

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
профессионального образования
«Ростовский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения
Российской Федерации

На правах рукописи

Фролова Яна Николаевна

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИОПЛЁНОК ТОКСИГЕННЫХ
ШТАММОВ
CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE GRAVIS TOX⁺

03.02.03 – микробиология
03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научные руководители: д. м. н., проф. Харсеева Г. Г.
д. м. н., проф. Миронов А. Ю.

Ростов-на-Дону - 2015

Содержание

	Стр
ВВЕДЕНИЕ	5
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. Факторы патогенности <i>Corynebacterium diphtheriae</i> и их роль в патогенезе и иммуногензе.....	14
1.2. Биоплёнки патогенных бактерий: биологические свойства и роль в хронизации инфекционного процесса.....	23
1.2.1. Механизм образования биоплёнки патогенными грамположительными микроорганизмами.....	23
1.2.2. Ультраструктура бактериальных биоплёнок.....	26
1.2.3. Резистентность бактериальных биоплёнок к антибактериальным препаратам.....	30
1.2.4. Резистентность бактериальных биоплёнок к факторам иммунитета человека.....	33
1.3. Заключение.....	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	37
2.1. Штаммы микроорганизмов.....	37
2.2. Моделирование процесса биоплёнкообразования штаммами <i>Corynebacterium diphtheriae gravis tox+</i>	37
2.3. Методы оценки биологических свойств биоплёночных культур штаммов <i>Corynebacterium diphtheriae gravis tox+</i>	39
2.3.1. Морфологические свойства.....	39
2.3.2. Культуральные свойства.....	39
2.3.3. Ферментативные свойства.....	40
2.3.4. Токсинообразование.....	40
2.3.5. Определение белково-углеводного состава биоплёнок...	41

	2.3.6. Влияние <i>Corynebacterium diphtheriae</i> на клетки иммунной системы мышей.....	41
	2.4. Определение чувствительности к антибиотикам.....	42
	2.5. Статистические методы.....	43
	СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	44
ГЛАВА	3. Моделирование процесса биоплёнкообразования у <i>Corynebacterium diphtheriae gravis tox+</i>	44
	3.1. Отработка режима получения массы биоплёнки <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	44
	3.2. Определение жизнеспособности <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	47
	3.3. Заключение.....	58
ГЛАВА	4. Биологические свойства биоплёночных культур музейного и циркулирующего штаммов <i>Corynebacterium diphtheriae gravis tox+</i>	59
	4.1. Морфологические свойства.....	59
	4.1.1. Световая микроскопия.....	59
	4.1.2. Электронная сканирующая микроскопия.....	60
	4.2. Культуральные и ферментативные свойства.....	67
	4.3. Токсигенные свойства.....	68
	4.4. Антибиотикочувствительность.....	70
	4.5. Заключение	74
ГЛАВА	5. Действие <i>Corynebacterium diphtheriae gravis tox+</i> в составе биоплёнки на клетки иммунной системы человека.....	76
	5.1. Влияние биоплёночных культур музейного и циркулирующего штаммов <i>Corynebacterium diphtheriae</i> на функциональную активность и апоптоз макрофагов мышей... ..	76
	5.2. Регуляторное влияние нейтрофилокинов на процессы фагоцитоза и апоптоза макрофагов мышей, индуцированные	

ТИПОВЫМИ И БИОПЛЁНОЧНЫМИ КУЛЬТУРАМИ ШТАММОВ <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	79
5.3. Заключение.....	82
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	83
ВЫВОДЫ.....	92
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	93
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ.....	94
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	96
СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	116

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. В настоящее время заболеваемость дифтерией в России и Европейских странах регистрируется на спорадическом уровне благодаря проводимой вакцинопрофилактике [43, 47, 52]. Вакцинация населения противодифтерийными препаратами, содержащими дифтерийный анатоксин, способствует снижению уровня заболеваемости дифтерией, но не препятствует формированию бактерионосительства [32, 43, 46, 60], поддерживающего скрытое течение эпидемического процесса [7, 27].

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 анитоксического иммунитета. В связи с этим необходим постоянный мониторинг циркулирующих штаммов *Corynebacterium diphtheriae* и проведение профилактических мероприятий, направленных на предотвращение возникновения и распространения инфекции [41, 44, 45].

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 [34, 63, 145]. Основная роль в развитии заболевания принадлежит дифтерийному токсину, однако ранние стадии инфекции обусловлены, прежде всего, поверхностными структурами бактериальной клетки *C. diphtheriae* [4, 17, 108], которые, по всей видимости, обуславливают её способность образовывать биоплёнки. Биоплёнки микроорганизмов ответственны за развитие многих хронических процессов [2, 8, 83]. 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 [23]. Благодаря существованию в виде микробных сообществ — биоплёнок — бактерии более защищены от воздействия антибактериальных препаратов, а также факторов врождённого и адаптивного клеточного и гуморального иммунитета [55]. 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 [5, 121]. 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* в отношении биоплёночных культур 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 бактерионосительства 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. Однако для современной медицины остаётся недостаточно исследованным вопрос о причинах формирования бактерионосительства в человеческой популяции. Одним из возможных механизмов развития бактерионосительства может явиться способность *Corynebacterium diphtheriae* образовывать биопленки. Работы по исследованию свойств *Corynebacterium diphtheriae* в составе биопленок крайне малочисленны и посвящены исследованию способности к адгезии и формированию биопленки на абиогенных/биогенных поверхностях [128], а также влиянию субингибирующих концентраций антибиотиков на процесс биопленкообразования [102]. Исследование механизмов формирования биопленок *Corynebacterium diphtheriae gravis tox+*,

устойчивости их в составе биопленок к ряду антибактериальных препаратов, характера воздействия на клетки иммунной системы человека, как в нашей стране, так и за рубежом по –прежнему остаются малоизученными. Рассмотрение всех этих аспектов позволит расширить представления о причинах и механизмах формирования дифтерийного бактерионосительства 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⁺* в составе биоплёнки.

Задачи исследования:

1. Исследовать способность возбудителя дифтерии к формированию биоплёнки.
2. Изучить структуру однородных микробных сообществ штаммов *C. diphtheriae gravis tox⁺* при формировании биоплёнок *in vitro*.
3. Провести сравнительное исследование основных биологических (культуральных, ферментативных, 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*⁺ при помощи электронной сканирующей микроскопии.
3. Впервые исследованы основные биологические (культуральные, ферментативные, токсигенные) свойства биоплёночных культур *C. diphtheriae gravis tox*⁺.
 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*⁺ 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+* в составе биоплёнки. Объектом исследования послужили типовая и биоплёночные (120- и 720-часовые) культуры музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox+ № 665*, полученного из ГИСК им. Л. А. Тарасевича, и циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox+*, любезно предоставленного бактериологической лабораторией ФГУ «1002 ЦГСЭН СКВО» г. Ростова-на-Дону.

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

Научная литература, посвященная 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+ № 665*, полученного из ГИСК им. Л. А. Тарасевича, и циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox+*, выделенного от больного с диагнозом «локализованная форма дифтерии», любезно предоставленного бактериологической лабораторией ФГУ «1002 ЦГСЭН СКВО» г. Ростова-на-Дону.).

Бактериологические методы

Основные биологические свойства (морфологические, культуральные, ферментативные и токсигенные) типовых и биопленочных культур *C. diphtheriae gravis tox+* изучали согласно Методическим указаниям [37] и Приказу № 535 [51].

Электронно-микроскопические методы

Изучение структуры биопленок музейного и циркулирующего штаммов токсигенного штаммов *C. diphtheriae gravis tox+* 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+* проводили в соответствии с [37] и секвенированием по 16S рРНК (ЗАО «Синтол», г. Москва), согласно инструкции производителя оборудования. Наличие гена токсигенности у типовых и биопленочных культур двух исследованных штаммов проводили с помощью комплекта реагентов для ПЦР-амплификации ДНК с детекцией в режиме реального времени (формат «Real-time»), полученный в ООО «НПО ДНК-Технология» (г. Москва).

Биотехнологические методы

Моделирование процесса биоплёнокообразования штаммами *Corynebacterium diphtheriae gravis tox+* осуществляли в пластиковых (гидрофобных) и стеклянных (гидрофильных) пробирках, содержащих по 3 мл мясопептонного бульона с добавлением 20% сыворотки крупно рогатого скота, согласно методике P. L. Watnick, et al. [175].

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью персонального компьютера *IBMPC/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 биопленочных 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 биопленки *in vitro* являются гентамицин, а также канамицин и ванкомицин.

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

Апробация работы. 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*» (постановление № 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](http://e-koncept.ru/en/2014/54330.htm?download));

6. Научно-практической конференции с международным участием «Современные проблемы инфекционной патологии человека» 30 октября 2014 г., г. Минск, Белоруссия.
7. 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.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано всего 14 научных работ, из них – 6 тезисов и 3 статьи в журналах, рецензируемых 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».

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Факторы патогенности *Corynebacterium diphtheriae* и их роль в патогенезе и иммуногенезе

В настоящее время заболеваемость дифтерией в России и мире регистрируется на спорадическом уровне [47, 100]. В 90-е годы XX столетия, когда дифтерия регистрировалась во всех возрастных и социальных группах населения России [9, 28], наибольший рост заболеваемости (почти в 40 раз) отмечен у детей, среди взрослых процент заболевших возрос в 4 раза [64]. У заболевших наблюдали развитие ранее не встречавшихся при дифтерии осложнений: дифтерия кишечника, поражения печени и лёгких [26, 63].

Разнообразие и тяжесть клинических форм дифтерийной инфекции обусловлены широким спектром факторов патогенности возбудителя. Для токсигенных штаммов *C. diphtheriae* [20, 32, 63] главным фактором вирулентности является дифтерийный токсин (ДТ). Способность к продукции ДТ обусловлена лизогенией и детерминирована геном *tox*⁺, локализованным в ДНК умеренного фага [20, 79, 139, 149]. ДТ относится к бактериальным нейротоксинам. ДТ представляет собой глобулярный белок, состоящий из одиночной полипептидной цепи (535 аминокислот) с молекулярной массой 58 342 Д. Молекула ДТ состоит из А- и В-фрагментов (м.м. 24 и 28 тыс. Д), которые соединены двумя дисульфидными мостиками [16, 20, 79, 107, 125]. А-фрагмент обладает энзимной активностью, В-фрагмент обуславливает связывание молекулы ДТ с фосфолипидами клеточных мембран [20, 125]. При этом механизмом трансмембранного переноса ДТ в клетки является адсорбционный эндоцитоз. В-фрагмент взаимодействует с клеточными рецепторами, в результате чего формируются трансмембранные каналы, по которым А-фрагмент перемещается в цитозоль [20, 107]. Цитопатогенное действие ДТ

возникает при фиксации на цитолемме не менее 250 молекул ДТ. Проникновение ДТ в клетку влечёт за собой блокаду А-фрагмента фактора элонгации EF-2, приводящее к нарушению процессов трансляции с мРНК в рибосомах и, как следствие, её гибели, а также нарушению белковых синтезов [79, 107].

Антитоксические антитела, секретируемые в ответ на введение ДТ, функционально неоднородны и могут быть направлены как против А-, так и против В-фрагмента ДТ. Антитоксические антитела нейтрализуют ДТ не в крови или межтканевой жидкости, а на поверхности клеток, так как скорость нейтрализации антителами низкомолекулярных структур выше при фиксации антигена на структуре большей массы, каковой является клетка [44, 139]. Инактивация ДТ при локализованной форме происходит путём образования циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК). При токсической форме дифтерии образующиеся ЦИК имеют достоверно большие размеры и плохо доступны для элиминации [58].

Механизм повреждающего действия ДТ на органы-мишени осуществляется двояко. С одной стороны, он раздражает нервные чувствительные рецепторы слизистых оболочек и внутренних органов, с другой — оказывает цитопатогенное действие, фиксируясь в тканях органов-мишеней — сердца, почек, надпочечников, нервной ткани, реже — лёгких, печени, пищевода, желудка, кишечника, поджелудочной железы [1, 20, 93].

Помимо продукции ДТ, *C. diphtheriae* обладает факторами патогенности, обеспечивающими способность к колонизации и агрессии. Основными из них являются: пили, ферменты агрессии (гиалуронидаза, нейраминидаза, амилаза, протеазы, ДНК-аза), поверхностно расположенный гликолипид корд-фактор и другие, патогенетическое значение которых пока недостаточно изучено [4, 32, 127].

Адгезины *C. diphtheriae* представлены пиями (фимбриями), ковалентно связанными с пептидогликаном клеточной стенки. Пили состоят из белка Spa, представленного несколькими субъединицами (от А до Н), за счёт которых образуется три варианта (типа) пилей, различающихся по адгезивной специфичности [128]. Каждый тип пилей, предположительно, реагирует с соответствующими

структурами (рецепторами) эпителиальных клеток, что позволяет *C. diphtheriae* колонизировать различные виды слизистых оболочек [146].

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 [61].

Персистенция *C. diphtheriae* в организме при бактерионосительстве может быть связана с адгезинами, которые, как предполагают, участвуют в формировании биопленки [61].

Гиалуронидаза расщепляет гиалуроновую кислоту соединительной ткани, что приводит к повышению проницаемости тканей и кровеносных сосудов, выходу плазмы за пределы сосудистого русла и отёку [17, 32].

Нейраминидаза способствует избирательному отщеплению гликолипидов и олигосахаров сиаловых кислот от гликопротеинов. Это приводит к разжижению поверхностной слизи эпителия и подготавливает его рецепторы для прикрепления токсина, а также модифицирует клеточную поверхность. На основании вышеназванных свойств нейраминидазу рассматривают как фактор распространения [17, 33].

Амилаза утилизирует углеводы и создает дополнительный источник энергии для ускорения колонизации возбудителя на слизистых оболочках человека и роста на питательных средах [40].

Протеаза инактивирует секреторный IgA, в частности, его изотип IgA₁— фактор врождённого мукозального иммунитета.

ДНК-аза *C. diphtheriae* обнаружена у токсигенных и нетоксигенных штаммов коринебактерий, её роль в патогенезе дифтерии пока не ясна.

Корд-фактор содержит гликолипид, в состав которого входит коринемиколовая оксикислота. Он способствует устойчивости к фагоцитозу, так как препятствует слиянию фагосом, содержащих бактерии, с лизосомами, содержащими губительные для микроорганизмов протеолитические ферменты [127], и ингибирует образование каталазы и супероксиддисмутазы [1].

Токсигенные штаммы *C. diphtheriae* продуцируют бактериоцины (корицины), подавляющие жизнедеятельность нормальной микрофлоры организма, что, возможно, способствует развитию дифтерийной инфекции в организме и персистенции *C. diphtheriae* [63].

Взаимосвязанное действие всех факторов патогенности *C. diphtheriae* обуславливает развитие дифтерийной инфекции и способствует длительной персистенции в организме.

Начальным этапом развития дифтерийной инфекции является адгезия возбудителя на эпителиальных клетках (рисунок 1.1). Процесс адгезии коринебактерий дифтерии проходит три стадии, обусловленные электростатической силой клеток, гидрофобной активностью клеточных мембран и лиганд-рецептор-опосредованной связью [127, 140, 155, 158]. Только лиганд-рецепторное взаимодействие *C. diphtheriae* с клетками хозяина является высокоспецифичным [25]. Рецепторами адгезинов *C. diphtheriae* считают соединения липидно-белковой природы, не содержащие маннозу [1,108, 129, 155].

Адгезия играет роль пускового механизма в развитии колонизации возбудителем слизистых оболочек, продукции токсина и последующем его воздействии на органы и системы организма [33, 54, 137].

На начальных этапах инфекционного процесса минорный белок, ассоциированный с пиллями и клеточной стенкой, формирует 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 вер-

хушки до основания пилей по типу замка «молнии» [63]. 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, что облегчает секрецию дифтерийного токсина. Процесс адгезии *C. diphtheriae* облегчается действием фермента нейраминидазы (сиалидазы), разрушающей сиаловые кислоты на поверхности клетки хозяина, что освобождает клеточную поверхность от слизи и интенсифицирует 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 расти и размножаться, колонизируя другие клетки хозяина [61]. При колонизации специфический белок пилей экспрессируется на поверхности вновь образующихся бактериальных клеток, что облегчает дальнейшее их прикрепление к клеткам хозяина [61, 63].

В процессе адгезии *C. diphtheriae* участвуют поверхностные структуры бактериальной клетки и, в частности, пили [54, 61, 137].

Колонизация *C. diphtheriae* слизистой оболочки — многофакторный процесс, включающий, прежде всего, осуществление конкурентных взаимоотношений возбудителя с представителями нормальной микрофлоры.

Подавление барьерной функции нормальной микрофлоры *C. diphtheriae* происходит за счёт её способности синтезировать фермент каталазу, разлагающий перекиси, продуцируемые микроорганизмами, и бактериоцины (корицины), что создает селективные преимущества *C. diphtheriae* перед индигенной микрофлорой хозяина в месте внедрения [42]. Разжижение слизи на эпителии ВДП, нарушение функции реснитчатого эпителия происходит под воздействием ДТ, нейраминидазы и гиалуронидазы. Важную роль в процессе подавления местного иммунитета играет корд-фактор, ДТ, а также ферменты — протеазы и каталаза, разрушающие

секреторный IgA и его изотип IgA₁ и угнетающие процессы фагоцитоза. По-видимому, в последующем процесс колонизации сопровождается формированием биоплёнки *C. diphtheriae*.

Дальнейшее развитие инфекционного процесса может быть различным и зависит от ряда условий. Развитие классической клинической картины дифтерии чаще наблюдается у лиц с отсутствием анитоксического иммунитета [18, 22]. Так, у непривитых детей развитие токсической и субтоксической форм дифтерии ($42,1 \pm 6,5\%$ пациентов) наблюдалось чаще ($p < 0,05$) по сравнению с локализованной и распространенной ($16,9 \pm 3,1\%$ пациентов). Клинические проявления дифтерии у привитых детей наблюдали, в основном, среди привитых вне схемы вакцинации ($61,5 \pm 3,9\%$ пациентов с локализованной и распространенной и $38,5 \pm 6,4\%$ - с токсической и субтоксической формами дифтерии) [63]. К формированию бактерионосительства токсигенных штаммов *C. diphtheriae* предрасполагает наличие высоких титров анитоксических антител. Процесс бактерионосительства формируется в подавляющем большинстве у привитых детей ($98,0 \pm 1,5\%$ пациентов), имевших высокие титры анитоксических антител (1:160 и выше) [63].

В месте внедрения *C. diphtheriae* наблюдают её массивное размножение, сопровождающееся увеличением продукции токсина и развитием некроза слизистой оболочки, который обусловлен, помимо действия токсина, и ферментами (гиалуронидазой, нейраминидазой и, возможно, ДНК-азой). ДТ, продуцируемый *C. diphtheriae*, поступает непосредственно в лимфатическую систему (лимфоглоточное кольцо, лимфатические сосуды, регионарные лимфатические узлы) и кровоток [34, 63]. С током крови ДТ попадает в органы и ткани (нервная ткань, миокард, почки, надпочечники и др.), оказывая токсическое воздействие на организм.

При наличии анитоксинов у инфицированных лиц, как правило, не возникает ни местных, ни общих проявлений действия токсина и инфекционный процесс ограничивается бессимптомной колонизацией, т.е. носительством. К формированию бактерионосительства токсигенных *C. diphtheriae* предрасполагает наличие высокого уровня анитоксических антител [22, 41, 63].

Одним из факторов, способствующих персистенции *C. diphtheriae* в орга-

низме бактерионосителей, является его способность вызывать апоптоз макрофагов, обусловленный действием дифтерийного токсина и поверхностных структур коринебактерий [62, 72, 91, 163]. Гибель макрофагов, вызванная *C. diphtheriae*, осуществляется, в основном, за счёт действия дифтерийного экзотоксина. Апоптоз клеток наступает и под влиянием нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae*, но в более отдаленные сроки (3 часа) по сравнению с токсигенными штаммами (1 час) [62], что связано с воздействием поверхностных структур *C. diphtheriae* и дальнейшей активизацией ферментов агрессии. Усиление апоптогенной активности токсигенных и нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae* в ассоциации с *C. pseudodiphtheriae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* может играть роль в процессе персистенции коринебактерий и формировании затяжной формы бактерионосительства возбудителя дифтерии [62, 63].

Совокупность всех повреждающих факторов при дифтерийной инфекции способствует развитию аллергических и аутоиммунных процессов в организме, играющих важную роль в персистенции *C. diphtheriae* [63]. У бактерионосителей токсигенных штаммов *C. diphtheriae* выявлено повышенное содержание общего IgE и специфического IgE к дифтерийному анатоксину [63]. IgE при дифтерийной инфекции играет роль в формировании защитно-приспособительных реакций, направленных на ограничение зоны действия и элиминацию *C. diphtheriae*. Не случайно наиболее часто повышенный уровень общего и специфического IgE к ДА наблюдают у бактерионосителей, а не у пациентов с клинически выраженными формами дифтерии [38].

Уровень общего IgE и специфического IgE к ДА коррелировал у больных и бактерионосителей с повышением содержания ИЛ-4 и ИЛ-6, стимулирующих выработку IgE [63].

Спектр формирующихся при дифтерии иммунопатологических реакций включает в себя и выработку аутоантител. Аутоантитела и, в частности, антитела к денатурированной ДНК являются свидетелями патологии в организме [19]. У бактерионосителей токсигенных штаммов *C. diphtheriae* антитела к денатурированной ДНК обнаружены в 100% случаев, противомозговые – в $7,0 \pm 4,7\%$, проти-

вокардиальные – в $3,4 \pm 3,4\%$, противопочечные не выявляли вообще [19, 63].

