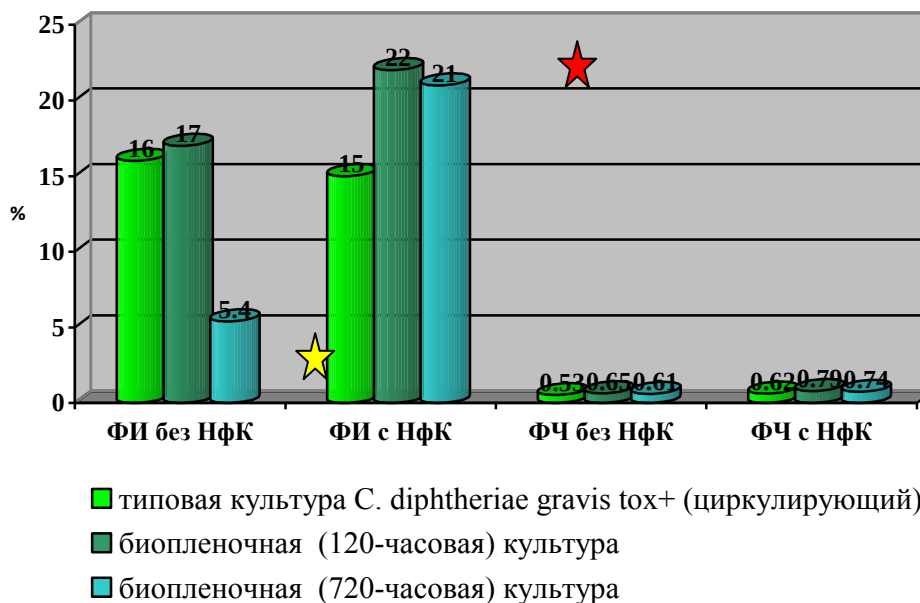
По результатам определения МПК, наиболее эффективными в отношении двух исследованных штаммов *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* являются такие антибактериальные препараты, как гентамицин, канамицин, ванкомицин, к которым чувствительны как типовая, так и биоплёночные культуры коринебактерий.

Нахождение микроорганизмов в составе биоплёнки способствует усилению их устойчивости не только к антибактериальным препаратам, но и факторам врождённого иммунитета (Голуб А.В., 2012; Чеботарь И.В., 2012; Li Ch., 2011). По результатам наших исследований, наиболее устойчивыми к поглотительной активности макрофагов оказались 720-часовые биоплёночные культуры двух исследованных штаммов *C. diphtheriae*, ФИ которых ниже ( $t \geq 2$ ,  $P \geq 95\%$ ), чем типовых культур этих же штаммов (рис. 5, 6). Переваривающая активность макрофагов при исследовании биоплёночных культур (120-часовой циркулирующего штамма *C. diphtheriae* (ИЗФ  $-1,6 \pm 0,02\%$ ) и 720-часовой музейного (ИЗФ  $-1,1 \pm 0,01\%$ )) так же ниже аналогичных значений ИЗФ типовых культур соответствующих штаммов.



★ – достоверность различий между показателями фагоцитоза, индуцированного типовой и биоплёночными культурами *Corynebacterium diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>*

Рис. 5. Показатели фагоцитоза макрофагов мышей, индуцированного типовой и биоплёночными культурами штамма *C. diphtheriae gravis tox* № 665.



★ — достоверность различий между показателями фагоцитоза, индуцированного типовой и биопленочными культурами *Corynebacterium diphtheriae* gravis tox<sup>+</sup>  
 ★ — достоверность различий между показателями при добавлении НФК и без НФК.  
 Рис. 6. Показатели фагоцитоза макрофагов мышей, индуцированного типовой и биопленочными культурами штамма *C. diphtheriae* gravis tox<sup>+</sup> (циркулирующий).

В составе клеточной стенки *C. diphtheriae* находится корд-фактор — гликолипид, представляющий собой 6,6'-дизфир трегалозы, содержащий коринемиколовую и коринемиколовую кислоты (Burkovski A., 2013), которые оказывают ингибирующее воздействие на фагоцитарную активность макрофагов. Это исключает контакт *C. diphtheriae* с цитотоксическими компонентами фагоцитов, приводя к незавершённости фагоцитоза. По всей видимости, формирование экзополисахаридного матрикса у биопленочной культуры *C. diphtheriae* усугубляет ингибирующее фагоцитоз действие корд-фактора.