В результате взаимодействия *C. diphtheriae* с организмом, в нём формируется сложная система защитно-приспособительных реакций, направленная на ограничение распространения, элиминацию возбудителя и полное восстановление структурно-функциональных нарушений, возникающих в ходе инфекционного процесса. Колонизация предшествует дальнейшему развитию дифтерийной инфекции, т.е. острому заболеванию, но она не может рассматриваться как персистенция коринебактерий в организме. Только носительство токсигенных штаммов *C. diphtheriae*, ограниченное колонизацией и протекающее без участия экзотоксина можно представить как форму персистенции возбудителя дифтерии в организме [31]. Вероятно, немаловажную роль в данном процессе играет способность *C. diphtheriae* формировать биопленку, защищающую возбудитель от факторов иммунитета и обуславливающую длительную персистенцию *C. diphtheriae* в организме человека.

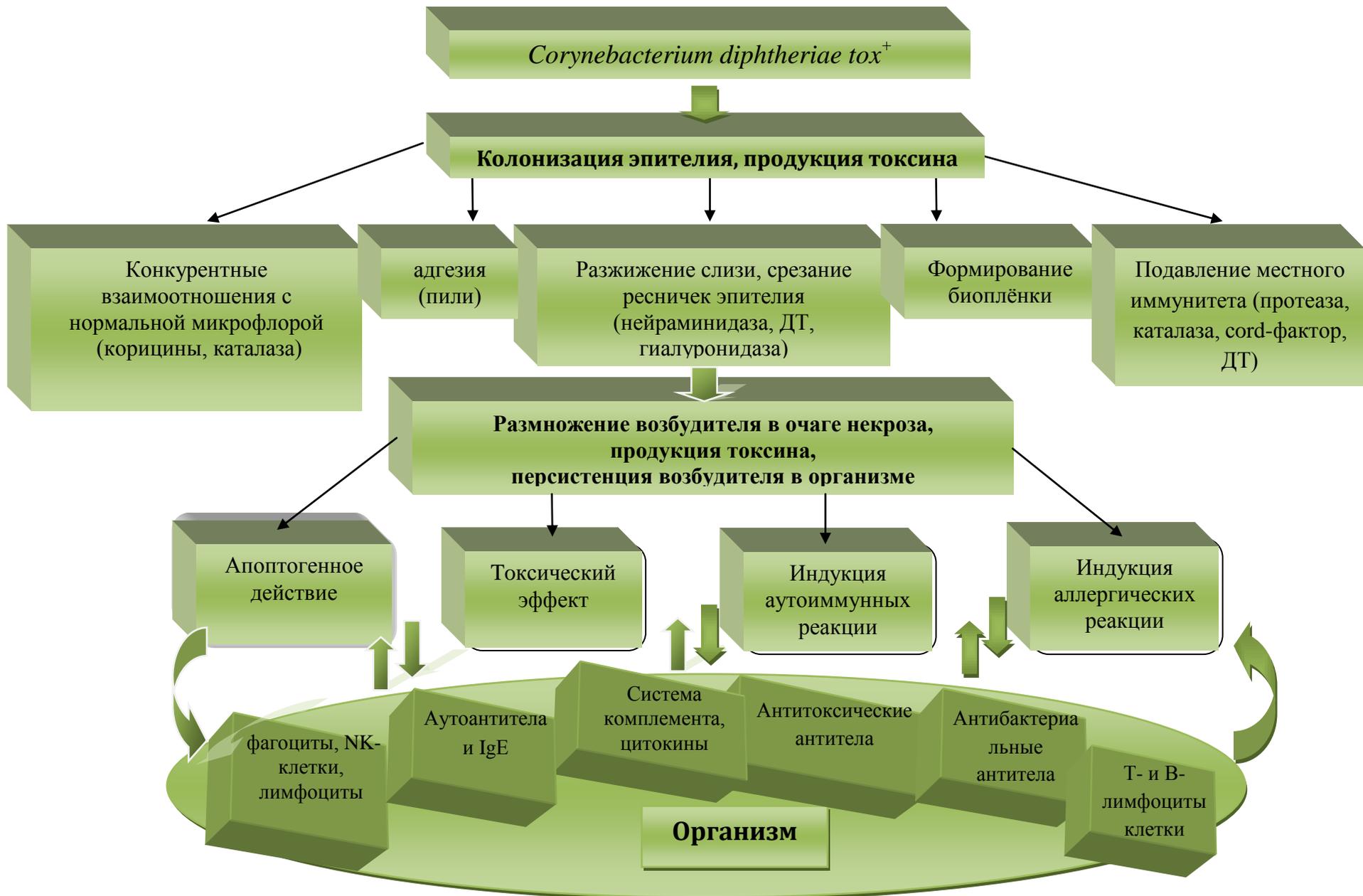


Рисунок 1.1 Схема патогенеза и иммуногенеза при дифтерии

1.2. Биоплёнки патогенных бактерий: биологические свойства и роль в хронизации инфекционного процесса

Резервуаром токсигенных штаммов *C. diphtheriae* являются бактерионосители, для которых проводимая антибиотикотерапия не всегда достаточно эффективна [27]. Это может быть связано со способностью *C. diphtheriae* формировать микробные ассоциации — биоплёнки.

Биоплёнки представляют собой бактериальные сообщества, которые могут быть образованы бактериями одного или нескольких видов и состоять как из активно функционирующих клеток, так и из покоящихся или некультивируемых [12, 13, 24, 55]. Развитие биоплёночных сообществ — одна из основных стратегий выживания бактерий не только в окружающей среде, но и в организме инфицированных хозяев [35, 82]. В составе биоплёнок клетки бактерий объединены сложными межклеточными связями, осуществляющими регуляцию экспрессии генов в различных частях биоплёнок и на разных стадиях их развития, в результате чего популяцию биоплёночных бактерий рассматривают как функциональный аналог многоклеточного организма [10, 25, 90, 150].

1.2.1. Механизм образования биоплёнки патогенными грамположительными микроорганизмами

Формирование биоплёнки является сложным многостадийным и строго регулируемым биологическим процессом, включающим адгезию планктонных бактерий к поверхности; пролиферацию, последующее накопление биомассы клеток в виде многослойной структуры, содержащей синтезируемый клетками полимерный вне-

клеточный матрикс; созревание и распространение фрагментов биоплёнки [104, 106, 144, 181].

Адгезия планктонных клеток бактерий к поверхности субстрата протекает в два этапа. Первый этап адгезии микроорганизмов представляет собой обратимый процесс, связанный с действием неспецифических физико-химических сил взаимодействия между молекулами и структурами на поверхностях микроорганизма и твёрдого субстрата (Ван-дер-Ваальсовы, гидрофобные, электростатические силы и дисперсионные силы Лондона) [13, 77, 96, 136].

Второй этап микробной адгезии необратим: бактериальная клетка после адсорбции, перемещаясь вдоль поверхности субстрата, прочно связывается с ним посредством жгутиков и пилей IV типа, которыми обладают и *C. diphtheriae* [36]. Кроме пилей в процессах адгезии принимают участие множество неполимерных адгезинов, которые распознают различные структурные элементы поверхности тканей хозяина, в том числе, компоненты внеклеточного матрикса - коллаген, эластин, гликопротеины, гиалуроновую кислоту [48, 146]. По завершению процесса адгезии, клетки теряют подвижность, некоторые из них прилипают друг к другу, начинают выделять внеклеточные полимеры, к которым относятся поверхностные белки-адгезины и лектины фимбрий, которые не только ограничивают скопления бактериальных клеток, но и способствуют прикреплению их к субстрату и межклеточным взаимодействиям [76, 115, 117, 148]. Далее бактерии более прочно прилипают к поверхности клеточного монослоя на субстрате, обмениваются генами, начинают синтезировать внеклеточное полимерное вещество (extracellular polymeric substance), являющееся предохранительным матриксом или «слизью» и способствующее образованию первоначальной биопленки из мелких колоний бактерий [9, 65]. После этого наступает пора вторичных колонизаторов, т.е. клеток, которые прикрепляются к клеткам, локализованным на поверхности [54, 68, 157].

Рассматривая процесс адгезии у важнейшего представителя грамположитель-

ных микроорганизмов — стафилококка — установлено, что основным элементом, обеспечивающим необратимое связывание бактериальной клетки с субстратом, является *Polysaccharide Intercellular Adhesin* (PIA). PIA— полисахарид, участвующий в клеточной субстратной адгезии и последующем формировании клеточных кластеров, который инициирует гемагглютинацию и препятствует фагоцитозу за счёт активации бактериальной агрегации. Другой экзоплазматический компонент — α -токсин, помимо основной своей функции — образования поровых каналов в мембранах клеток эукариот, что обуславливает вирулентность стафилококка — обладает и свойствами адгезина [115, 117, 170, 172]. Все синтезируемые компоненты (белки-адгезины, лектины фимбрий, пили) обнаружены не только у стафилококков, но и у некоторых *C. diphtheriae*. Так, у *Corynebacterium diphtheriae* помимо поверхностных структур (пили, фимбрии, клеточная оболочка), в процессе адгезии и биопленкообразования участвует и дополнительный белок – амилаза [101, 114]. Ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин, галактоза, манноза-подобные и сиаловые кислотные остатки, входящие в состав клеточной стенки *C. diphtheriae*, имеют высокую степень адгезии к положительно заряженным поверхностям (стекло), и в меньшей степени - к отрицательно заряженным, например, полистирол [101]. Данные компоненты осуществляют «якорную» функцию и инициируют дальнейшие стадии формирования биоплёнки [89, 153, 170, 173]. При пролиферации и накоплении биомассы клеток в виде многослойной структуры микроорганизмы синтезируют и используют собственные молекулы, связываясь с поверхностью при помощи адгезинов [143]. Адгезинами могут быть экзополисахариды, которые связываются с материалом поверхности, и/или специфические для конкретных рецепторов лиганды, расположенные на пиях, фибриллах. В течение этой стадии взвешенные микроорганизмы одного вида могут коагрегировать друг с другом или с микроорганизмами других видов, формируя сообщество — смешанную биоплёнку [105, 124, 136]. Если биоплёнка состоит из нескольких видов микроорганизмов, экзометаболиты одного микроорга-

низма могут использоваться для поддержания роста и развития другого [70, 136, 157].

По завершении колонизации микроорганизмами поверхности субстрата и начала формирования экзополисахаридного матрикса происходит процесс созревания биопленки. В зрелой структурированной биоплёнке бактерии практически не делятся, так как разделению клеток препятствует окружающий их полисахаридный матрикс, но сохраняют высокую жизнеспособность [120, 152, 175]. Зрелая биоплёнка через определённый период разрушается, диспергируется, что сопровождается планктонизацией. В разрушении биоплёнки принимают участие собственные сурфактанты бактерий, альгинатлиаза, другие экзополисахаридные лиазы [84, 109]. В итоге клетка получает некоторое количество питательных веществ и освобождается от жёсткой структуры биоплёнки.

В доступной нам литературе найдены работы [101, 102, 114] описывающие процесс биоплёнкообразования различными штаммами *Corynebacterium diphtheriae* на абиотических (гидрофобных и гидрофильных) поверхностях, а также влияние малых доз антибактериальных препаратов на данный процесс.

1.2.2. Ультраструктура бактериальных биоплёнок

С помощью конфокальной сканирующей лазерной микроскопии показано, что независимо от состава, биоплёнки обладают универсальной сложной, с некоторыми незначительными вариациями, гетероцитоархитектоникой (трёхмерные грибовидные или похожие на колонны образования), включающей микроколонии, заключённые в экзополимерный матрикс и окружённые наполненными жидкостью каналами [24, 25, 99, 181].

Синтезированный микроорганизмами матрикс представляет собой многослойный гетерополисахарид, который различен для каждого вида бактерий [134, 147]. Экстрацеллюлярный слой матрикса содержит в гидратированном состоянии полисахариды (декстран, гиалуроновую кислоту, целлюлозу), белки, липиды, нуклеиновые кислоты [147, 182]. Экстрацеллюлярная ДНК участвует в процессе адгезии и межклеточных взаимодействиях [147]. Внутренний слой матрикса наполнен мембранными везикулами, в ряде случаев выступающими как фактор патогенности, содержащими протеазу, щелочную фосфатазу С, а также ферменты, лизирующие пептидогликан. Ферменты везикул выполняют функцию лизиса ослабленных бактериальных клеток, которые в дальнейшем являются источником ростовых факторов для остальных членов микробного сообщества. Все составляющие матрикса разделены каналами, по которым осуществляется транспорт питательных веществ, кислорода, выведение конечных продуктов метаболизма бактериальных клеток [86, 147, 150]. За образование и сохранение каналов в активном состоянии несут ответственность поверхностные структуры — рамнолипиды, состоящие из смеси экзополисахаридов, белков, нуклеиновых кислот, других веществ. Такое устройство микробной популяции получило название биоплёнка, а находящаяся внутри неё система регуляции межклеточных сигналов бактериальных клеток - «*Quorum sensing*» (QS) [10, 76, 88, 129, 147].

Известны три основные системы QS, отличающиеся друг от друга природой сигнальных молекул — аутоиндукторов. Одна из них используется преимущественно грамотрицательными бактериями, другая — грамположительными, третья является универсальной для всех микроорганизмов [10, 88].

Первая система QS грамотрицательных бактерий включает использование в качестве аутоиндукторов (АИ) молекулы ацилированного лактона гомосерина, которые связываются с белком — регулятором 3-оксо-гексано-6-гомосерином лактона, где аутоиндукция осуществляется с помощью двух регуляторных ферментов — лю-

циферазы и гомосерин-лактоно-синтетазы. Активация регуляторных белков индуцирует создание микробами кластеров биоплёнки [25, 111, 168].

Система QS грамположительных бактерий использует олигопептидные АИ — секретируемые во внешнюю среду линейные и циклические формы пептидов, фурановые эфиры, лактоны, хинолоны, их производные соединения [98, 99, 132, 142]. Одни из них взаимодействуют с мембраносвязывающими сенсорными киназами, которые проводят сигнал через мембрану, другие транспортируются в клетку пермеазами олигопептидов, где связываются с внутриклеточными рецепторами, а сигнальным механизмом является каскад фосфорилирование/дефосфорилирование [87, 99]. В цитоплазме у грамположительных бактерий в качестве сигнальных АИ образуются полипептиды, которые разрезаются, модифицируются, экспортируются [85, 130, 147, 159, 177]. Внеклеточные АИ-пептиды взаимодействуют с двухкомпонентными системами, у которых внешняя часть связанного с мембранной сенсорного белка киназы определяет АИ пептида, а затем фосфорилирует и активирует белок-регулятор, связывающийся с ДНК, и моделирует транскрипцию [139, 142]. Биологически активные сигнальные пептиды закодированы в хромосоме, а рецепторные белки — в плаزمиде [110]. Посредством такой коммуникации транслоцируются плазмиды, несущие гены устойчивости к антибиотикам, гены гемолизинов, бактериоцинов и генов вирулентности.

Подобный механизм работы QS грамположительных и грамотрицательных бактерий, основанный на продукции сигнальных молекул-аутоиндукторов (ацетил-гомосерин-лактона и пептидных феромонов), осуществляется на разных уровнях воздействия: транскрипционном, трансляционном, посттрансляционном. За счёт этого в популяции биоплёнки постоянно происходит положительная селекция клонов клеток с выгодными свойствами и отрицательная селекция — элиминация клонов с «ненужными» фенотипами [130, 177].

Третья система QS свойственна всем микроорганизмам. При этом бактериаль-

ная коммуникация осуществляется при помощи *i*-бутиролактона, хинолонов, гидрокситонов, люциферазы (LuxS, LuxR), фуранозила-борат диэфира выступающих в роли аутоиндукторов [67, 122]. Например, у *Vibrio harveyi* рецепторным сенсорным белком является LuxP, непосредственно связывающий АИ. Комплекс LuxP-АИ взаимодействует с мембрано-связанной гистидин-киназой LuxQ. При низких плотностях популяции бактерий LuxQ фосфорилируется и фосфат переносится на цитоплазматический белок LuxU, затем с этого белка на регуляторный белок LuxO, связывающийся с ДНК [138, 151, 167, 169]. Далее происходит активация генов, кодирующих пять регуляторных РНК, белком фосфо-LuxO и сигма 54-субъединицей РНК-полимеразы. Эти РНК взаимодействуют с РНК-шапероном белком Hfq, что приводит к связыванию и дестабилизации мРНК, кодирующей активатор транскрипции LuxR, реализующий внутривидовые межклеточные коммуникации [70, 98, 112, 161, 167].

Бактериальные клетки, интегрированные в биоплёнку, могут подвергаться структурным изменениям, связанным с прикреплённым состоянием и различиями в функциональной активности генов, обусловленными коллективным существованием. У клеток микроорганизмов в составе биоплёнки наблюдается замена поверхностных структур, свойственных планктонным клеткам; появление матрикса, сопровождающегося изменением формы и ультраструктуры; появление межклеточных взаимодействий и коммуникаций, осуществляющихся сигнальными молекулами (аутоиндукторами) в ответ на сигналы внешней среды и наличие дифференцированной экспрессии генов, обеспечивающей повышенную выживаемость всего сообщества.

1.2.3. Резистентность бактериальных биоплёнок к антибактериальным препаратам

Бактерии в составе биоплёнок способны выживать при воздействии антибиотиков в высоких концентрациях, которые не могут быть достигнуты в организме человека при стандартных терапевтических дозах [119, 126]. В то же время известно, что в присутствии доз антибиотиков, меньших, чем МПК, способность к биопленкообразованию у бактерий, в частности, *C. diphtheriae*, увеличивается [102]. При этом микроорганизмы внутри биоплёнки способны проявлять устойчивость одновременно ко многим антибиотикам из разных групп [65, 141]. Такое ограничение проникновения антибактериальных препаратов внутрь сообщества микроорганизмов связывают с условиями взаимодействия антибиотика и его мишени. Мишенями для антибиотиков являются активно растущие клетки микроорганизмов, которые обнаруживаются на периферии кластеров биоплёнки, тогда как внутри — метаболически менее активные [139, 184, 186]. Внутри биоплёнки бактерии более защищены от воздействия антибиотиков, чем на её поверхности. Наличие биополимерных матриц, окружающих биоплёнку, обеспечивает резистентность возбудителя к антибиотикам, связывая антимикробные вещества и препятствуя их диффузии, что может изменить не только химические и физические характеристики клеточной поверхности, но и повлиять на подвижность, гидрофобность, адгезию, биопленкообразование, вирулентность и токсинопродукцию микроорганизмов [75, 119, 141]. При этом резистентность наблюдается к большим молекулам, положительно заряженным аминокликозидам, а применение препаратов, содержащих небольшие антимикробные молекулы, только отдалает срок гибели клеток, но не убивает находящиеся внутри бактерии [65, 73, 180]. Помимо *C. diphtheriae*, способностью к биопленкообразованию обладают и другие коринебактерии (*C. jeikeium* и CDC группы G2), у которых отмечена множественная резистентность к антибактериальным препаратам [114].

При исследовании других грамположительных микроорганизмов в эксперименте *in vitro* показано, что экзополисахариды *S. epidermidis* блокируют синергидный эффект ванкомицина и гентамицина, тогда как биоплёнка *Pseudomonas aeruginosa* лишь замедляет диффузию ципрофлоксацина [94, 95, 103, 153, 165]. Возможно, полисахаридные компоненты матрикса физически инактивируют гликопептиды, создавая с ними комплексы, препятствующие диффузии антибактериальных препаратов в бактериальную клетку [73, 94, 185]. У планктонных бактерий диффузия антибиотика наблюдается на уровне бактериальной клетки в условиях её непосредственного контакта с препаратом. Классическими считаются пять типов механизмов устойчивости планктонных бактерий к антибиотикам: модификация мишени, инактивация антибиотика, активное выделение антибиотика из бактериальной клетки (эффлюкс), нарушение проницаемости внешних структур бактериальной клетки, формирование метаболического «шунта». Формирование биоплёночной устойчивости происходит сложнее и объясняется множественной резистентностью микроорганизмов внутри биоплёнки, которая может быть связана с тремя механизмами [75, 103].

Первый механизм может быть обусловлен существованием в биоплёнках особую устойчивых форм бактерий - персистеров [15, 110, 147]. Персистеры фенотипически идентичны планктонным клеткам, но отличаются от них крайне низкой скоростью метаболизма [53, 118, 119]. У персистеров происходит прекращение синтеза пептидогликана и остановка процесса построения клеточной стенки. Эти клетки не растут и не делятся, их генетический аппарат (хромосомы, белковые системы репликации, репарации, транскрипции) находится в интактном состоянии. В результате действия белков-персистеров блокируется функциональная активность всех мишеней антибиотиков, что опосредует формирование множественной резистентности [124]. Антибиотики с бактерицидным действием в отношении таких микробных клеток оказывают только бактериостатический эффект [110, 135, 147, 160].

Другой механизм множественной резистентности может быть обусловлен, во – первых, способностью внеклеточных полимеров, выделяющихся на поверхность матрикса в виде слизи, инактивировать антибиотик, а во-вторых химическим составом и структурами матрикса, действующими против разных антибиотиков избирательно. Известно о подавлении активности гликопепидов (ванкомицина, тейкопланина), β -лактамов (оксациллина, цефотаксима) слизистым матриксом *S. epidermidis* и *S. aureus* и ингибирующей активности альгинатной слизи *P. aeruginosa* в отношении тобрамицина [164].

Третий механизм множественной лекарственной устойчивости, вероятно, связан с тем, что внутри биоплёнки происходит повышение мутабельности бактериальных клеток и, как следствие, межвидовая экспрессия невыявленных генов резистентности. Формируются клоны бактериальных клеток с разными видами и механизмами устойчивости к антибактериальным препаратам, дополняющими друг друга [126]. К примеру, немукцидальные изоляты *P. aeruginosa* из биоплёнок от больных муковисцидозом способны к продукции высоких уровней β -лактамаз, что отличает их от мукцидных изолятов, лишённых такой способности. Немукцидные бактерии экзоцитируют везикулы, содержащие высокие концентрации β -лактамаз, тем самым обеспечивая защиту своих β -лактамазо-дефицитных «сородичей» от β -лактамных антибиотиков на расстоянии. Мукцид, главным компонентом, которого является альгинат, обеспечивает защиту биоплёночных бактерий от других антимикробных препаратов [65, 66, 80, 103, 111]. Подобный механизм защиты описан для представителей полимикробных биоплёнок. Изоляты стафилококков и энтерококков обладают различными генами резистентности к ванкомицину (*vanA*) и тетрациклинам (*tetS*, *tetU*). Возможность межвидовой передачи генов антибиотикорезистентности к этим антибиотикам от *E. faecium* метиллинорезистентным *S. aureus* обусловлена генетической кооперацией, позволяющей микробному сообществу более рационально использовать свои жизнеобеспечивающие ресурсы и гибко реагировать на поврежда-

ющие факторы, достигая при этом главной стратегической цели — выживания вида [78, 176, 183].

1.2.4. Резистентность бактериальных биоплёнок к факторам иммунитета человека

К настоящему времени накопилось значительное количество данных о том, что микроорганизмы в составе биоплёнки обладают высоким уровнем толерантности к антителам и фагоцитам, что влияет на течение хронических воспалительных заболеваний [2, 3, 5, 69]. Бактерии внутри биоплёнки размножаются и вновь диссоциируют и диссеминируют в прилежащие ткани, нередко формируя очаги хронической персистирующей инфекции после завершения курса лечения и способствуя рецидивированию заболевания [69, 121]. Фагоциты способны распознавать и атаковать биоплёночные структуры, но при этом микроорганизмы их формирующие, менее доступны для фагоцитоза, чем планктонные клетки [154, 171].

Известно, что микроорганизмы, синтезирующие внеклеточный матрикс биоплёнок (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *S. mutans*, *Candida albicans*), содержат в своем составе структуры, которые подавляют фагоциты (ДНК-комплексы, полисахаридные межклеточные адгезины, альгинат, поли-N-ацетилглюкозамин). При этом один из компонентов, входящих в состав матрикса – альгинат, обладает маскирующим эффектом, связывая двухвалентные катионы кальция и магния, что создает барьер между антителами, комплементом, фагоцитами и бактериями [107].

Причина снижения эффективности фагоцитоза биоплёночных культур, вероятно, связана с антифагоцитарным влиянием структур экзополисахаридного матрикса. С одной стороны, фагоциты распознают инфекционный объект — биоплёнку как

«чужое» и пытаются атаковать его, с другой — микробы-возбудители стараются «ускользнуть» от фагоцитоза, используя разнообразные механизмы, направленные на выживание [175]. Так, биопленочная культура *S. epidermidis*, имея на своей поверхности полисахаридный межклеточный адгезин, способна снижать активацию фагоцитов, ингибируя фагоцитарный клиренс [97, 137]. У *S. mutans* экстрацеллюлярный полисахарид повышает выживаемость микробных клеток в системе с нейтрофилами за счёт двукратного снижения продукции кислород-реактивных продуктов нейтрофилов, а входящий в состав матрикса биоплёнок *P. aeruginosa* - альгинат, блокирует направленность хемотаксиса нейтрофилов, делая невозможным проникновение нейтрофилов в глубокие слои микробной биоплёнки [97, 116, 17].

В результате воздействия нейтрофилов запускается механизм мутации генов бактериальных клеток, приводящий к усилению образования биоплёнок [133]. Подобный механизм неконтролируемого формирования мукоидных биоплёнок наблюдается у больных муковисцидозом.

Установлено, что усиливающее воздействие на процессы биоплёнокообразования оказывает и лизоцим (мурамидаза). В экспериментах со *S. aureus* показано, что сорбированный на контактных линзах лизоцим усиливает первый этап адгезии стафилококков, индуцируя реакцию агрегации клеток *S. aureus* [131, 133]. *Streptococcus parasanguinis* экспрессирует на своей поверхности белок Var A1, от которого зависит клеточная адгезия и процесс формирования биоплёнки. Мурамидазы обеспечивают освобождение N-терминального мурамидаза - отщепляемого протеиноподобного домена, опосредующего VarA1-VarA1-взаимодействие, приводящее к аутоагрегации стрептококков и формированию биоплёнки [67].

Результаты изучения влияния лизоцима на бактериальные биоплёнки свидетельствуют о его способности индуцировать и ускорять процесс биоплёнокообразования. Однако, лизоцим обладает и противобиопленочной активностью, поэтому его используют в качестве вещества, защищающего стальную поверхность медицин-

ского оборудования от бактериальной адгезии и биоплёнкообразования [176].

При анализе участия Т-клеточного звена иммунной системы в антибиоплёночном иммунитете обнаружили, что эффекторныe реакции Т-лимфоцитов ассоциируются с иммунным ответом на инфекционные агенты, сопряжённые с внутриклеточным паразитизмом. В связи с этим, экстраклеточные паразиты (пиогенные бактерии) в составе биопленки не должны вызывать Т-клеточный иммунный ответ. В присутствии биоплёнок наблюдается выраженная инфильтрация очага воспаления макрофагами и Т-лимфоцитами, а также локальная продукция цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-12; ФНО α). Присутствие в биоплёночном очаге Т-клеток не означает того, что они выполняют функции, связанные с распознаванием, презентацией антигенных пептидов и атакой (CD8⁺) специфических клеток-мишеней, но не исключает, что они могут быть активными участниками патогенеза хронического бесплёночного процесса за счёт продукции цитокинов [113, 156, 179].

В середине 90-х г. г. в опытах *in vitro* показана антибиоплёночная роль антител и антигенов, что может быть использовано для профилактики биоплёнкообразования. Так, моноклональные антитела к поверхностному адгезину Aap *S. epidermidis*, обеспечивающие фиксацию стафилококков в биоплёнках, подавляют биоплёнкообразование [160, 166]; антитела к клампинг-фактору стафилококка блокируют закрепление стафилококка на коллагене; антитела к фимбриям SMF-1 и SesC-антитела блокируют адгезию и биоплёнкообразование [143, 162]. Перечисленные факты дают представление только о частных реакциях иммунных эффекторов с тем или иным компонентом различных биоплёнок, что не может составить общую картину о реакциях иммунной системы, специфически возникающих при бесплёночных инфекциях.

Проведённый анализ взаимодействий в системе «биоплёнка-иммунитет» позволяет сделать вывод о том, что микробы, входящие в состав биоплёнки, способны извлекать пользу из контакта с рядом факторов врожденного иммунитета, что при-

водит к образованию биоплёнок. Все основные виды иммунитета (врождённый и адаптивный, клеточный и гуморальный) обладают эффективными механизмами, направленными на элиминацию биоплёнок.

1.3. Заключение

Бактериальные биопленки представляют собой сложные микробные сообщества, сформированные множественными слоями бактериальных клеток, прикрепленных к поверхности раздела фаз и друг к другу, покрытых матриксом. Внутри матрикса осуществляются коммуникационные взаимодействия клеток, в том числе, и при участии генетически детерминированного регуляторного механизма «*Quorum Sensing*». В биопленке, по сравнению с планктонными культурами бактерий, иначе протекают физиологические процессы, связанные с продукцией метаболитов и биологически активных веществ, что способствует усилению их защиты от воздействия антибиотиков, факторов врождённого и адаптивного иммунитета. Возникновение у бактерий подобных поведенческих особенностей является одним из факторов, способствующих развитию хронических инфекционных заболеваний у человека.

Изучение процессов биопленкообразования у *C. diphtheriae* с помощью электронной сканирующей микроскопии, проводимой *in situ*, позволит оценить структурно-функциональные характеристики биопленок, в том числе, клеточные структуры, участвующие в их образовании. Знание основных биологических свойств (морфологических, культуральных, ферментативных, токсигенных, а также чувствительности к антибиотикам и способности воздействовать на клетки иммунной системы) биопленочных культур возбудителя дифтерии может дать информацию о возможных способах его защиты от внешних факторов и роли процессов биопленкообразования в длительной персистенции *C. diphtheriae* в организме бактерионосителей.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Штаммы микроорганизмов

Объектом исследования служили типовая и биоплёночная (120- и 720-часовые) культуры музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665, полученного из ГИСК им. Л. А. Тарасевича, и циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺*, выделенного от больного с диагнозом «локализованная форма дифтерии», любезно предоставленного бактериологической лабораторией ФГУ «1002 ЦГСЭН СКВО» г. Ростова-на-Дону. Идентификацию циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* проводили в соответствии с [37] и секвенированием по 16S рРНК (ЗАО «Синтол», г. Москва).

2.2. Моделирование процесса биоплёнкообразования штаммами *Corynebacterium diphtheriae gravis tox⁺*

Культивирование штаммов *C. diphtheriae* осуществляли в пластиковых (гидрофобных) и стеклянных (гидрофильных) 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.* [175]. Предварительно по стандарту Мак Фарланда готовили микробную взвесь *C. diphtheriae* густотой 10^9 КОЕ/мл. Полученную микробную взвесь в разведении 1:100 вносили в объёме 0,1 мл в пробирки с 3 мл мясо-пептонного бульона с добавлением 20% сыворотки КРС и инкубировали в термостате при +37°C до 720 часов. Интенсивность биоплёнкообразования определяли 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. Жидкую фракцию суспензии из пробирок удаляли, двукратно промывали пробирки дистиллированной водой и вносили в них по 4 мл 1% водного раствора кристалл-виолета, выдерживая при комнатной температуре в течение 30 мин. После этого пробирки трижды промывали дистиллированной водой, вносили в них по 4 мл 99% раствора димексида и выдерживали при комнатной температуре 15 мин.

Интенсивность биоплёнкообразования штаммами *C. diphtheriae* оценивали, измеряя оптическую плотность окрашенной жидкости (ОП) на микропланшетном ридере при длине волны 540 нм.

Жизнеспособность *C. diphtheriae* в биоплёнке определяли по уровню высеваемости биоплёночной культуры на кровяно-теллуритовом 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. Для получения биоплёночной культуры из пробирки удаляли жидкую фракцию, двукратно промывали дистиллированной водой. При помощи урологического зонда вертикальными обратнопоступательными движениями снимали с поверхности стекла адгезированную биоплёночную культуру исследуемого микроорганизма. Получившуюся взвесь помещали в пробирки «Эппендорф» и центрифугировали при 1,5 тыс./об. 10 мин, убирали надосадочную жидкость и при помощи физиологического раствора осадок доводили до объёма 1 мл. Осуществляли десятикратные разведения биоплёночной культуры, после чего в объёме 0,05 мл из разведений 10^{-6} - 10^{-10} производили высев на кровяно-теллуритовый агар. Подсчёт выросших колоний осуществляли через 24 часа, приводили показатели к 1 мл и рассчитывали среднюю арифметическую в КОЕ/мл.

2.3. Методы оценки биологических свойств биоплёночных культур штаммов *Corynebacterium diphtheriae gravis tox⁺*

2.3.1. Морфологические свойства *C. diphtheriae* проверяли в мазках, окрашенных по методу Грама, Нейссера, метиленовой синью Лёффлера [36]. Электронно-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⁺* № 665 и *C. diphtheriae gravis tox⁺* (циркулирующий), адгезированные к подложке, подвергали химической фиксации. Бактериальные клетки обрабатывали 4%-ным раствором глутарового альдегида и 40%-ным раствором формальдегида, фиксировали в течение 24 часов при комнатной температуре. Образцы биоплёночных *C. diphtheriae* после фиксации дегидратировали. Дегидратацию образцов проводили в охлаждённых до +4°C водных растворах этилового спирта возрастающей концентрации для предотвращения экстракции различных компонентов клеток (30% – 15 мин; 50% – 15 мин; 70% – 15 мин; 96% – 15 мин; 100% – 15 мин) и в 100% ацетоне (двукратно по 10 мин). Затем образцы биоплёнок высушивали на воздухе.

Обезвоженные 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.

2.3.2. Культуральные свойства *C. diphtheriae* исследовали при посеве культур на КТА и 20% сывороточный агар согласно Методическим указаниям [37] и Приказу № 535 [51].

2.3.3. 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 бактерий определяли с помощью специальной питательной среды – агара для теста на ДНК-азу с толуидиновым синим (производство фирмы «HiMedia Laboratories Pvt. Ltd», Индия). Посев микроорганизмов на пластинку агара осуществляли в виде бляшки 5 - 7 мм, инкубировали 24 - 72 часов при +37° С. Наличие и активность ДНК-азы определяли по изменению цвета питательной среды (с синего на розовый) вокруг сформированной бляшки.

2.3.4. Токсинообразование *C. diphtheriae* определяли с помощью теста Элека [37]. Учёт результатов теста на среде ОТДМ с 20% сывороткой КРС проводили через 24-48 часов по образованию линий преципитации, сливающихся с линиями преципитации контрольных токсигенных штаммов.

Определение гена токсигенности штаммов *C. diphtheriae* проводили с помощью ПЦР. Использовали тестирование гена ДТ со специфическими праймерами, комплементарными двум участкам гена ДТ, последовательность которого опубликована в работе [208] с помощью программы *Vector NTI*: прямой *TCATTGAGGAGTAGGTCCCGATTGG* – *forDt* и обратный *GCCACGTTTTCSACGGGTTTC* – *revDt*. Комплекты реагентов для ПЦР-амплификации ДНК с детекцией в режиме реального времени (формат «Real-time») получали в ООО «НПО ДНК-Технология» (г. Москва). Для этого амплифицирован участок ДНК длиной 755 пар нуклеотидов гена ДТ (от 143 пары до 897 включительно). Температурный режим ПЦР следующий: (93°С – 30 сек) – 1 цикл; (93°С-20 сек, 60°С-20 сек., 73°С-30 сек.) – 35 циклов; (73° С – 60 сек.) – 1 цикл.

Данные, полученные при проведении ПЦР, сопоставляли с результатами теста Элека.

2.3.5. Определение белково-углеводного состава биоплёнок *C. diphtheriae* проводили по методике Lowry O.H., et.al. [123], суммарную концентрацию углеводов – по методу Dubois M. [92].

2.3.6. Влияние *Corynebacterium diphtheriae* на клетки иммунной системы человека

Для получения нейтрофилокинов (НфК) мышам вводили внутривентриально 2 мл 0,1% раствора гликогена на стерильном забуференном изотоническом растворе натрия хлорида (рН 7,2). Умерщвление животных осуществляли методом цервикальной дислокации после предварительной наркотизации с помощью тиопентала натрия в дозе 5мг/кг через 4 часа после введения препарата. Перитонеальный экссудат, содержащий до 90% нейтрофилов (Нф), получали путём вымывания из брюшной полости мышей средой 199 (10 мл), содержащей 20% инактивированной (+ 56⁰ С, 30 мин.) сыворотки крупного рогатого скота, 5 ед/мл гепарина и пенициллин (100 мг/л). В качестве индуктора синтеза нейтрофилокинов использовали клетки *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665 густотой 0,5 КОЕ (500 млн. м.т./мл). Контролем служил 0,15 М раствор натрия хлорида. Длительность примирования клеток указанными препаратами составила 4 часа при + 37⁰С в атмосфере 5% СО₂. После окончания срока инкубации супернатанты получали центрифугированием культуральных жидкостей при 1000 об/мин в течение 10 мин. и изучали регуляторное влияние полученных НфК на фагоцитарную активность макрофагов и их устойчивость к апоптогенному действию типовой и биоплёночной культур исследованных штаммов *C. diphtheriae tox⁺*.

Фагоцитарную активность макрофагов определяли по следующим показателям: фагоцитарное число (ФЧ) – среднее количество поглощённых частиц на 1 клетку; фагоцитарный индекс (ФИ) – процент фагоцитирующих клеток; индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ) – отношение количества колоний в контроле к количеству колоний в опыте. Для постановки реакции фагоцитоза [30] перитонеальный

экссудат (0,8 мл) смешивали с микробной взвесью типовой и биоплёночной культуры исследованных штаммов *C. diphtheriae* густотой 0,5 КОЕ (0,04 мл) и НфК (опыт) или изотоническим раствором натрия хлорида (контроль) в объёме по 0,04 мл. Для определения ФЧ и ФИ через 15 минут инкубации готовили мазки и окрашивали по Романовскому - Гимзе. Для определения ИЗФ проводили высева из полученных смесей в объёме 0,02 мл на чашки с 20% сывороточным агаром через 1,5 часа. Чашки инкубировали при + 37⁰ С 24 часа, после чего проводили подсчёт количества выросших колоний и определяли ИЗФ.

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 [59]. Для исследования использовали взвеси культур коринебактерий густотой 0,5 КОЕ (500 млн. м.т./мл) в разведении 1/10, которые соединяли с перитонеальным экссудатом и НфК или изотоническим раствором натрия хлорида в равных объёмах.

2.4. Определение чувствительности к антибиотикам типовых и биоплёночных культур музейного и циркулирующего штаммов *C. diphtheriae* определяли методом серийных разведений (микрометодом) в жидкой питательной среде [45] к 9 антибактериальным препаратам (АБП), применяемым в клинической практике для лечения дифтерии (бензилпенициллин, цефотаксим, цефазолин, гентамицин, ванкомицин, анаэроцеф (цефокситин), цефтриаксон, линкомицину, канамицин). Результаты оценивали спектрофотометрически, сравнивая рост микроорганизмов в присутствии АБП с ростом культуры в лунке без АБП. За МПК принимали минимальную концентрацию, обеспечивающую полное подавление

видимого роста типовых и биоплёночных культур музейного и циркулирующего штаммов *C. diphtheriae*.

2.5. Статистические методы

Статистическую обработку полученных данных осуществляли общепринятыми методами с определением средних арифметических (M) и относительных величин (P), средних ошибок средних арифметических (m_M) и относительных величин (m_P) [11, 39, 56]. Достоверность различий показателей для относительных величин оценивали по тесту Фишера, для абсолютных величин — с помощью t — критерия Стьюдента или критерия достоверности разности для параметрических показателей, а также непараметрических критериев статистики (χ -квадрат) для сравнения малых выборок [14].

При обработке данных использовали персональный компьютер *IBMPC/XT*. Программы реализованы в среде электронных таблиц *Excel* [50]. Статистический анализ выполняли на персональном компьютере (операционная система «*Window 2007*») в электронных таблицах *Microsoft Excel 2007*.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Глава 3. Моделирование процесса биоплёнкообразования у

Corynebacterium diphtheriae gravis tox⁺

В настоящее время накопилось значительное количество данных о том, что микроорганизмы в составе биоплёнки способны влиять на патогенез многих острых и, особенно, хронических бактериальных инфекций человека [13]. Способность к пленкообразованию даёт микроорганизму селективное преимущество, способствуя колонизации. Формирование биопленки необходимо паразиту не столько для передачи, сколько для создания его резервуара в природе. Возможно, образование биопленки *C. diphtheriae gravis tox⁺* объясняет его персистенцию в организме и обеспечивает формирование бактерионосительства, несмотря на наличие системного и местного (мукозального) иммунитета [6, 31].

3.1. Отработка режима получения массы биоплёнки *Corynebacterium diphtheriae*

В исследовании использованы штаммы *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665, полученный из ГИСК им. Л. А. Тарасевича, и *C. diphtheriae gravis tox⁺*, выделенный от больного с диагнозом «локализованная форма дифтерии» бактериологической лабораторией ФГУ «1002 ЦГСЭН СКВО» г. Ростова-на-Дону. Процесс биоплёнкообразования штаммов *C. diphtheriae* исследован при культивировании в пластиковых и стеклянных пробирках. В качестве основных параметров при сравнении способности *C. diphtheriae* формировать биоплёнку послужили колебания диапазона оптической плотности (ОП) и оценка уровня высеваемости *C. diphtheriae*, входящих в состав биоплёнки.

При исследовании показателей ОП массы биопленки - матрикса штаммов *C. diphtheriae* при культивировании в пластиковых пробирках ОП интенсивности образования матрикса музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665 (таблица 3.1, рисунок 3.1) колебалась в пределах от 0,101 до 0,331, циркулирующего штамма (таблица 3.2, рисунок 3.1) — от 0,060 до 0,269. При культивировании в стеклянных пробирках диапазон колебаний ОП интенсивности образования матрикса как у музейного (от 0,233 и до 0,524), так и у циркулирующего (от 0,062 и до 0,481) штаммов *C. diphtheriae* был значительно выше.

При этом динамика образования матрикса при культивировании *C. diphtheriae* как на пластике, так и на стекле имела общие закономерности. С момента начала культивирования происходило интенсивное нарастание уровня ОП до 120-го часа. При этом уровень адгезии на стекле, как для музейного, так и циркулирующего штаммов был выше (ОП — 0,630 и 0,290 соответственно), чем на пластике (ОП — 0,120 и 0,150 соответственно). Далее к 168-му часу культивирования наблюдали снижение интенсивности образования матрикса до значений ОП — 0,111- 0,133 на пластике и ОП — 0,209 - 0,395 на стекле. После этого с 192-го часа культивирования происходило постепенное нарастание значений ОП до 720-го часа как в пластиковых (ОП — 0,269 - 0,331), так и в стеклянных (ОП — 0,481- 0,524) пробирках.