Обработка макрофагов НФК оказывала стимулирующее влияние на поглотительную активность макрофагов только в отношении 720-часовой биопленочной культуры циркулирующего штамма *C. diphtheriae* (ФИ – 21,0±3,7%). Переваривающая активность макрофагов (ИЗФ) под воздействием НФК увеличивалась в отношении типовой (2,9±0,3%) и 120-часовой биопленочной (2,0±0,05%) культуры циркулирующего штамма *C. diphtheriae*, а также 720-часовой биопленочной (4,4±1,2%) культуры музейного штамма *C. diphtheriae* gravis tox<sup>+</sup> № 665. Полученные данные свидетельствуют об эффективности стимулирующего воздействия НФК на фагоцитоз коринебактерий в составе биоплёнки.

Одним из способов защиты бактерий от фагоцитоза является их апоптогенная активность, создающая условия для проникновения бактерий в подлежащие ткани, кровь и внутренние органы (Тюкавкина С.Ю., 2013). Гибель клеток организма путём апоптоза

благоприятна для бактерий, так как при этом не происходит запуска воспалительных реакций. Это создает условия для длительной персистенции возбудителя в организме.

Способность индуцировать апоптоз перитонеальных макрофагов мышей выражена как у типовой, так и у биоплёночных культур двух исследованных штаммов *C. diphtheriae* (табл. 2). Количество клеток с признаками апоптоза находилось в пределах от 55,1±5,3 до 78,0±1,7%. При этом апоптогенная активность наиболее выражена у 720-часовой биоплёночной (78,0±1,7%) культуры циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>*, что требует дальнейшего изучения.

Таблица 2. Апоптогенная активность типовых и биоплёночных культур штаммов *Corynebacterium diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>*

| Штамм                                                         | Культура                  | Без добавления НфК | С добавлением НфК |
|---------------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------|-------------------|
| <i>C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup></i> № 665 (музейный) | типовая                   | 55,1±5,3           | 6,0±0,5**         |
|                                                               | Биоплёночная, 120-часовая | 55,8±5,9           | 4,0±0,4**<br>*    |
|                                                               | Биоплёночная, 720-часовая | 54,4±2,7           | 7,0±0,6**         |
| <i>C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup></i> (циркулирующий)  | типовая                   | 65,4±6,1           | 5,0±0,6**         |
|                                                               | Биоплёночная, 120-часовая | 68,3±6,8           | 3,5±0,3**         |
|                                                               | Биоплёночная, 720-часовая | 78,0±1,7<br>*      | 37,6±1,4**<br>*   |

Условные обозначения:

\* — достоверность различий ( $t \geq 2$ ,  $P \geq 95\%$ ) между количеством клеток с апоптозом, индуцированным типовой и биоплёночными культурами каждого штамма *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>*

\*\* — достоверность различий ( $t \geq 2$  ( $P \geq 95\%$ )) между количеством клеток с апоптозом при добавлении НфК и без НфК.

НфК — нейтрофилокины

Воздействие нейтрофилокинами ведёт к повышению устойчивости перитонеальных макрофагов к апоптогенному воздействию как типовых, так и биоплёночных культур музейного и циркулирующего штаммов *C. diphtheriae*. Об этом свидетельствовало значительно меньшее ( $t \geq 2$ ,  $P \geq 95\%$ ) количество клеток с признаками апоптоза в присутствии нейтрофилокинов (от 3,5±0,3 до 37,6±1,4%) по сравнению с таковым без нейтрофилокинов (от 55,1±5,3 до 78,0±1,7%). Вероятно, это связано, с тем, что помимо прямого стимулирующего воздействия на макрофаги, нейтрофилокины вступают во взаимодействие и с матриксом биоплёнок. Это экранирует поверхностные структуры бактерий и препятствует распространению токсина за пределы биоплёнки.

Наиболее высокая апоптогенная активность (37,6±1,4%) при добавлении нейтрофилокинов сохранялась у 720-часовой биоплёночной культуры циркулирующего штамма *C. diphtheriae*, что свидетельствует о его более высоких адаптационных возможностях.

Способность *C. diphtheriae* формировать биоплёнку ведёт к угнетению функциональной активности макрофагов и индукции их апоптоза, что, по всей видимости, способствует длительной персистенции *C. diphtheriae* в организме и предрасполагает к формированию

бактерионосительства. Учитывая стимулирующее воздействие нейтрофилокинов на макрофаги (повышение их переваривающей активности и устойчивости к апоптогенному эффекту *C. diphtheriae*) заслуживает внимания рассмотрение возможности использования препаратов нейтрофилокинов для коррекции иммунного ответа у бактерионосителей токсигенных штаммов *C. diphtheriae*.

Токсигенные штаммы *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* обладают способностью к биоплёнкообразованию. Коринебактерии в составе биоплёнки изменяют свои морфологические и культуральные свойства, приобретая резистентность к антибактериальным препаратам и оказывая ингибирующее воздействие на факторы врожденного иммунитета.