Сравнительный анализ динамики образования массы биоплёнки показал, что наиболее интенсивно этот процесс происходил на гидрофильной поверхности (стекло), чем на гидрофобной (пластик) у двух исследованных штаммов.

При сравнении процесса образования матрикса музейным и циркулирующим штаммами *C. diphtheriae gravis tox⁺* выявлены незначительные различия при их культивировании на гидрофобных поверхностях (пластик), начиная с 528-го часа (табл. 3.1, 3.2, рис. 3.1). При этом уровень интенсивности образования матрикса музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* несколько выше (ОП — от 0,256 до 0,331), чем циркулирующего (ОП - от 0,208 до 0,269). При культивировании на стекле ин-

тенсивность образования матрикса музейным штаммом *C. diphtheriae gravis tox⁺* значительно выше (диапазон колебаний ОП составил от 0,233 до 0,630), чем циркулирующим (ОП от 0,062 до 0,481). При исследовании динамики образования массы биоплёнки наиболее чётко это прослеживалось с 48-го часа по 528-й час культивирования.

Максимальные различия ОП (0,340) выявлены на пике процесса биоплёнкообразования на 120-й час при культивировании на стекле. Далее с 192-го по 720-й час культивирования двух штаммов наблюдали постепенное нарастание значений ОП до 0,524 и 0,481 у музейного и циркулирующего штамма соответственно.

При исследовании динамики показателей ОП планктонных клеток музейного и циркулирующего штаммов *C. diphtheriae gravis tox⁺* при культивировании как в стеклянных, так и в пластиковых пробирках выявлена обратная закономерность (таблица 3.1, 3.2, рисунок 3.2). В начале культивирования наблюдалась положительная тенденция роста ОП планктонной культуры до 168-го часа, когда показатели ОП имели максимальные значения (от 1,096 до 1,411). Начиная с 192-го часа культивирования наблюдали резкое снижение роста бактериальных клеток планктонной культуры до значений ОП от 0,728 до 0,939. Далее до 720-го часа культивирования происходило постепенное снижение ОП до значений от 0,101 до 0,223. Уменьшение оптической плотности планктонных клеток на поздних сроках культивирования свидетельствовало, по всей видимости, об отмирании и лизисе большей части популяции бактерий.

3.2. Определение жизнеспособности *Corynebacterium diphtheriae*

Жизнеспособность *C. diphtheriae*, входящих в состав биоплёнки, оценивали по уровню высеваемости на кровяно-теллуритовом агаре.

При исследовании динамики высеваемости бактерий из массы биопленки *C. diphtheriae* (таблица 3.3, рисунок 3.3) до 168-го часа культивирования никаких отличий между циркулирующим и музейным штаммами, выросшими как в пластиковых, так и в стеклянных пробирках не установлено: уровень высеваемости был низким и колебался в пределах от $0,12 \times 10^6$ КОЕ/мл до $2,0 \times 10^6$ КОЕ/мл. Начиная с 192-го часа культивирования произошло резкое увеличение уровня высеваемости бактерий из матрикса двух исследованных штаммов, выросших как в пластиковых, так и в стеклянных пробирках. При этом уровень высеваемости у штаммов, выросших в стеклянных пробирках, значительно выше такового (для циркулирующего штамма $11,7 \times 10^6$ КОЕ/мл и для музейного — $19,0 \times 10^6$ КОЕ/мл), чем у двух исследованных штаммов, выросших в пластиковых пробирках ($5,5 \times 10^6$ КОЕ/мл).

До 720-го часа культивирования наблюдалось постепенное нарастание уровня высеваемости бактерий из массы биопленки. При этом уровень высеваемости бактерий из матрикса *C. diphtheriae*, выросших в стеклянных пробирках значительно выше, чем в пластиковых.

Вне зависимости от условий культивирования уровень высеваемости бактерий из массы биоплёнки музейного штамма *C. diphtheriae* выше, чем циркулирующего.

При изучении уровня высеваемости планктонной культуры музейного и циркулирующего штаммов *C. diphtheriae gravis tox⁺* при культивировании на гидрофобной и гидрофильной поверхностях выявлена обратная закономерность (таблица 3.3, 3.4, рисунок 3.4).

Таблица 3.1 – Динамика образования массы биопленки штаммом *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665

Сутки	Экспозиция (ч)	Планктон (стекло, ОП)	Контроль (стекло, ОП)	Планктон (пластик, ОП)	Контроль (пластик, ОП)	Матрикс (стекло, ОП)	Контроль (стекло, ОП)	Матрикс (пластик, ОП)	Контроль (пластик, ОП)
2	48	1,047	0,032	0,891	0,033	0,233	0,032	0,101	0,033
3	72	1,094	0,032	0,955	0,033	0,362	0,032	0,092	0,033
4	96	1,066	0,032	1,049	0,033	0,40	0,032	0,104	0,033
5	120	1,161	0,033	1,060	0,033	0,63	0,033	0,120	0,033
6	144	1,167	0,032	1,066	0,033	0,543	0,032	0,167	0,033
7	168	1,315	0,033	1,096	0,033	0,395	0,033	0,133	0,033
8	192	0,844	0,034	0,728	0,034	0,399	0,034	0,137	0,034
9	216	0,800	0,033	0,624	0,034	0,404	0,033	0,144	0,034
10	240	0,797	0,033	0,655	0,034	0,421	0,033	0,152	0,034
11	264	0,790	0,034	0,593	0,034	0,429	0,034	0,158	0,034
12	288	0,783	0,034	0,584	0,034	0,435	0,034	0,163	0,034
13	312	0,754	0,034	0,557	0,034	0,447	0,034	0,179	0,034
14	336	0,703	0,034	0,463	0,034	0,455	0,034	0,186	0,034
15	360	0,642	0,033	0,402	0,034	0,459	0,033	0,188	0,034

16	84	0,639	0,033	0,383	0,034	0,463	0,033	0,194	0,034
17	408	0,607	0,033	0,337	0,034	0,470	0,033	0,206	0,034
18	432	0,573	0,034	0,300	0,034	0,469	0,034	0,213	0,034
19	456	0,569	0,033	0,297	0,034	0,467	0,033	0,220	0,034
20	480	0,567	0,034	0,221	0,035	0,471	0,034	0,237	0,035
21	504	0,562	0,034	0,191	0,035	0,477	0,034	0,241	0,035
22	528	0,542	0,034	0,184	0,035	0,483	0,034	0,256	0,035
23	552	0,528	0,034	0,183	0,035	0,488	0,034	0,267	0,035
24	576	0,516	0,034	0,170	0,035	0,494	0,034	0,274	0,035
25	600	0,463	0,034	0,100	0,035	0,499	0,034	0,281	0,035
26	624	0,447	0,034	0,101	0,035	0,502	0,034	0,292	0,035
27	648	0,401	0,034	0,103	0,035	0,507	0,034	0,301	0,035
28	672	0,238	0,034	0,100	0,035	0,511	0,034	0,316	0,035
29	696	0,225	0,034	0,100	0,035	0,518	0,034	0,324	0,035
30	720	0,223	0,034	0,101	0,035	0,524	0,034	0,331	0,035

Таблица 3.2 - Динамика образования массы биоплёнки циркулирующим штаммом *C. diphtheriae gravis tox*⁺

Сутки	Экспозиция (ч)	Планктон (стекло, ОП)	Контроль (стекло, ОП)	Планктон (пластик, ОП)	Контроль (пластик, ОП)	Матрикс (стекло, ОП)	Контроль (стекло, ОП)	Матрикс (пластик, ОП)	Контроль (пластик, ОП)
2	48	1,025	0,032	0,916	0,033	0,062	0,032	0,060	0,033
3	72	1,082	0,032	0,926	0,033	0,163	0,032	0,062	0,033
4	96	1,225	0,032	1,020	0,033	0,164	0,032	0,093	0,033
5	120	1,294	0,033	1,040	0,033	0,290	0,033	0,150	0,033
6	144	1,333	0,032	1,076	0,033	0,238	0,032	0,139	0,033
7	168	1,411	0,033	1,304	0,033	0,209	0,033	0,111	0,033
8	192	0,852	0,034	0,939	0,034	0,246	0,034	0,118	0,034
9	216	0,797	0,033	0,917	0,034	0,268	0,033	0,120	0,034
10	240	0,772	0,033	0,894	0,034	0,277	0,033	0,125	0,034
11	264	0,742	0,034	0,846	0,034	0,286	0,034	0,136	0,034
12	288	0,715	0,034	0,778	0,034	0,289	0,034	0,141	0,034
13	312	0,692	0,034	0,765	0,034	0,298	0,034	0,141	0,034
14	336	0,668	0,034	0,743	0,034	0,299	0,034	0,148	0,034
15	360	0,642	0,033	0,701	0,034	0,303	0,033	0,155	0,034

16	84	0,630	0,033	0,675	0,034	0,321	0,033	0,159	0,034
17	408	0,625	0,033	0,549	0,034	0,350	0,033	0,168	0,034
18	432	0,464	0,034	0,497	0,034	0,364	0,034	0,170	0,034
19	456	0,299	0,033	0,410	0,034	0,378	0,033	0,182	0,034
20	480	0,245	0,034	0,383	0,035	0,392	0,034	0,199	0,035
21	504	0,232	0,034	0,270	0,035	0,400	0,034	0,201	0,035
22	528	0,200	0,034	0,254	0,035	0,410	0,034	0,208	0,035
23	552	0,197	0,034	0,243	0,035	0,414	0,034	0,211	0,035
24	576	0,191	0,034	0,231	0,035	0,426	0,034	0,216	0,035
25	600	0,185	0,034	0,200	0,035	0,447	0,034	0,222	0,035
26	624	0,184	0,034	0,201	0,035	0,454	0,034	0,230	0,035
27	648	0,177	0,034	0,199	0,035	0,459	0,034	0,234	0,035
28	672	0,171	0,034	0,142	0,035	0,464	0,034	0,255	0,035
29	696	0,170	0,034	0,144	0,035	0,469	0,034	0,267	0,035
30	720	0,172	0,034	0,142	0,035	0,481	0,034	0,269	0,035

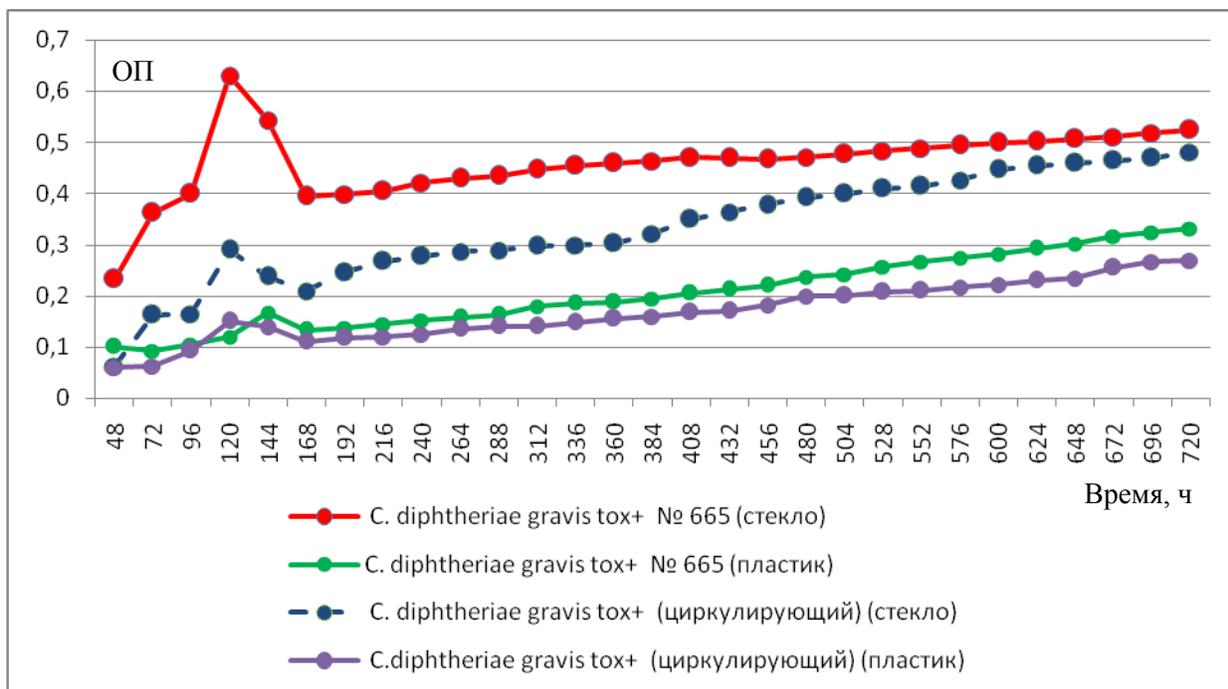


Рисунок 3.1 Показатели оптической плотности (ОП) массы биоплёнки штаммов *C. diphtheriae gravis tox⁺* при длине волны 540 нм

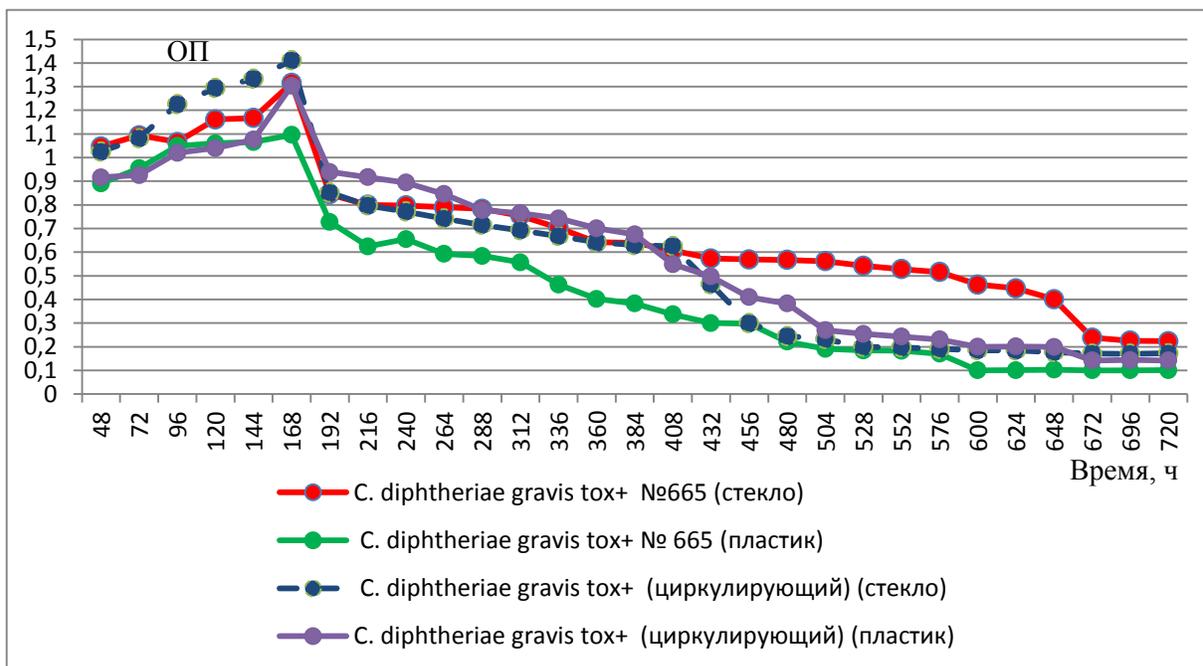


Рисунок 3.2 Показатели оптической плотности (ОП) планктонных клеток штаммов *C. diphtheriae gravis tox⁺* при длине волны 540 нм

С начала культивирования до 168-го часа наблюдали общую положительную динамику роста планктонной культуры. Отмечены различия между ростом бактерий планктонной культуры музейного и циркулирующего штаммов, культивируемых как в пластиковых, так и в стеклянных пробирках. Для музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* максимальных значений уровень высеваемости бактериальных клеток приходился на 72-й час роста и составил $108,0 \times 10^6$ КОЕ/мл при культивировании на стекле и $279,0 \times 10^6$ КОЕ/мл при культивировании в пластиковых пробирках. В то же время для циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* максимальный уровень высеваемости планктонной культуры из пластиковых пробирок приходился на 120-й час роста ($527,0 \times 10^6$ КОЕ/мл), из стеклянных — на 168-й час ($67,1 \times 10^6$ КОЕ/мл). Далее с 192-го часа культивирования наблюдалось резкое снижение размножения бактериальных клеток планктонной культуры двух исследованных штаммов, культивируемых как на стекле, так и на пластике до значений уровня высеваемости от $44,7 \times 10^6$ КОЕ/мл до $34,6 \times 10^6$ КОЕ/мл. К 720-му часу культивирования происходило постепенное снижение уровня высеваемости до $4,7 \times 10^6$ КОЕ/мл.

Анализ высеваемости при продолжительных сроках культивирования музейного и циркулирующего штаммов *C. diphtheriae gravis tox⁺* показал обратную закономерность между уровнем высеваемости бактерий из матрикса и планктонной культуры исследованных штаммов (рисунок 3.3, рисунок 3.4).

У циркулирующего штамма *C. diphtheriae* как на пластике, так и на стекле количество высеваемых бактерий из массы биоплёнки возрастало с 192-го часа до 720-го часа (от $11,7 \times 10^6$ КОЕ/мл до $22,9 \times 10^6$ КОЕ/мл), тогда как количество планктонной культуры в этот временной промежуток имело тенденцию к снижению (от $40,5 \times 10^6$ КОЕ/мл до $6,6 \times 10^6$ КОЕ/мл). Для музейного штамма отмечена аналогичная зависимость: высокий уровень высеваемости бактерий из матрикса (от $5,5 \times 10^6$ КОЕ/мл до $24,9 \times 10^6$ КОЕ/мл) совпадал с низким уровнем высеваемости планктонной культуры (от $40,1 \times 10^6$ до $4,7 \times 10^6$ КОЕ/мл).

Таблица 3.3 - Уровень высеваемости планктонной культуры и из массы биоплёнки штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺ № 665* на кровяно-теллуритовом агаре

Сутки	Время экспозиции (ч)	Уровень высеваемости планктонной культуры (стекло) $n \times 10^6$ (КОЕ/мл)	Уровень высеваемости планктонной культуры (пластик) $n \times 10^6$ (КОЕ/мл)	Уровень высеваемости из матрикса (стекло) $n \times 10^6$ (КОЕ/мл)	Уровень высеваемости из матрикса (пластик) $n \times 10^6$ (КОЕ/мл)
2	48	50,0	41,4	1,9	1,0
3	72	108,0	279,0	2,0	0,12
4	96	9,5	25,0	2,6	1,6
5	120	1,0	2,0	2,9	3,0
6	144	1,0	1,0	2,0	2,0
7	168	1,0	1,0	2,0	1,0
8	192	40,1	34,6	19,0	5,5
9	216	38,0	29,7	19,2	6,8
10	240	37,9	31,1	20,0	7,2
11	264	37,6	28,2	20,4	7,3
12	288	37,2	27,8	20,7	7,7
13	312	35,9	26,5	21,2	8,5
14	336	33,4	22,0	21,6	8,8
15	360	30,5	19,1	21,8	8,9
16	84	30,4	18,2	22,0	9,2
17	408	28,9	16,0	22,3	9,8
18	432	27,2	14,2	22,3	9,9
19	456	27,0	14,1	22,2	10,4
20	480	27,0	10,5	22,4	11,2
21	504	26,7	9,0	22,6	11,4
22	528	25,8	8,7	23,0	12,1
23	552	25,1	8,7	22,3	12,7
24	576	24,6	8,0	23,5	13,0
25	600	22,0	4,7	23,7	13,3
26	624	21,2	4,7	23,9	13,9
27	648	19,0	4,7	24,1	14,3
28	672	11,3	4,7	24,3	15,0
29	696	10,7	4,7	24,6	15,4
30	720	10,8	4,7	24,9	15,7

Таблица 3.4 - Уровень высеваемости планктонной культуры и из массы биоплёнки циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox*⁺ на кровяно-теллуритовом агаре

Сутки	Время экспозиции (ч)	Уровень высеваемости планктонной культуры (стекло) $n \times 10^6$ (КОЕ/мл)	Уровень высеваемости планктонной культуры (пластик) $n \times 10^6$ (КОЕ/мл)	Уровень высеваемости из матрикса (стекло) $n \times 10^6$ (КОЕ/мл)	Уровень высеваемости из матрикса (пластик) $n \times 10^6$ (КОЕ/мл)
2	48	48,0	43,6	2,9	2,8
3	72	51,5	8,0	0,14	0,27
4	96	59,7	410,0	0,972	0,36
5	120	61,6	527,0	33,1	0,85
6	144	63,4	167,0	0,85	0,85
7	168	67,1	137,0	0,313	0,15
8	192	40,5	44,7	11,7	5,6
9	216	37,9	43,6	12,7	5,7
10	240	36,7	42,5	13,1	5,8
11	264	35,3	40,2	13,6	6,4
12	288	34,0	37,0	13,7	6,7
13	312	32,9	36,4	14,1	6,7
14	336	31,8	35,3	14,2	6,7
15	360	30,5	33,3	14,4	7,2
16	84	30,0	32,1	15,2	7,3
17	408	29,7	26,1	16,6	8,0
18	432	22,0	23,6	17,3	8,0
19	456	14,2	19,5	18,0	8,6
20	480	11,6	18,2	18,6	9,4
21	504	11,0	12,8	19,0	9,4
22	528	9,5	12,0	19,5	9,9
23	552	9,3	11,5	19,7	10,0
24	576	9,0	11,0	20,2	10,1
25	600	8,8	9,5	21,2	10,5
26	624	8,7	9,5	21,6	10,9
27	648	8,4	9,4	21,8	11,1
28	672	8,1	6,7	22,0	12,1
29	696	8,0	6,6	22,3	12,7
30	720	8,1	6,6	22,9	12,8