### Выводы

1. *C. diphtheriae* обладает способностью к формированию биоплёнки, что подтверждается нарастанием значений оптической плотности матрикса с 48-й по 720-й час культивирования, коррелирующим с увеличением количества белковых и липидных компонентов, образующих матрикс.
2. Клетки в микробных сообществах штаммов *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* в составе биоплёнки в сравнении с планктонными культурами при сканирующей электронной микроскопии обладают меньшими размерами, располагаются в виде плотно сцепленных кластеров, покрытых общим матриксом, свободное пространство которого заполнено каналами.
3. Биоплёночные культуры штаммов *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* не имеют отличий от типовых по ферментативным и токсигенным свойствам, но отличаются по культуральным свойствам (на кровяно-теллуритовом агаре колонии меньшего размера, чёрного цвета с оттенком серого по центру, с глянцевой, блестящей поверхностью, маслянистой консистенцией и волнистым краем).
4. *C. diphtheriae* в составе биоплёнки оказывает ингибирующее воздействие на функциональную активность макрофагов, индуцируя процессы их апоптоза. Препараты нейтрофилокинов способствуют повышению переваривающей активности и устойчивости макрофагов к апоптогенному действию как типовых, так и биоплёночных культур токсигенных штаммов *C. diphtheriae*.
5. Типовые и биопленочные культуры штаммов *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* наиболее чувствительны к гентамицину, а также канамицину и ванкомицину, которые, по данным МПК, являются наиболее эффективными.

## Практические рекомендации

1. Для получения экспериментальной модели биоплёнки *C. diphtheriae gravis tox<sup>+</sup>* рекомендуется использовать гидрофильную поверхность (стекло), на которой масса биоплёнки увеличивается с 48-го по 720-й час культивирования с наибольшей интенсивностью к 120-му часу для музейного и к 720-му часу для циркулирующего штамма.
2. Для корректного назначения антибактериальных препаратов при дифтерийной инфекции в дальнейшем следует рассмотреть перспективу проведения микробиологического мониторинга антибиотикочувствительности клинических изолятов *C. diphtheriae* с биоплёночной культурой.
3. При бактерионосительстве токсигенных штаммов *C. diphtheriae* помимо антибактериальной терапии следует рассмотреть возможность использования препаратов цитокинового ряда, способствующих восстановлению естественной резистентности организма.

## Перспективы направления дальнейшей разработки темы

Дальнейшие исследования будут направлены на мониторинг и изучение возможных механизмов длительной персистенции токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae* в организме человека, а также разработку новых подходов к санации бактерионосителей.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

Публикации в научных журналах, рецензируемых ВАК:

1. Харсеева Г.Г. Биологические свойства *Corynebacterium diphtheriae* в составе биоплёнки / Г.Г. Харсеева А.Ю.Миронов, **Я.Н. Фролова**, А.В. Лабушкина // Журнал «Иммунология, аллергология, инфектология». – 2012. - №4. – С. 88-91.
2. Харсеева, Г.Г. Способность к формированию биоплёнки возбудителем дифтерии / Г.Г. Харсеева, А.Ю. Миронов, **Я.Н. Фролова**, А.В. Лабушкина // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013.- №3. - С. 36-38.
3. **Фролова, Я.Н.** Чувствительность к антибиотикам биопленочных культур токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae* / Я.Н. Фролова, Г.Г. Харсеева, А.Ю. Миронов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2014.- №6.- С. 51-53.
4. Kharseeva G.G. The Main Properties of Diphtheriae Causative Microorganism Circulated in Postepidemic Period from Biofilm Culture / G.G. Kharseeva, **J.N. Frolova**, V.N. Gerasimov, T.D. Gasretova // International Journal of Pediatrics and Child Health. - 2014. - №2. – P. 19-22.

Патенты на изобретения:

5. Пат. 2491348 Российская Федерация, МПК С 12 Q 1/04 G 01 N 33/569. Способ определения минимальной подавляющей концентрации антибактериального препарата / Харсеева Г.Г., Миронов А.Ю., **Фролова Я.Н.**, Садовниченко Е. О; заявитель и

патентообладатель Государственное бюджетное общеобразовательное учреждение высшего профессионального образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ. - № 2011140540; заявл. 06. 10. 2011 г.; опубл. 27. 08. 2013 г.