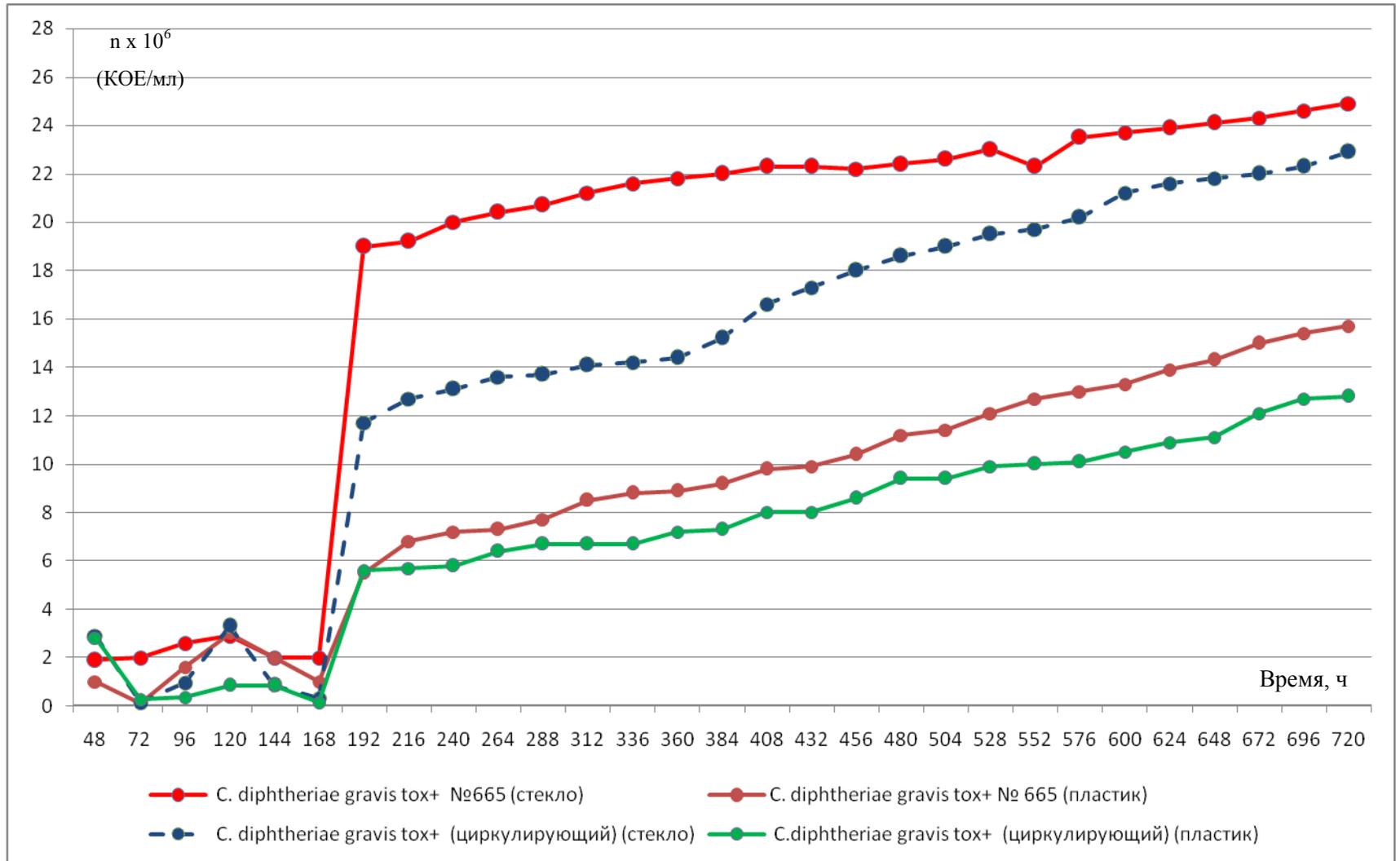


Рисунок 3.3 Уровень высеваемости из массы биоплёнки штаммов *C. diphtheriae gravis tox+*

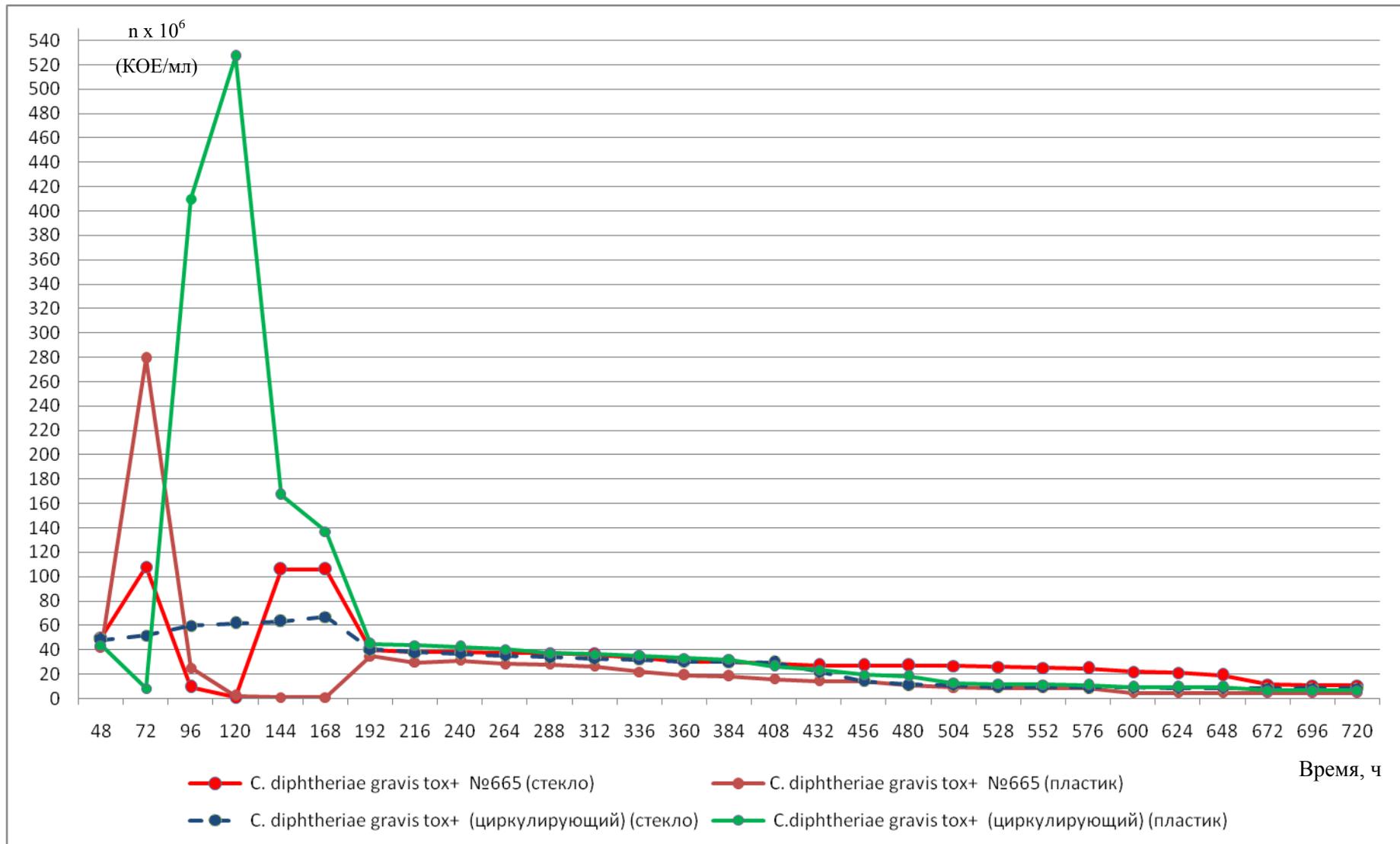


Рисунок 3.4. Уровень высеваемости планктонной культуры штаммов *C. diphtheriae gravis tox*⁺

3.3. Заключение

Полученные результаты свидетельствовали о том, что *C. diphtheriae* обладает способностью к образованию биоплёнки. При этом выявлены отличия между интенсивностью формирования массы биоплёнки и уровнем высеваемости бактерий музейного и циркулирующего штаммов *C. diphtheriae gravis tox⁺* при длительном их культивировании *in vitro*. Установлено, что при повышении уровня формируемого матрикса как музейным, так и циркулирующим штаммами, количество жизнеспособных планктонных клеток снижалось. Наиболее высокой адгезивной активностью исследованные штаммы *C. diphtheriae* обладали по отношению к стеклу, чем пластику.

Глава 4. Биологические свойства биоплёночных культур музейного и циркулирующего штаммов *Corynebacterium diphtheriae gravis tox*⁺

Изучение биологических свойств *C. diphtheriae* проводили на типовой культуре и экспериментальной модели биоплёнки (120- и 720-часовой) музейного и циркулирующего штаммов *C. diphtheriae*. В качестве основных параметров при сравнении типовой и биоплёночных культур *C. diphtheriae* служили морфологические и тинкториальные свойства, культуральные свойства (характер и размер выросших колоний), ферментативные свойства (способность к расщеплению сахаров (глюкоза, мальтоза, сахароза, крахмал), ДНК-азная активность и токсигенность штаммов.

4.1. Морфологические свойства

4.1.1. Световая микроскопия

Световое микроскопическое исследование типовой и биоплёночных (120- и 720-часовых) культур *C. diphtheriae gravis tox*⁺, выращенных *in vitro*, показало, что по форме и расположению бактерий и их тинкториальным свойствам различий между штаммами не выявлено (таблица 4.1). Окрашивание типовой и биоплёночных культур *C. diphtheriae* двух исследованных штаммов по методу Грама, Нейссера, метиленовой синью показало одинаковую способность воспринимать анилиновые красители (таблица 4.1). Типовые и биоплёночные культуры музейного и циркулирующего штаммов *C. diphtheriae* имели вид прямых или слегка изогнутых тонких грамположительных полиморфных палочек с заострёнными или булавовидными концами. В мазках они располагались под углом, напоминая латинские буквы L, X, V, Y или «растопыренные» пальцы рук, на отдельных участках мазка — скоплениями или хаотично.

4.1.2. Электронная сканирующая микроскопия

Электронно-микроскопическое исследование биоплёночных культур музейного и циркулирующего штаммов *C. diphtheriae gravis tox⁺*, выращенных *in vitro*, выявило особенности их организации, а широкий диапазон увеличения (от $\times 500$ до $\times 4000$) позволил более подробно оценить процесс биоплёнкообразования. Исследование препаратов биоплёнок проводили на 120-й и 720-й часы культивирования, соответствующие пикам образования массы биоплёнки.

При увеличении $\times 500$ видно, что как на 120-, так и 720-й часы культивирования двух исследованных штаммов бактерии, покрытые общим слоем матрикса, имели вид губчатой структуры и располагались скоплениями в виде «островков» (рисунок 4.1,4.2).

При увеличении $\times 2000$ как 120-, так и 720- часовые биоплёночные культуры штаммов *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665 имели вид коротких, мелких, цилиндрических клеток, покрытых и связанных друг с другом слизистым слоем матрикса (рисунок 4.3). Консолидируясь, бактерии формировали плотные упаковки в виде «тяжей», покрытых общим матриксом. Для циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺*, культивированного в течение 120 и 720 часов, выявлена подобная картина (рисунок 4.4).

Дальнейшее электронно-микроскопическое исследование препаратов биоплёнок *C. diphtheriae* проводили при увеличении $\times 3000$ - $\times 4000$ (рисунок 4.5, 4.6, 4.7, 4.8). Коринебактерии представляли собой палочки с хорошо видимыми зёрнами волютина, располагавшиеся хаотично и собранные в плотно-сцепленные кластеры, между которыми находилось свободное пространство, формирующее, вероятно, водные каналы. Конгломераты клеток представляли собой структуры, варьировавшие по плотности. Матрикс имел вид множества слизистых, соединяющихся между собой «тяжей паутины», которые покрывали клетки бактерий общим слоем.

Таблица 4.1 - Морфологические свойства типовой и биоплёночных культур штаммов *C. diphtheriae gravis tox*⁺ (данные световой микроскопии)

Метод окра-ски	<i>C. diphtheriae gravis tox</i> ⁺ № 665		<i>C. diphtheriae gravis tox</i> ⁺ (циркулирующий)	
	Типовая культура	Биоплёночная культура (120-и 720-час.)	Типовая культура	Биоплёночная культура (120-и 720-час.)
По Граму	Прямые или слегка изогнутые тонкие грамположительные полиморфные палочки с заострёнными или булавовидными концами. В мазках располагаются под углом, напоминая латинские буквы L, X, V, Y или «растопыренные» пальцы рук.	Прямые или слегка изогнутые тонкие грамположительные полиморфные палочки с булавовидными концами. В мазках располагаются под углом, напоминая латинские буквы L, X, V, Y или «растопыренные» пальцы рук. Отдельные клетки расположены хаотично или скоплениями.	Прямые или слегка изогнутые тонкие грамположительные полиморфные палочки с заостренными или булавовидными концами. В мазках располагаются под углом, напоминая латинские буквы L, X, V, Y или «растопыренные» пальцы рук.	Прямые или слегка изогнутые тонкие грамположительные полиморфные палочки с булавовидными концами. В мазках располагаются под углом, напоминая латинские буквы L, X, V, Y или «растопыренные» пальцы рук. Отдельные клетки расположены хаотично или скоплениями.
По Нейсеру	Внутри клеток в булавовидных утолщениях расположены зерна «волютина» (полиметафосфаты), окрашенные в тёмно-синий или фиолетовый цвет, тело клетки (цитоплазма) - в жёлтый или светло-коричневый цвет.	Клетки имеют булавовидные утолщения с расположенными в них зёрнами «волютина» (полиметафосфаты), окрашенными в тёмно-синий или фиолетовый цвет. Тело клетки (цитоплазма) окрашено в жёлтый или светло-коричневый цвет.	Внутри клеток в булавовидных утолщениях расположены зерна «волютина» (полиметафосфаты), окрашенные в тёмно-синий или фиолетовый цвет, тело клетки (цитоплазма) - в жёлтый или светло-коричневый цвет.	Клетки имеют булавовидные утолщения с расположенными в них зёрнами «волютина» (полиметафосфаты), окрашенными в тёмно-синий или фиолетовый цвет. Тело клетки (цитоплазма) окрашено в жёлтый или светло-коричневый цвет.
Метиленовой синью	Расположенные под углом в виде латинских букв L, X, V, Y или «растопыренных» пальцев рук, тело клетки окрашивается в светло-голубой, а зёрна «волютина» - в тёмно-синий цвета.	Клетки расположены под углом в виде латинских букв L, X, V, Y, «растопыренных» пальцев рук или скоплениями, а отдельные клетки - хаотично. Тело клетки окрашивается в светло-голубой, а зёрна «волютина» - в тёмно-синий цвета.	Расположенные под углом в виде латинских букв L, X, V, Y или «растопыренных» пальцев рук, тело клетки окрашивается в светло-голубой, а зёрна «волютина» - в тёмно-синий цвета.	Клетки расположены под углом в виде латинских букв L, X, V, Y, «растопыренных» пальцев рук или скоплениями, а отдельные клетки - хаотично. Тело клетки окрашивается в светло-голубой, а зёрна «волютина» - в тёмно-синий цвета.

При формировании биоплёнки штаммами *C. diphtheriae gravis tox⁺* содержание углеводов в них не изменялось и варьировало в пределах от 9 до 17 мкг/мл. Как в 120-, так и 720-и часовых биоплёночных культурах коринебактерий количество белка увеличивалось в 5 - 7 раз (133 - 200 мкг/мл) по сравнению с типовыми культурами (19 - 35 мкг/мл) двух исследованных штаммов.

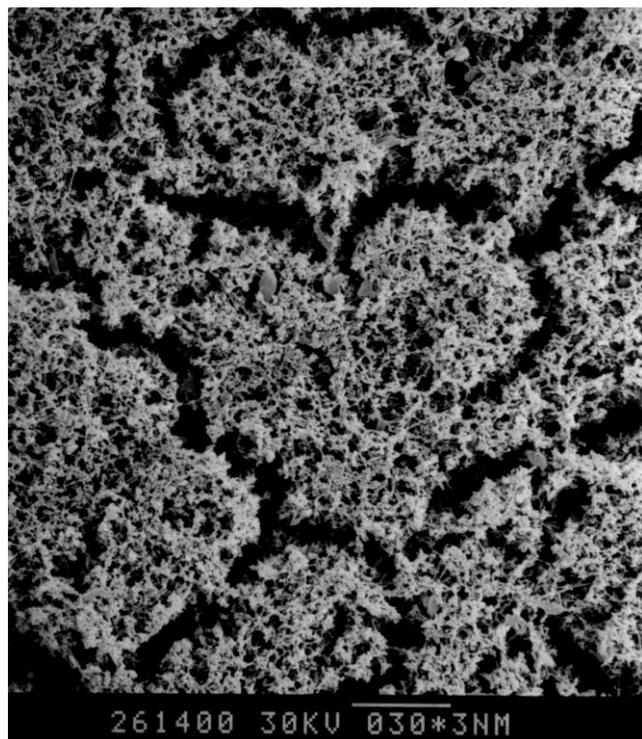
При изучении размеров клеток бактерий типовых и биоплёночных культур штаммов *C. diphtheriae* обнаружены некоторые различия (таблица 4.2.). Известно, что размеры микробных клеток типовой культуры *C. diphtheriae* варьируют в пределах $0,3-0,8 \times 1,5-8,0$ мкм [15, 53]. При анализе их возможных изменений у биоплёночных культур установлено, что на пиках формирования матрикса на 120-й и 720-й часы культивирования ширина клеток бактерий не изменялась и находилась у музейного штамма *C. diphtheriae* в диапазоне от $0,6 \pm 0,04$ до $0,7 \pm 0,1$ мкм, у циркулирующего — от $0,4 \pm 0,01$ до $0,4 \pm 0,03$ мкм, тогда как длина клеток имела достоверные отличия.

Таблица 4.2 - Размеры клеток типовой и биоплёночных культур штаммов *C. diphtheriae gravis tox⁺*

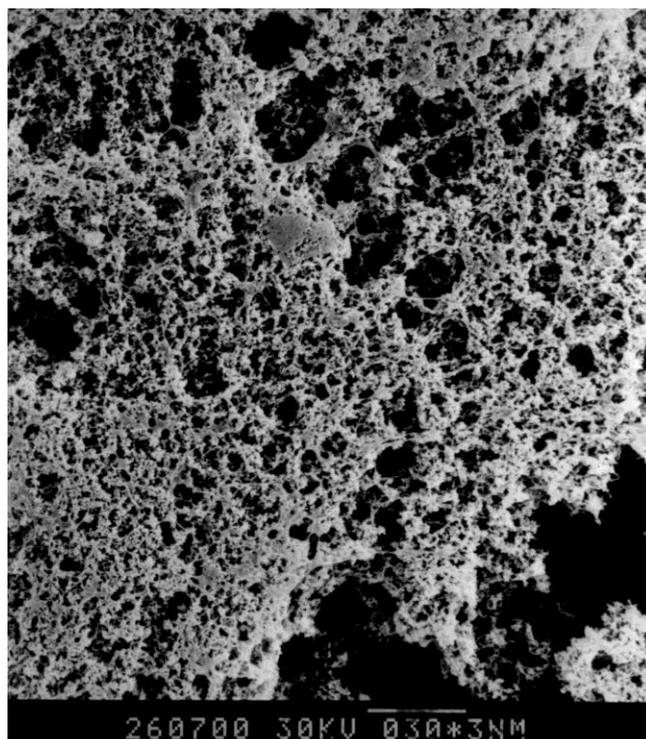
Название культуры		Размеры микробной клетки (мкм)		
		длина (мкм; M±m)	ширина (мкм; M±m)	
Типовая культура	<i>C. diphtheriae gravis tox⁺</i>	1,5-8,0	0,3-0,8	
Биоплёночная культура	<i>C. diphtheriae gravis tox⁺</i> № 665	120-й час культивирования	$1,4 \pm 0,08^*$	$0,6 \pm 0,04$
		720-й час культивирования	$1,7 \pm 0,1^*$	$0,7 \pm 0,1$
	<i>C. diphtheriae gravis tox⁺</i> (циркулирующий)	120-й час культивирования	$1,6 \pm 0,05^*$	$0,4 \pm 0,03$
		720-й час культивирования	$1,3 \pm 0,05^*$	$0,4 \pm 0,001$

Условные обозначения:

* - достоверные отличия ($p \leq 0,05$) между размерами бактериальных клеток биоплёночных культур каждого штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* на 120-й и 720-й часы культивирования.

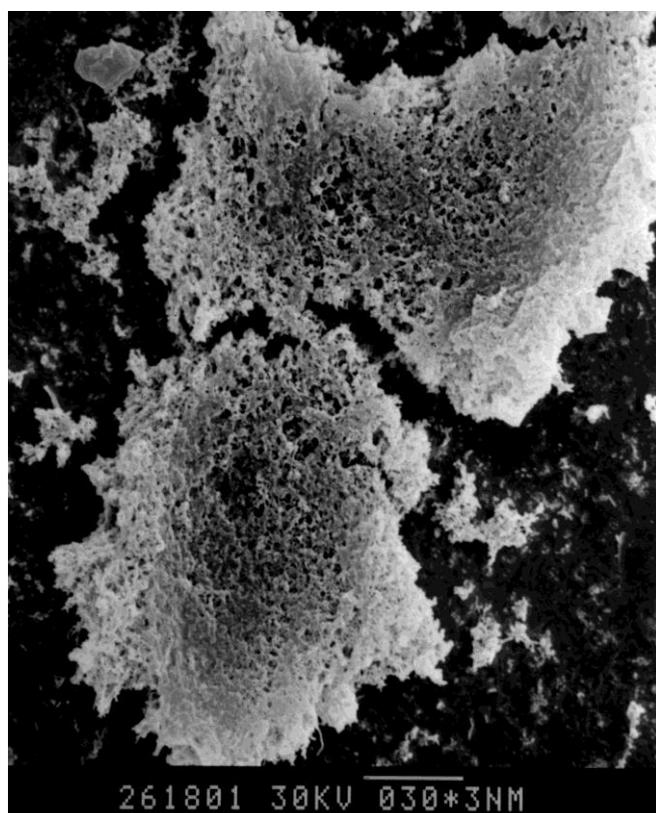


А

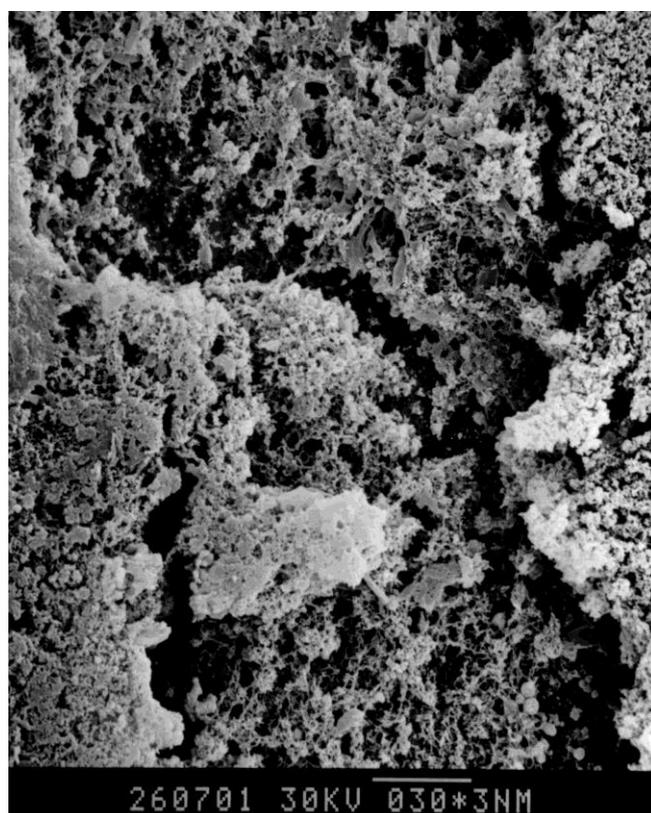


Б

Рисунок 4.1. Электронно-микроскопическое исследование 120- (А) и 720- и часовой (Б) биоплёночных культур штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665 при увеличении $\times 500$.

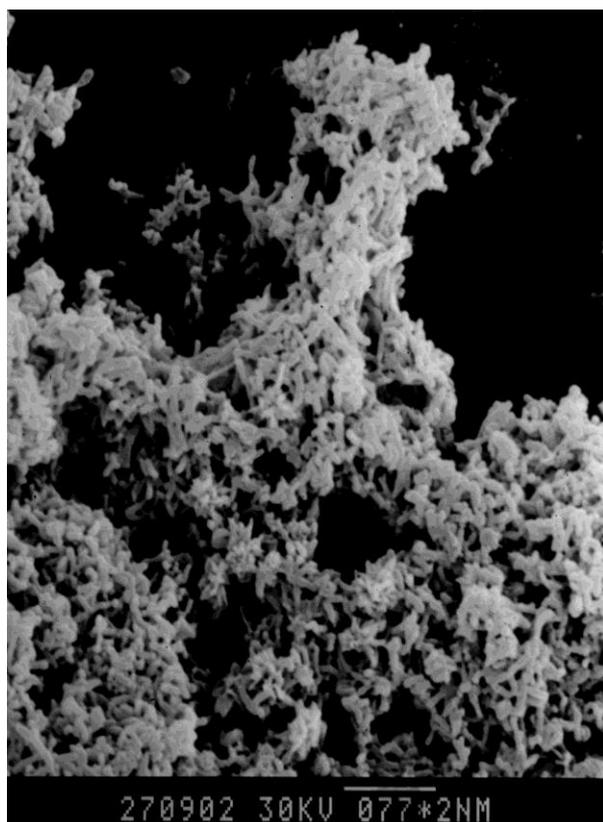


А

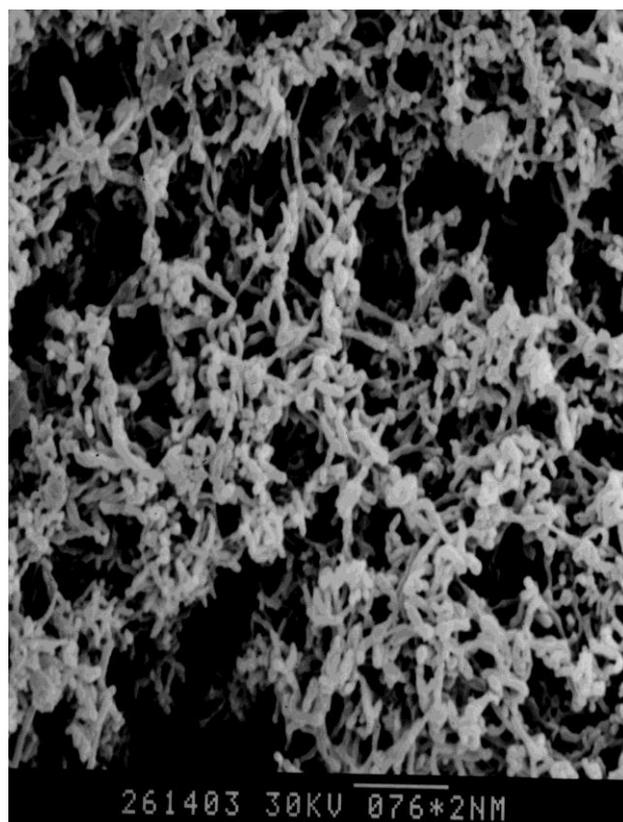


Б

Рисунок 4.2 Электронно-микроскопическое исследование 120- (А) и 720-и часовой (Б) биоплёночных культур штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* (циркулирующий) при увеличении $\times 500$.

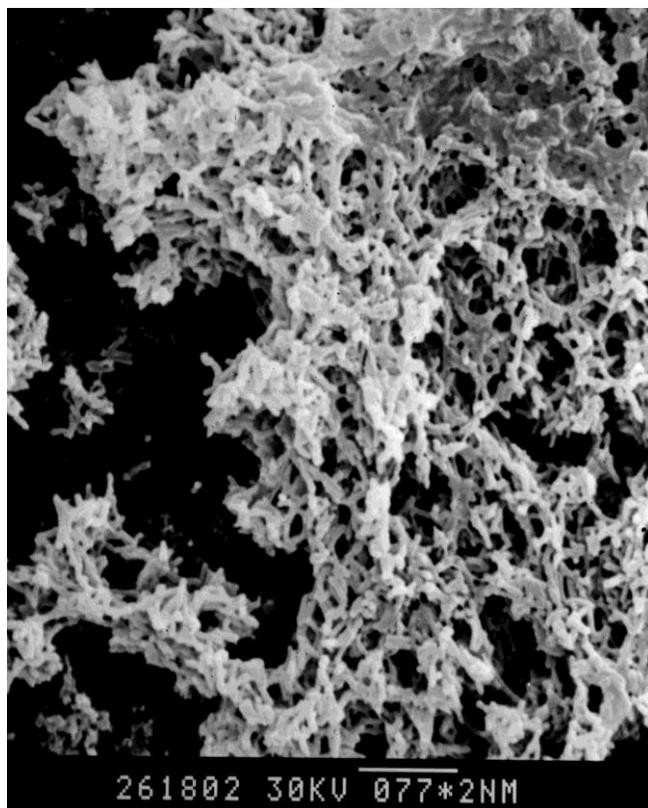


А

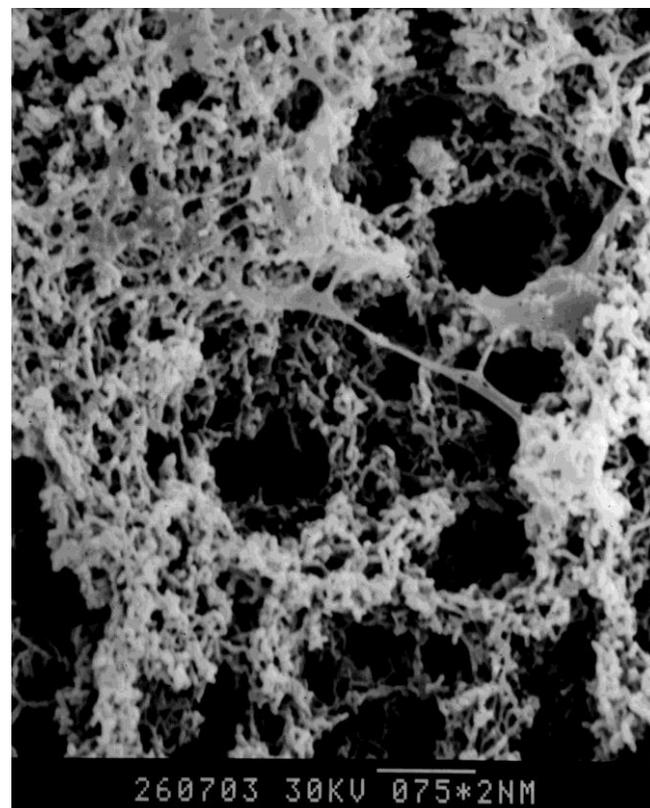


Б

Рисунок 4.3 Электронно-микроскопическое исследование 120- (А) и 720-и часовой (Б) биоплёночных культур штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665 при увеличении $\times 2000$.



А



Б

Рисунок 4.4 Электронно-микроскопическое исследование 120- (А) и 720-и часовой (Б) биоплёночных культур штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* (циркулирующий) при увеличении $\times 2000$.

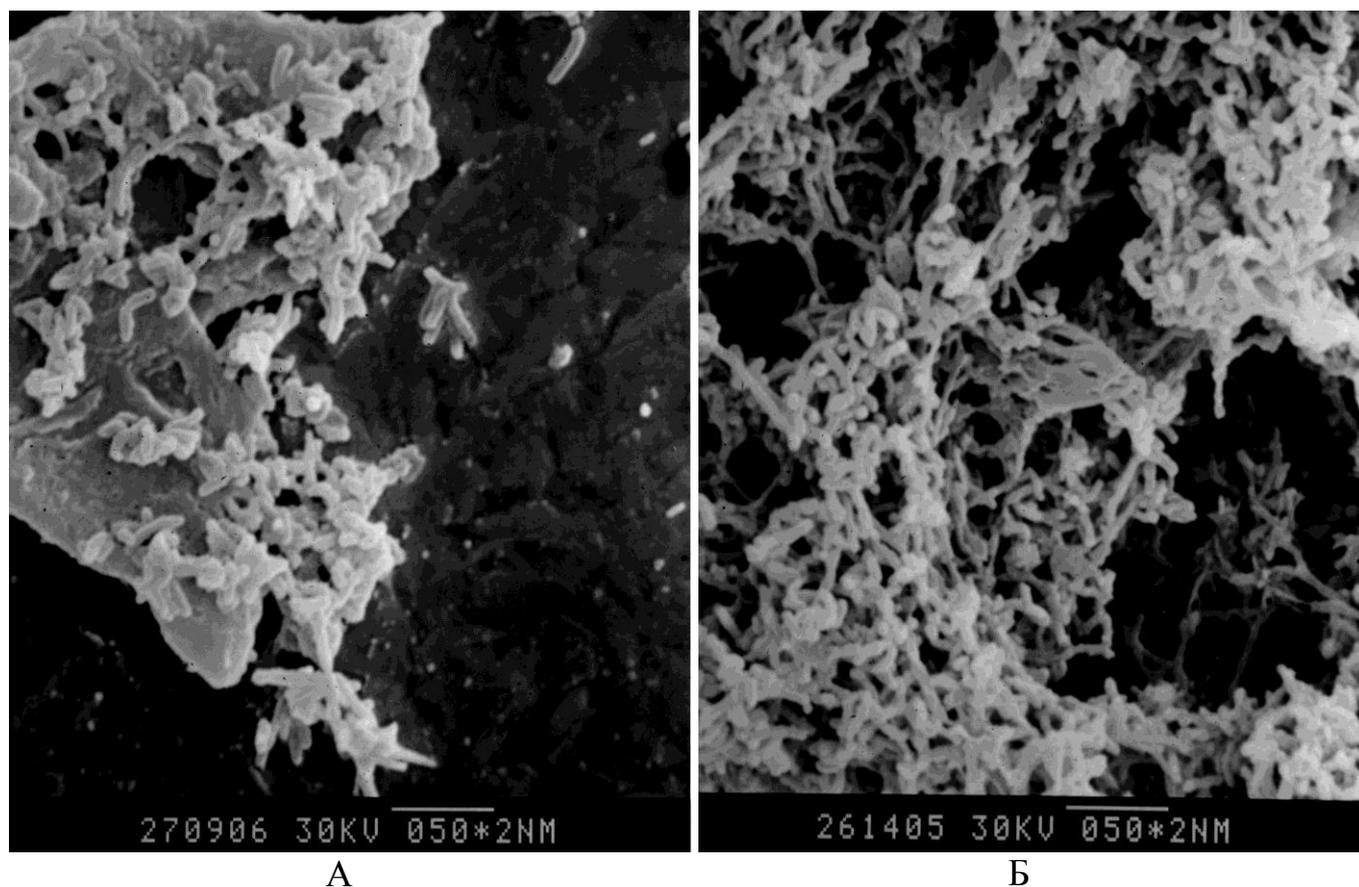


Рисунок. 4.5 Электронно-микроскопическое исследование 120- (А) и 720-и часовой (Б) биоплёночных культур штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665 при увеличении $\times 3000$.

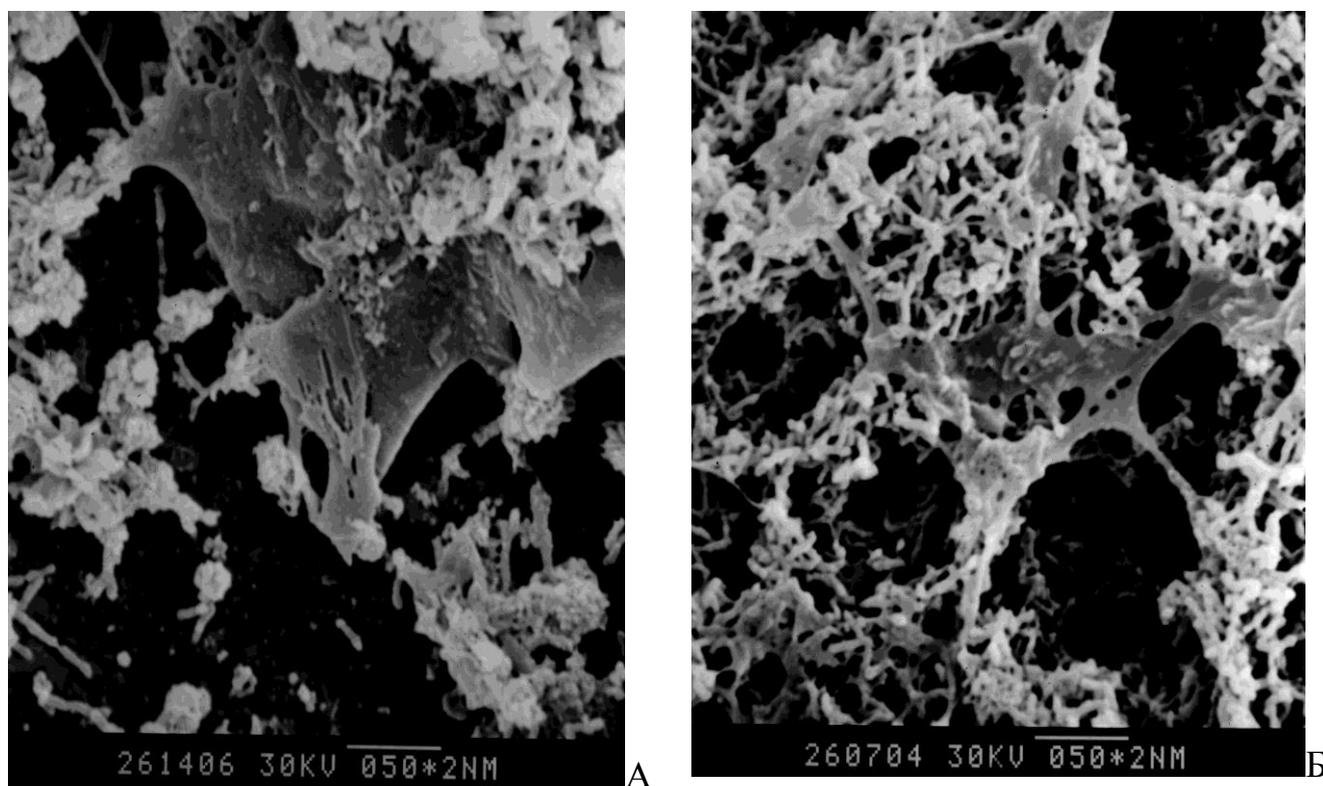
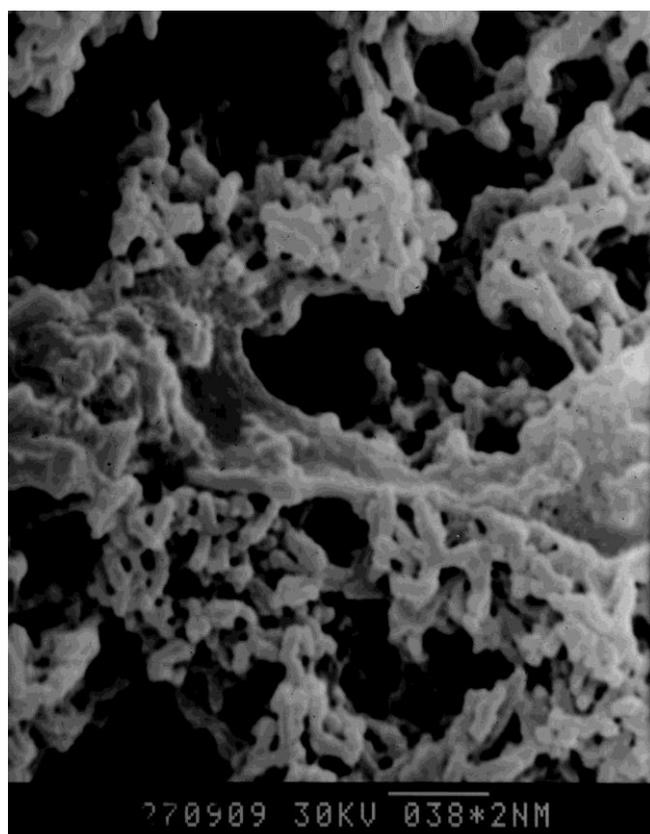
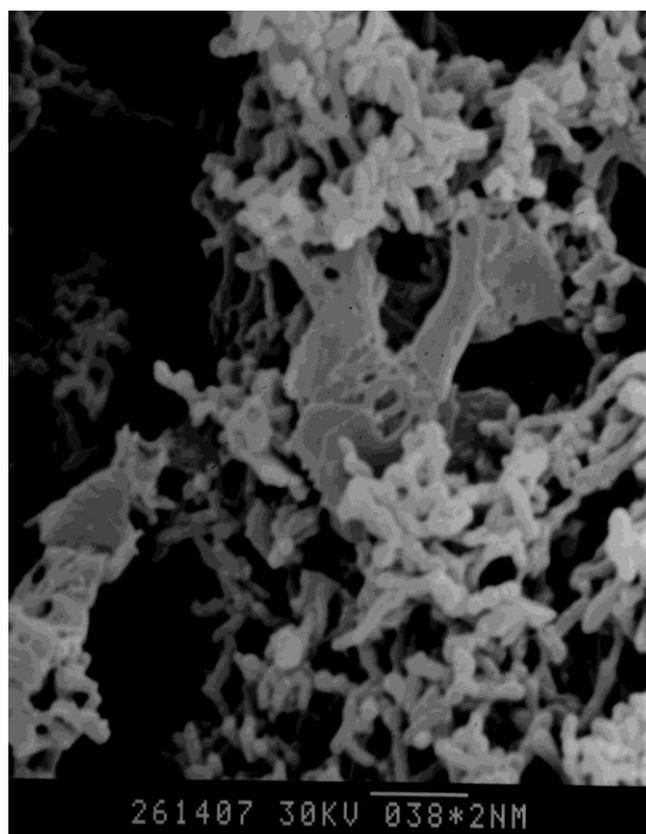


Рисунок 4.6 Электронно-микроскопическое исследование 120- (А) и 720-и часовой (Б) биоплёночных культур штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* (циркулирующий) при увеличении $\times 3000$.