Тезисы в материалах научных конференций:

6. **Фролова, Я.Н.** Антибиотикочувствительность токсигенных штаммов *C.diphtheriae* / Я.Н. Фролова, Г.Г. Харсеева, А.Ю. Миронов // Журнал «Клиническая лабораторная диагностика». XVI Форум «Национальные дни лабораторной медицины России-2012». Материалы конференции. – Москва. - 2012. - № 9. - С. 86 - 87.
7. **Фролова, Я.Н.** Характеристика антибиотикочувствительности возбудителя дифтерии и *Corynebacterium non diphtheriae* / Я.Н.Фролова, А.Ю. Миронов, Т.Д. Гасретова, Г.Г. Харсеева, Н.А. Воронина, О.В. Карнаухова // Журнал «Клиническая лабораторная диагностика». XVII Форум «Национальные дни лабораторной медицины России-2013». Материалы конференции. – Москва. -2013. - № 9. - С. 73 - 74.
8. **Фролова, Я.Н.** Влияние нейтрофилокинов на апоптогенную активность коринебактерий дифтерии / Я.Н. Фролова, Г.Г. Харсеева, С.Ю. Тюкавкина, А.Ю. Миронов, Т.С. Заваян, М.Ю. Бондаренко, О.М. Бут // Журнал «Инфекционные болезни». Материалы VI Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням. - г. Москва. - 2013.- Т. 11. - Прил. №1 – С. 241.
9. **Фролова, Я.Н.** Способность биопленочной культуры возбудителя дифтерии индуцировать фагоцитоз и апоптоз макрофагов / Я.Н.Фролова, Г.Г. Харсеева, С.Ю. Тюкавкина, А.В. Лабушкина, О.И. Сылка // Журнал «Инфекционные болезни». Материалы VII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням. - г. Москва. - 2014.- С. 326.
10. **Фролова, Я. Н.** Биологические свойства *Corynebacterium diphtheriae tox<sup>+</sup>* в составе биопленки / Я.Н. Фролова, Г.Г. Харсеева, А.Ю. Миронов, Д.М. Зленко, Е.Н. Воробьева, А.В. Петров // Журнал «Проблемы медицинской микологии». Материалы Всероссийской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии. – Санкт-Петербург. – 2014.- Т. 16. - № 2. – С. 141.
11. Воронина, Н.А. Влияние нейтрофилокинов на апоптогенную активность возбудителя дифтерии и недифтерийных коринебактерий / Н.А. Воронина, **Фролова Я.Н.**, Г.Г. Харсеева, Т.Д. Гасретова // Журнал «Проблемы медицинской микологии». Материалы Всероссийской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии. – Санкт-Петербург. – 2014.- Т. 16. - № 2. – С. 53.

12. **Фролова, Я.Н.** Современные подходы к лечению бактерионосительства дифтерии // 65-я Итоговая научная конференция молодых учёных Ростовского государственного университета. Материалы конференции. - Ростов – на – Дону. – 2011. - С. 88 - 89.
13. **Фролова, Я.Н.** Действие нейтрофилокинов на апоптогенную активность, обусловленную коринебактериями / Я.Н. Фролова, Н.А. Воронина, Г.Г. Харсеева, Тюкавкина С.Ю. // Проблемы антибиотикорезистентности возбудителей внутрибольничных инфекций: сб. науч.-практ. работ / под общ. ред. Г.Г. Харсеевой. – Ростов н/Д: Изд-во РостГМУ, 2013. - 59-61.
14. Frolova Ya. Sensitivity of biofilm cultures of toxigenic strains of *Corynebacterium diphtheriae* to antibiotics // J. Konzept: Scientific and Methodological e-magazine.- Vol 1, Iss № 4 (Collected works, Best Article). - 2014. - P. 36-40.

#### **Перечень сокращений, условных обозначений, символов, единиц и терминов**

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота;  
 ИЗФ — индекс завершённости фагоцитоза;  
 кВт — киловатт;  
 КОЕ — колониеобразующая единица;  
 КРС — крупный рогатый скот;  
 КТА — кровяно-теллуритовый агар  
 КОЕ — колония образующая единица  
 МПА — мясо-пептонный агар;  
 МПК — минимальная подавляющая концентрация;  
 мРНК — матричная (информационная) рибонуклеиновая кислота;  
 МУК, МУ — методические указания;  
 Нф — нейтрофилы;  
 НфК — нейтрофилокины;  
 ОП — оптическая плотность;  
 ПЦР — полимеразная цепная реакция  
 ФИ — фагоцитарный индекс;  
 ФЧ — фагоцитарное число;  
 16S рРНК — 16S рибосомальная рибонуклеиновая кислота.

\_\*\*\*\_

Выражаем искреннюю благодарность за неоценимую помощь и поддержку в проведении исследований с использованием электронно-сканирующей микроскопии на базе ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора директору — члену-корреспонденту РАН, д.м.н., профессору Дятлову Ивану Алексеевичу и заведующему отделом дезинфектологии д.б.н. Герасимову Владимиру Николаевичу.