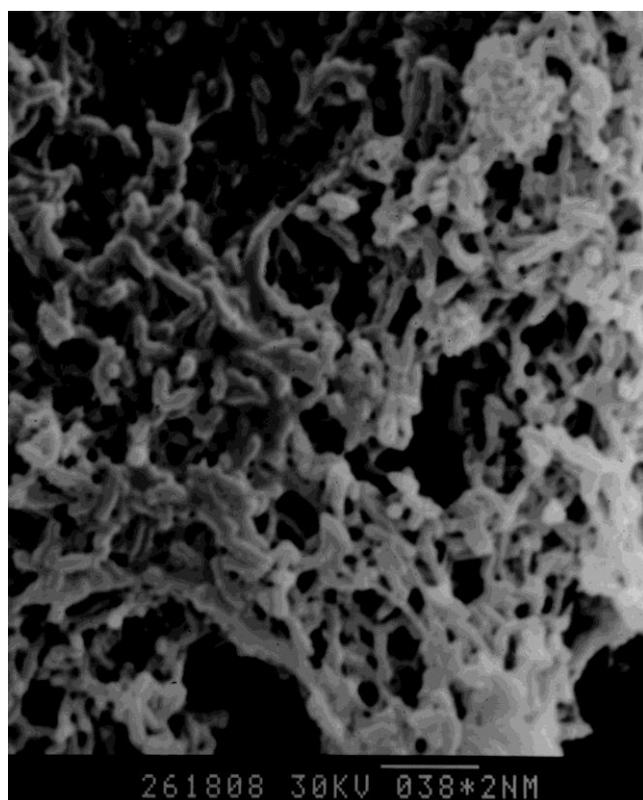


А

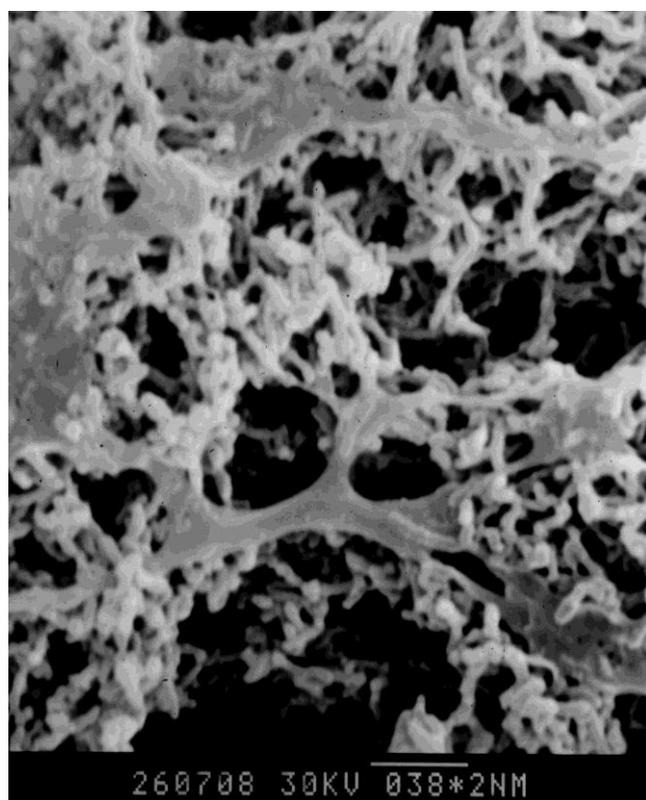


Б

Рисунок 4.7 Электронно-микроскопическое исследование 120- (А) и 720- и часовой (Б) биоплёночных культур штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665 при увеличении $\times 4000$.



А



Б

Рисунок 4.8 Электронно-микроскопическое исследование 120- (А) и 720-и часовой (Б) биоплёночных культур штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* (циркулирующий) при увеличении $\times 4000$.

На пике образования матрикса (120-й часовой) длина бактериальных клеток музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺ № 665* составляла $1,4 \pm 0,08$ мкм. При более длительных сроках культивирования данного штамма (720-й час) содержание матрикса было меньше, а длина клеток - достоверно ($p \leq 0,05$) больше и составила $1,7 \pm 0,1$ мкм. При исследовании размеров клеток циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* обнаружена аналогичная закономерность ($p \leq 0,05$): при максимальном количестве матрикса, которое у данного штамма приходилось на 720-й час культивирования, длина клеток была меньше ($1,3 \pm 0,05$ мкм), чем на более раннем этапе (120-й час) биоплёнокообразования ($1,6 \pm 0,05$ мкм).

4.2. Культуральные и ферментативные свойства

При исследовании культуральных свойств биоплёночных (120- и 720-часовых) культур штаммов *C. diphtheriae gravis tox⁺* наблюдали незначительные их изменения относительно типовых культур (таблица 4.3). Размер колоний типовой культуры музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺ № 665*, выросших на кровяно-теллуритовом агаре, составил 2-3 мм, тогда как у биоплёночных культур этого же штамма колонии несколько меньше и диаметр их находился в пределах 1-2 мм.

У типовой и биоплёночных культур циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* размеры колоний не изменялись, их диаметр составлял 2-4 мм. Форма, цвет, оптическая плотность колоний биоплёночных культур двух исследованных штаммов никак не отличались от таковых у типовых культур.

Типовые культуры двух исследованных штаммов имели выпуклую, шероховатую, матовую поверхность, а биоплёночные — выпуклую, глянцевую, блестящую. При этом характер края колоний типовых культур был бахромчатым, а биоплёночных культур — волнистым; консистенция колоний типовых культур —

сухая, крошащаяся, а биоплёночных — маслянистая.

При изучении ферментативных свойств типовой и биоплёночных (120- и 720-часовых) культур музейного и циркулирующего штаммов *C. diphtheriae*, различий не обнаружено. Показатели ДНК-азной активности штаммов *C. diphtheriae* при культивировании с 48-го часа по 720-й час составляли $1,7 \pm 0,2$ как для типовой, так и для биоплёночных культур двух исследованных штаммов (таблица 4.3).

4.3. Токсигенные свойства

Определение способности типовых и биоплёночных культур музейного и циркулирующего штаммов *C. diphtheriae* продуцировать ДТ проводили в иммунопреципитационном тесте Элека; гена токсигенности — с помощью ПЦР.

Все исследованные как типовые, так и биоплёночные (120- и 720-часовые) культуры музейного и циркулирующего токсигенных штаммов *C. diphtheriae gravis tox⁺* были положительными в иммунопреципитационном тесте Элека, что указывало на их способность продуцировать ДТ. Присутствие *tox⁺*-гена обнаружено в ПЦР также во всех исследованных (как типовых, так и биоплёночных) культурах *C. diphtheriae* (таблица 4.4).

Таблица 4.4 - Токсигенность типовых и биоплёночных культур штаммов *C. diphtheriae gravis tox⁺*

Штамм	Культура	Результаты теста Элека	Результаты ПЦР
<i>C. diphtheriae gravis tox⁺</i> № 665 (музейный)	типовая	+	+
	биоплёночная 120-часовая	+	+
	биоплёночная 720-часовая	+	+
<i>C. diphtheriae gravis tox⁺</i> (циркулирующий)	типовая	+	+
	биоплёночная 120-часовая	+	+
	биоплёночная 720-часовая	+	+

Таблица 4.3 - Культуральные свойства типовой и биоплёночных культур штаммов *C. diphtheriae gravis tox*⁺

Свойства колоний	<i>C. diphtheriae gravis tox</i> ⁺ № 665		<i>C. diphtheriae gravis tox</i> ⁺ (циркулирующий)		
	Типовая культура	Биоплёночные (120- и 720-часовые) культуры	Типовая культура	Биоплёночные (120- и 720-часовые) культуры	
Размер колоний	3-4 мм, крупные	1-2 мм, мелкие	2-4 мм, средний	2-4 мм, средний	
Форма колоний	округлая	округлая	округлая	округлая	
Цвет колоний	молочный (КА), чёрный (КТА)	молочный (КА), чёрный с оттенком серого по центру (КТА)	молочный (КА), чёрный (КТА)	молочный (КА), чёрный с оттенком серого по центру (КТА)	
Характер поверхности	выпуклая шероховатая, матовая	выпуклая, глянцевая, блестящая	выпуклая шероховатая, матовая	выпуклая, глянцевая, блестящая	
Характер края	бахромчатый в виде «маргаритки»	волнистый	бахромчатый в виде «маргаритки»	волнистый	
Оптическая плотность	непрозрачные	непрозрачные	непрозрачные	непрозрачные	
Консистенция	сухая, крошащаяся	маслянистая	сухая, крошащаяся	маслянистая	
Биохимические свойства	глюкоза	+	+	+	
	мальтоза	+	+	+	
	сахарозы	-	-	-	-
	крахмала	+	+	+	+
	редуция нитратов	+	+	+	+
	уреаза	-	-	-	-
	цистиназа	+	+	+	+
Показатели ДНК-азной активности (M±m)	1,7±0,2	1,7±0,2	1,7±0,2	1,7±0,2	

4.4. Антибиотикочувствительность

Циркуляция токсигенных штаммов *C. diphtheriae* в постэпидемический период в человеческой популяции сохраняется благодаря бактерионосительству, в отношении которого антибактериальные препараты (цефтриаксон, цефотаксим, анаэроцеф, линкомицин и др.) оказываются недостаточно эффективными [23, 100]. Это может быть связано со способностью *C. diphtheriae* формировать биоплёнки, которые являются одной из стратегий выживания бактерий в организме инфицированных хозяев. Биоплёночные микроорганизмы способны выживать при воздействии антибактериальных препаратов в таких высоких концентрациях, которые не могут быть достигнуты в организме человека при стандартных терапевтических дозах [65], а также проявлять устойчивость одновременно ко многим антибиотикам из разных групп [176]. В клинических условиях столь высокая выживаемость биоплёночных микроорганизмов ведёт к хронизации инфекционного процесса [65].

Чувствительность к антибиотикам, рекомендованным для лечения дифтерии (ванкомицин, цефотаксим, анаэроцеф, гентамицин, цефтриаксон, линкомицин, канамицин, цефазолин и бензилпенициллин) [23], определяли в соответствии с [49] и Патентом РФ на изобретение № 2491348 от 27.08.2013 г. «Способ определения минимальной подавляющей концентрации антибактериального препарата», у типовых и биоплёночных (120- и 720-часовых) культур музейного и циркулирующего токсигенных штаммов *C. diphtheriae gravis* (таблица 4.5).

Типовая культура музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665 обладала чувствительностью ко всем указанным антибактериальным препаратам, при этом значения МПК колебались в пределах от $0,1 \pm 0,2$ до $2,6 \pm 0,9$ мг/л.

В то же время по отношению к типовой культуре циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* МПК большинства перечисленных антибактериальных препаратов была выше и варьировала в пределах от $0,4 \pm 0,05$ до $7,8 \pm 1,0$ мг/л.

В соответствии с этим, чувствительность типовой культуры циркулирующего штамма коринебактерий достоверно ($p \leq 0,05$) ниже аналогичной музейного по отношению к цефотаксиму, линкомицину, канамицину, цефазолину, МПК которых составила $7,8 \pm 1,0$, $6,1 \pm 0,9$, $1,0 \pm 0,2$, $1,0 \pm 0,2$ мг/л соответственно.

При сравнении типовой и биоплёночных культур музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665 установлено, что на 120-й час культивирования биоплёночная культура сохраняла одинаковую с типовой степень чувствительности к ванкомицину, цефотаксиму, гентамицину, линкомицину, канамицину и бензилпенициллину, МПК которых находилась в пределах от $0,5 \pm 0,1$ до $2,0 \pm 1,6$ мг/л. Чувствительность 120-часовой биоплёночной культуры по результатам определения МПК была ниже ($p \leq 0,05$) таковой у типовой культуры по отношению к анаэроцефу ($4,1 \pm 0,4$ мг/л), цефтриаксону ($5,7 \pm 1,5$ мг/л), цефазолину ($0,5 \pm 0,05$ мг/л).

У 720-часовой биоплёночной культуры музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665 сохранилась пониженная чувствительность к тем же антибиотикам, что и у 120-часовой (анаэроцеф, цефтриаксон, цефазолин), но спектр препаратов, к которым наблюдали снижение антибиотикочувствительности, расширился до шести. Увеличились ($p \leq 0,05$) значения МПК ванкомицина ($7,0 \pm 1,3$ мкг/мл), цефотаксима ($6,7 \pm 1,0$ мкг/мл), канамицина ($1,6 \pm 0,4$ мкг/мл) по сравнению с типовой культурой этого же штамма.

Сравнительное исследование антибиотикочувствительности типовой и биоплёночных культур циркулирующего токсигенного штамма *C. diphtheriae gravis* показало, что 120-часовая биоплёночная культура была чувствительна в той же степени, что и типовая к ванкомицину, гентамицину, цефтриаксону, канамицину и цефазолину, МПК которых находилась в пределах от $1,2 \pm 0,4$ до $5,8 \pm 0,8$ мг/л. Значения МПК цефотаксима и линкомицина оставались высокими, как у типовой, так и у биопленочных культур этого штамма (от $6,1 \pm 0,9$ до $7,8 \pm 1,0$ мг/л). Чувствительность 120-часовой биоплёночной культуры ниже ($p \leq 0,05$), чем типовой по отношению к анаэроцефу (МПК $1,0 \pm 0,2$ мг/л) и бензилпенициллину (МПК $4,3 \pm 2,1$ мг/л). У 720-часовой биоплёночной культуры чувствительность пони-

лась по отношению к цефтриаксону (МПК $9,0 \pm 1,2$ мг/л) и бензилпенициллину (МПК $4,1 \pm 1,0$ мг/л). При сравнении музейного и циркулирующего штаммов *C. diphtheriae gravis tox⁺* обнаружено, что чувствительность типовой культуры циркулирующего штамма по отношению к цефотаксиму, линкомицину, канамицину, цефазолину, ниже ($p \leq 0,05$), чем у типовой культуры музейного штамма. Подобная тенденция отмечена и у биоплёночных культур. Чувствительность к антибиотикам биоплёночных культур циркулирующего штамма ниже как у 120-часовой (к цефотаксиму и линкомицину), так и у 720-часовой культуры (цефтриаксону, линкомицину, бензилпенициллину) по сравнению с аналогичной музейной культурой. В отношении анаэроцефа и ванкомицина наблюдали обратную закономерность. Так, у 120- и 720-часовой биоплёночных культур циркулирующего штамма *C. diphtheriae* чувствительность к анаэроцефу (МПК $1,0 \pm 0,2$ и $0,3 \pm 0,04$ мг/л соответственно) достоверно выше ($p \leq 0,05$), чем у аналогичных культур музейного штамма (МПК $4,1,0 \pm 0,4$ и $4,5 \pm 0,6$ мг/л соответственно). К ванкомицину чувствительность 720-часовой биоплёночной культуры циркулирующего штамма *C. diphtheriae* (МПК $1,7 \pm 0,6$ мг/л) также была выше ($p \leq 0,05$), чем аналогичной культуры музейного штамма (МПК $7,0 \pm 1,3$ мг/л).

Таким образом, результаты наших исследований подтверждают имеющиеся данные о снижении чувствительности к антибиотикам биоплёночных культур микроорганизмов в разной степени. По данным определения антибиотикочувствительности (МПК) установлено, что наиболее эффективными в отношении как типовых, так и биопленочных культур двух исследуемых штаммов *C. diphtheriae gravis tox⁺* являются такие антибактериальные препараты, как гентамицин, а также канамицин и ванкомицин.

Таблица 4.5 - Антибиотикочувствительность типовых и биоплёночных культур штаммов *C. diphtheriae gravis tox*⁺ (МПК мг/л)

Антибиотик	<i>C. diphtheriae gravis tox</i> ⁺ № 665			<i>C. diphtheriae gravis tox</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*⁺

4.5. Заключение

Типовые и биоплёночные культуры как музейного, так и циркулирующего штаммов *C. diphtheriae* не отличались по своим морфологическим свойствам при исследовании с помощью световой микроскопии. При использовании электронной сканирующей микроскопии обнаружено, что биоплёнки, образованные *C. diphtheriae*, представляли собой погруженные в матрикс конгломераты клеток, которые варьировали по плотности, создавая открытые области. Матрикс имел вид множества слизистых, соединяющихся между собой «тяжей паутины», которые покрывали клетки бактерий общим слоем. При этом количество синтезированных углеводов не изменялось, тогда как, содержание белка увеличивалось в 5 - 7 раз по сравнению с типовыми культурами двух исследованных штаммов. В процессе формирования биоплёнки штаммами *C. diphtheriae tox⁺* наблюдали уменьшение размеров клеток коринебактерий. Колонии биоплёночных культур музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665, выросших на кровяно-теллуритовом агаре, имели меньший диаметр (1 - 2 мм), чем типовая культура этого же штамма (3 - 4 мм). Для типовой и биоплёночных культур циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* размеры колоний были одинаковы (2 - 4 мм). Колонии биоплёночных культур двух исследованных штаммов *C. diphtheriae gravis tox⁺* отличались от типовых по цвету (чёрные с оттенком серого по центру), консистенции (маслянистая), характеру поверхности (глянцевая, блестящая) и края (волнистый). Это свидетельствует о том, что наметился переход от R- к S-форме колоний, характерных для *C. diphtheriae mitis*, при сохранении способности расщеплять крахмал. При исследовании ферментативных и токсигенных свойств отличий между типовыми и биопленочными культурами двух исследованных штаммов не выявлено.

Препаратами выбора по результатам определения антибиотикочувствительности *in vitro* в отношении токсигенных штаммов *C. diphtheriae* в настоящее вре-

мя могут явиться гентамицин, а также канамицин и ванкомицин, к которым чувствительность как типовых, так и биопленочных культур двух исследованных штаммов сохраняется.

Глава 5. Действие *Corynebacterium diphtheriae gravis tox⁺* в составе биоплёнки на клетки иммунной системы мышей

Микроорганизмы в составе биоплёнки приобретают свойства, отличающие их от планктонных культур: они обладают повышенной устойчивостью к воздействию антибиотиков, успешно противостоят фагоцитам, антителам, другим потенциально опасным для них факторам окружающей среды [55]. Благодаря существованию в виде микробных сообществ – биоплёнок – бактерии, заключённые в матрикс синтезируемых ими полимерных веществ, приобретают способность к длительной персистенции в организме человека [55, 70, 81, 84, 115]. При такой форме дифтерийной инфекции, как бактерионосительство, возбудитель может находиться в организме в течение нескольких недель или месяцев, проявляя устойчивость к антибактериальной терапии и факторам иммунной системы [21]. Длительная персистенция *C. diphtheriae* в организме человека может быть обусловлена различными причинами, в том числе, и свойствами самого возбудителя, который, помимо прямого токсического воздействия на организм, способен вызывать апоптоз макрофагов [21, 62, 91]. В этот процесс, помимо токсина, вовлечены и другие факторы патогенности *C. diphtheriae* (корд-фактор, поверхностные структуры), так как независимо от наличия гена токсигенности коринебактерии способны индуцировать апоптоз макрофагов [62, 145].

5.1. Влияние биоплёночных культур музейного и циркулирующего штаммов *Corynebacterium diphtheriae* на функциональную активность и апоптоз макрофагов мышей

При сравнении показателей фагоцитоза макрофагов мышей, индуцированного типовой и биоплёночными культурами исследованных штаммов

C. diphtheriae (таблица 5.1), выявлены отличия при определении поглотительной активности макрофагов.

Таблица 5.1 - Показатели фагоцитоза макрофагов мышей, индуцированного типовыми и биоплёночными культурами штаммов *Corynebacterium diphtheriae gravis tox⁺*

Штамм	Культура	ФИ	ФЧ	ИЗФ
<i>C. diphtheriae gravis tox⁺</i> №665 (музейный)	типовая	20,0±4,0	0,42±0,2	1,7±0,08
	биоплёночная 120-часовая	16,0±5,2	0,48±0,3	1,8±0,1
	биоплёночная 720-часовая	3,5±0,8*	0,59±0,4	1,1±0,01*
<i>C. diphtheriae gravis tox⁺</i> (циркулирующий)	типовая	16,0±5,2	0,53±0,3	2,0±0,09
	биоплёночная 120-часовая	17,0±5,1	0,65±0,04	1,6±0,02*
	биоплёночная 720-часовая	5,4±0,9*	0,61±0,04	1,8±0,1

Условные обозначения:

* - достоверность различий $t \geq 2$ ($P \geq 95\%$) между аналогичными показателями фагоцитоза, индуцированного типовой и биоплёночными культурами каждого штамма;

ФИ – фагоцитарный индекс;

ФЧ – фагоцитарное число;

ИЗФ – индекс завершённости фагоцитоза.

ФИ при исследовании 720-часовых биоплёночных культур как музейного так и циркулирующего штаммов *C. diphtheriae gravis tox⁺* достоверно ($t \geq 2$, $P \geq 95\%$) ниже, чем у типовых культур этих же штаммов. Никаких отличий при сравнении типовых и 120-часовых биоплёночных культур исследованных штаммов не обнаружено. Поглотительная активность макрофагов, определяемая по показателям ФЧ, никак не отличалась при изучении типовых и биоплёночных культур каждого штамма. Переваривающая активность макрофагов (ИЗФ) в отношении 120-часовой биоплёночной культуры циркулирующего штамма *C. diphtheriae* (1,6±0,02%) ниже ($t \geq 2$, $P \geq 95\%$), чем типовой культуры (2,0±0,09%) этого же штамма. Показатели ИЗФ типовой и 720-часовой биоплёночной культур данного штамма отличий не имели. При исследовании музейного штамма показатель ИЗФ

120-часовой биопленочной культуры ($1,8 \pm 0,1\%$) не отличался от такового типовой культуры этого же штамма ($1,7 \pm 0,08\%$). Переваривающая активность макрофагов в отношении 720-часовой биопленочной культуры ($1,1 \pm 0,01\%$) достоверно ($t \geq 2$, $P \geq 95\%$) ниже типовой.

При сравнении музейного и циркулирующего штаммов *C. diphtheriae* между показателями фагоцитарной (поглотительной, переваривающей) активности макрофагов в отношении как типовых, так и биопленочных культур никаких отличий не выявлено.

Способность индуцировать апоптоз перитонеальных макрофагов мышей (таблица 5.2) выражена как у типовых, так и биопленочных культур двух исследованных штаммов *C. diphtheriae*. Количество клеток с признаками апоптоза находилось в пределах от $55,1 \pm 5,3$ до $78,0 \pm 1,7\%$.

Таблица 5.2 - Апоптогенная активность типовых и биопленочных культур штаммов *Corynebacterium diphtheriae gravis tox⁺*

Штамм	Культура	Процент макрофагов с признаками апоптоза ($\% \pm m$)
<i>C. diphtheriae gravis tox⁺</i> № 665 (музейный)	типовая	$55,1 \pm 5,3$
	биопленочная 120-часовая	$55,8 \pm 5,9$
	биопленочная 720-часовая	$54,4 \pm 2,7$
<i>C. diphtheriae gravis tox⁺</i> (циркулирующий)	типовая	$65,4 \pm 6,1$
	биопленочная 120-часовая	$68,3 \pm 6,8$
	биопленочная 720-часовая	$78,0 \pm 0,9^*$

Условные обозначения:

* - достоверность различий $t \geq 2$ ($P \geq 95\%$) между апоптогенной активностью типовой и биопленочных культур каждого штамма *C. diphtheriae*;

ФИ – фагоцитарный индекс;

ФЧ – фагоцитарное число;

ИЗФ – индекс завершенности фагоцитоза.

Сравнительный анализ способности индуцировать процессы апоптоза типо-

выми и 120-часовыми биоплёночными культурами музейного и циркулирующего штаммов *C. diphtheriae* достоверных ($t \geq 2$, $P \geq 95\%$) отличий не выявил. В тоже время, апоптогенная активность 720-часовой биоплёночной культуры циркулирующего штамма *C. diphtheriae* отличалась от таковой у типовой культуры: процент клеток с апоптозом, индуцированным биопленочной культурой ($78,0 \pm 0,9\%$) был выше ($t \geq 2$, $P \geq 95\%$), чем типовой ($65,4 \pm 6,1\%$).

При исследовании апоптогенной активности 720-часовой биопленочной культуры музейного штамма культура музейного штамма *C. diphtheriae* № 665 никаких отличий по сравнению с типовой культурой этого же штамма обнаружено не было.

5.2. Регуляторное влияние нейтрофилокинов на процессы фагоцитоза и апоптоза макрофагов мышей, индуцированные типовыми и биоплёночными культурами штаммов *Corynebacterium diphtheriae*

При исследовании регуляторного воздействия нейтрофилокинов (таблица 5.3) на поглотительную активность макрофагов установлено повышение ФИ ($t \geq 2$, $P \geq 95\%$) только при использовании 720-часовой биоплёночной культуры циркулирующего штамма *C. diphtheriae*. При этом никаких изменений ФЧ не выявлено.

Переваривающая активность макрофагов, оцениваемая по ИЗФ, в отношении как типовой, так и 120-часовой биоплёночной культуры циркулирующего штамма *C. diphtheriae* под действием нейтрофилокинов достоверно ($t \geq 2$, $P \geq 95\%$), повышалась. Переваривающая активность макрофагов при изучении 120- и 720-часовых биоплёночных культур циркулирующего штамма *C. diphtheriae* ($2,0 \pm 0,05\%$) оставалось ниже ($t \geq 2$, $P \geq 95\%$), чем типовой ($2,9 \pm 0,3\%$).

При исследовании музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665, добавление нейтрофилокинов способствовало повышению ИЗФ только в отношении его 720-часовой биоплёночной культуры.

Иные результаты получены при исследовании воздействия нейтрофилокинов на апоптогенную активность коринебактерий. При добавлении в среду нейтрофилокинов устойчивость перитонеальных макрофагов к апоптогенному воздействию как типовой, так и биоплёночных культур двух исследованных штаммов *C. diphtheriae* повышалась (таблица 5.4). Об этом свидетельствовало значительно меньшее ($t \geq 2$, $P \geq 95\%$) количество клеток с признаками апоптоза в присутствии нейтрофилокинов (от $3,5 \pm 0,3$ до $37,6 \pm 1,4\%$) по сравнению с таковым без нейтрофилокинов (от $55,1 \pm 5,3$ до $78,0 \pm 1,7\%$).

Обращает на себя внимание тот факт, что апоптогенная активность 720-часовой биоплёночной культуры циркулирующего штамма *C. diphtheriae* при добавлении нейтрофилокинов значительно ($t \geq 2$, $P \geq 95\%$) выше ($37,6 \pm 1,4\%$), чем всех других исследованных культур как этого же штамма, так и музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665.

Таблица 5.4 - Влияние нейтрофилокинов на апоптогенную активность типовых и биоплёночных культур штаммов *Corynebacterium diphtheriae gravis tox⁺*

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

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⁺*

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

НфК – нейтрофилокины.

Таблица 5.3 - Влияние нейтрофилокинов на показатели фагоцитоза макрофагов мышей, индуцированного типовыми и биоплёночными культурами штаммов *Corynebacterium diphtheriae gravis tox*⁺

Штамм	Культура	Без добавления НфК			С добавлением НфК		
		ФИ	ФЧ	ИЗФ	ФИ	ФЧ	ИЗФ
<i>C. diphtheriae gravis tox</i> ⁺ №665 (музейный)	типовая	20,0±4,0	0,42±0,2	1,7±0,08	14,0±5,4	0,63±0,04	2,1±0,3
	биоплёночная 120-часовая	16,0±5,2	0,48±0,3	1,8±0,1	15,0±5,3	0,59±0,3	2,0±0,3
	биоплёночная 720-часовая	3,5±0,8*	0,59±0,4	1,1±0,01*	3,7±2,4	0,54±0,3	4,4±1,2**
<i>C. diphtheriae gravis tox</i> ⁺ (циркулирующий)	типовая	16,0±5,2	0,53±0,3	2,0±0,09	15,0±5,3	0,62±0,04	2,9±0,3**
	биоплёночная 120-часовая	17,0±5,1	0,65±0,04	1,6±0,02*	22,0±3,5	0,79±0,08	2,0±0,05**
	биоплёночная 720-часовая	5,4±0,9*	0,61±0,04	1,8±0,1	21,0±3,7**	0,74±0,9	2,0±0,05*

Условные обозначения:

* — достоверность различий ($t \geq 2$, $P \geq 95\%$) между аналогичными показателями фагоцитоза, индуцированного типовой и биоплёночными культурами каждого штамма *C. diphtheriae gravis tox*⁺;

**—достоверность различий ($t \geq 2$ ($P \geq 95\%$)) между аналогичными показателями фагоцитоза при добавлении НфК и без НфК

ФИ – фагоцитарный индекс;

ФЧ – фагоцитарное число;

ИЗФ – индекс завершённости фагоцитоза;

НфК – нейтрофилокины.

5.3. Заключение

Возбудитель дифтерии, в том числе, и в составе биоплёнки оказывает ингибирующее воздействие на функциональную активность макрофагов и индуцирует 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*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на проводимую вакцинацию, эпидемии дифтерии периодически повторяются и проблема этой инфекции остается актуальной [34, 63]. Решение проблемы снижения заболеваемости дифтерией не может быть ограничено лишь проведением профилактических прививок населения в связи с тем, что формирование бактерионосительства при дифтерии наблюдается у привитых лиц с высоким уровнем противодифтерийных антитоксических антител [42]. При этом направленные на борьбу с возбудителем дифтерии антибактериальные препараты не всегда эффективны при проведении санации бактерионосителей [57, 63].

Для эффективной борьбы с бактерионосительством необходимо, помимо исследования показателей иммунитета организма человека, учитывать и особенности биологических свойств возбудителя, в частности, его способность к биоплёнкообразованию. Формирование биопленки необходимо паразиту для создания его резервуара в природе. Возможно, образование биопленки *C. diphtheriae gravis tox⁺* объясняет его персистенцию в организме и обеспечивает формирование бактерионосительства, несмотря на наличие системного и местного (мукозального) иммунитета [31].

Микроорганизмы в составе биоплёнок изменяют свои биологические свойства, что в значительной степени защищает их от действия клеточных и гуморальных факторов врождённого и адаптивного иммунитета. Исследование способности возбудителя дифтерии формировать биоплёнки приобретает в настоящее время особую актуальность в связи с продолжающейся циркуляцией штаммов токсигенных *C. diphtheriae* в межэпидемический период [41, 100].

При проведении настоящих исследований нами были использованы штаммы *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665, полученный из ГИСК им. Л. А. Тарасевича, и *C. diphtheriae gravis tox⁺*, выделенный от больного с диагнозом

«локализованная форма дифтерии» бактериологической лабораторией ФГУ «1002 ЦГСЭН СКВО» г. Ростова-на-Дону.

Для получения экспериментальной модели биопленки возбудителя дифтерии *in vitro* использовали разные условия культивирования. В ходе сравнительного анализа интенсивности биопленкообразования штаммами *C. diphtheriae gravis tox+* при культивировании их в пластиковых и стеклянных пробирках были выявлены различия. Наиболее интенсивно процесс формирования биопленки у двух исследованных штаммов происходил на стекле (гидрофильной поверхности), чем на пластике (гидрофобной). Так, при культивировании в стеклянных пробирках интенсивность образования массы биоплёнки музейным штаммом *C. diphtheriae gravis tox+* № 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. Как известно, 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+* при культивировании как в стеклянных, так и в пластиковых пробирках выявлена иная закономерность. В начале культивирования (до 168-го часа) наблюдали положительную тенденцию роста ОП планктонной культуры, а затем - резкое ее снижение до 720 часа. Уменьшение оптической плотности планктонных клеток на

поздних сроках культивирования свидетельствовало об отмирании большей части популяции бактерий.

Анализ динамики жизнеспособных свойств биопленочных 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 ($0,12 \times 10^6$ КОЕ/мл – $2,0 \times 10^6$ КОЕ/мл). Однако, к 192 часу роста происходило резкое его увеличение ($5,5 \times 10^6$ КОЕ/мл – $19,0 \times 10^6$ КОЕ/мл), особенно у штаммов, выросших в стеклянных пробирках. Для планктонных культур была 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+* 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, было ниже, но при высеве 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 биопленочных 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 биопленку.

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+* соответственно, при длительном их культивировании *in*

vitro. В процессе формирования биопленки штаммами *C. diphtheriae tox⁺* 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 биопленку.

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⁺* в процессе биоплёнкообразования обладали разобщённым 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. Так, на пике образования матрикса (120-й час) длина клеток бактерий музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺ № 665* составляла $1,4 \pm 0,08$ мкм. При более длительных сроках культивирования данного штамма (720-й час) содержание матрикса, 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⁺* 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 биопленкообразования ($1,6 \pm 0,05$ мкм).

При сравнительном исследовании культуральных свойств типовой и биоплёночных культур исследованных штаммов возбудителя дифтерии обнаружено, что диаметр колоний биопленочных культур музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺ № 665*, выросших на кровяно-теллуритовом агаре, был меньше (1-2 мм), чем типовой культуры этого же штамма (3-4 мм). При этом размеры колоний типовой и биоплёночных культур циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* были одинаковы (2-4 мм).

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

Изменение морфологических и культуральных свойств биопленочных культур исследованных штаммов *C. diphtheriae gravis tox⁺* могло быть связано с тем, что клетки в составе биоплёнки растут значительно медленнее, чем планктонные [71, 75]. В результате этого происходит замедление метаболических процессов, приводящее к диссоциации R-формы колоний в S-форму. В дальнейшем идет запуск механизмов адаптации возбудителя дифтерии к условиям окружающей среды, а, именно, устойчивости к антибиотикам [71]. При этом создаются условия для длительной персистенции возбудителя дифтерии в организме бактерионосителей, что осложняет проводимую антибиотикотерапию.

Процесс биопленкообразования не оказывал влияния на способность *C. diphtheriae gravis tox⁺* продуцировать дифтерийный экзотоксин. Все исследованные как типовые, так и биоплёночные (120- и 720-часовые) культуры музейного и циркулирующего штаммов *C. diphtheriae gravis tox⁺* положительны в иммунопреципитационном тесте Элека, что указывало на их способность вырабатывать токсин. Присутствие *tox⁺*-гена было обнаружено в ПЦР во всех

исследованных (как типовых, так и биоплёночных) культурах возбудителя дифтерии.

Сравнительное исследование антибиотикочувствительности штаммов *C. diphtheriae* к препаратам, рекомендованным для лечения дифтерии (ванкомицину, цефотаксиму, анаэроцефу (цефокситину), гентамицину, цефтриаксону, линкомицину, канамицину, цефазолину и бензилпенициллину) показало, что типовая культура циркулирующего штамма *C. diphtheriae* обладала 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⁺ № 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⁺ № 665* чувствительность его 120-часовой биопленочной культуры к трем антибактериальным препаратам (анаэроцефу, цефтриаксону и цефазолину), а 720-часовой к шести (ванкомицину, цефотаксиму, анаэроцефу, цефтриаксону, цефазолину и канамицину) была ниже ($p \leq 0,05$), чем типовой культуры. Чувствительность биопленочных культур циркулирующего штамма *C. diphtheriae* также была ниже по сравнению с типовой в отношении анаэроцефа и бензилпенициллина (у 120-часовой), и цефтриаксона и бензилпенициллина (у 720-часовой).

При этом чувствительность типовой культуры циркулирующего штамма возбудителя дифтерии по отношению к цефотаксиму, линкомицину, канамицину и цефазолину была ниже ($p \leq 0,05$), чем аналогичной культуры музейного штамма. Подобная тенденция отмечалась и у биопленочных культур *C. diphtheriae*: чувствительность к цефотаксиму и линкомицину (у 120-часовой) и цефтриаксону, линкомицину, бензилпенициллину (у 720-часовой культуры) была ниже ($p \leq 0,05$) по сравнению с аналогичными культурами музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺ № 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⁺*. 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. Используемые нами антибактериальные препараты обладают способностью полностью или частично нарушать как синтез пептидогликана (цефазолин, цефатоксим, бензилпенициллин), так и ингибировать фермент транспептидазу, участвующую в биосинтезе мукопептида клеточной стенки (ванкомицин, цефтриаксон, анаэроцеф). Вследствие этого, МПК антибиотика повышается, а чувствительность биоплёночной культуры снижается [65]. 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⁺* являются такие антибактериальные препараты, как гентамицин, а также канамицин и ванкомицин, к которым чувствительны как типовая, так и биопленочные культуры коринебактерий.

Нахождение микроорганизмов в составе биопленки способствует усилению их устойчивости не только к антибактериальным препаратам, но и факторам врожденного иммунитета [12, 66]. По результатам наших исследований, наиболее устойчивыми к поглотительной активности макрофагов оказались 720-часовые биопленочные культуры двух исследованных штаммов *C. diphtheriae*, ФИ которых ниже ($t \geq 2$, $P \geq 95$ %), чем типовых культур этих же штаммов. Переваривающая активность макрофагов при исследовании биопленочных 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 была ниже аналогичных значений ИЗФ типовых культур соответствующих штаммов.

В составе клеточной стенки *C. diphtheriae* находится корд-фактор — гликолипид, представляющий собой 6,6'-диэфир трегалозы, содержащий коринемиколовую и коринемиколеновую кислоты [74], 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 матрикса у биоплёночной культуры *C. diphtheriae* усугубляет ингибирующее фагоцитоз действие корд-фактора.

Обработка макрофагов нейтрофилокинами оказывала стимулирующее влияние на поглотительную активность макрофагов только в отношении 720-часовой биоплёночной культуры циркулирующего штамма *C. diphtheriae* (ФИ – $21,0 \pm 3,7$ %). Переваривающая активность макрофагов (ИЗФ) под воздействием НФК увеличивалась в отношении типовой ($2,9 \pm 0,3$ %) и 120-часовой биоплёночной ($2,0 \pm 0,05$ %) культуры циркулирующего штамма *C. diphtheriae*, а также 720-часовой биоплёночной ($4,4 \pm 1,2$ %) культуры музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺ № 665*. Полученные данные свидетельствуют об эффективности стимулирующего воздействия нейтрофилокинов 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 [59]. 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*. Количество клеток с признаками апоптоза находилось в пределах от $55,1 \pm 5,3$ до $78,0 \pm 1,7$ %. При этом апоптогенная активность наиболее выражена у 720-часовой биоплёночной ($78,0 \pm 1,7$ %) культуры циркулирующего штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺*, что требует дальнейшего изучения.

Воздействие нейтрофилокинами ведет 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 $3,5 \pm 0,3$ до $37,6 \pm 1,4\%$) по сравнению с таковым без нейтрофилокинов (от $55,1 \pm 5,3$ до $78,0 \pm 1,7\%$). 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.

Следует отметить, что наиболее высокая апоптогенная активность ($37,6 \pm 1,4\%$) 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 приводит 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*.

Таким образом, токсигенные штаммы *C. diphtheriae gravis tox⁺* обладают способностью к биопленкообразованию. Коринебактерии в составе биопленки 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⁺* 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⁺* не имеют отличий от типовых по ферментативным и токсигенным свойствам, но отличаются по культуральным свойствам (на кровяно-теллуритовом агаре колонии меньшего размера, черного 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⁺* 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⁺* 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.

**ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ,
ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ**

АБП	— антибактериальные препараты
АИ	— аутоиндукторы;
ВДП	— верхние дыхательные пути;
ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота;
ДА	— дифтерийный анатоксин;
ДТ	— дифтерийный токсин;
ИЗФ	— индекс завершённости фагоцитоза;
ИЛ	— интерлейкин;
КА	— кровяной агар;
кВ	— киловатт;
КОЕ	— колониеобразующая единица;
КРС	— крупный рогатый скот;
КТА	— кровяно-теллуритовый агар
м.т.	— микробные тела;
МПА	— мясо-пептонный агар;
МПК	— минимальная подавляющая концентрация;
мРНК	— матричная (информационная) рибонуклеиновая кислота
МУК, МУ	— методические указания;
Нф	— нейтрофилы;
НфК	— нейтрофилокины;
ОП	— оптическая плотность;
ОТДМ	— определение токсигенности дифтерийного микроба;

ПЦР	— полимеразная цепная реакция
ФИ	— фагоцитарный индекс;
ФНО	— фактор некроза опухолей;
ФЧ	— фагоцитарное число;
ЦИК	— циркулирующие иммунные комплексы;
16S рРНК	— 16S рибосомальная рибонуклеиновая кислота;
Ig	— иммуноглобулин
PIA	— Polysaccharide Intercellular Adhesin;
QS	— Quorum Sensing.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аксёнов, О.А. Патогенетические аспекты дифтерийной инфекции / О.А. Аксёнов, А.С. Кветная, Е.А. Мурина // Дифтерия у детей. – СПб., 2000. – С. 25-80.
2. Афиногенова, А.Г. Микробные биопленки ран: состояние вопроса / А.Г. Афиногенова, Е.Н. Даровская // Травматология и ортопедия России. – 2011. – № 3 (61). – С. 119-125.
3. Белобородова, Н.В. Влияние комбинации кларитромицина с имипенемом на формирование микробной биопленки *Pseudomonas aeruginosa* / Н.В. Белобородова, И.Т. Байрамов, Д.О. Миленин // Инфекции в хирургии. – 2010. – Т. 8. - № 2. – С. 56-64.
4. Беседнова, Н.Н. Факторы патогенности *Corynebacterium diphtheriae*, циркулирующих в Приморском крае в условиях массовой иммунизации населения / Н.Н. Беседнова, Т.С. Запорожец, И.Д. Макаренкова, Ю.Н. Хорошевская, Г.К. Черданцева // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2000. – № 3. – С. 6-9.
5. Бехало, В.А. Иммунологические особенности бактериальных клеток медицинских биопленок / В.А. Бехало, В.М. Бондаренко, Е.В. Сысолятина, Е.В. Нагурская // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2010. – № 4. – С. 97-107.
6. Бухарин, О.В. Проблемы персистенции патогенов в инфектологии / О.В. Бухарин // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2006. – № 4. – С. 4-8.
7. Васильев, К.Г. Эпидемия дифтерии среди взрослых / К.Г. Васильев, А.И. Савчук // Эпидемиология и инфекц. болезни. – 2003. – № 2. – С. 6-9.
8. Вознесенский, Н.А. Биопленки – терапевтическая мишень при хронических инфекциях / Н.А. Вознесенский // Атмосфера. Пульмонология и аллергология. – 2008. – № 3. – С. 61.

9. Галеев, А.Г. Дифтерия. Эпидемиология и профилактика / А.Г. Галеев, М.Ш. Шафеев, И.К. Хасанова. – Казань: КГМУ, 2003. – 51 с.
10. Гинцбург, А.Л. «Quorum sensing» или социальное поведение бактерий / А.Л. Гинцбург, Т.С. Ильина, Ю.М. Романова // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2003. – № 5. – С. 86-93.
11. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
12. Голуб, А.В. Бактериальные биоплёнки – новая цель терапии? / А.В. Голуб // Клин. микробиология и антимикроб. химиотерапия. – 2012. – Т. 4. - № 1. – С. 23-30.
13. Гостев, В.В. Бактериальные биоплёнки и инфекции / В.В. Гостев, С.В. Сидоренко // Журн. инфектологии. – 2010. – Т. 2. - № 3. – С. 4-15.
14. Гублер, Е.В. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях / Е.В. Гублер, А.А. Генкин. – Л.: Медицина, 1973. – 141 с.
15. Евдокимова, Н.В. Персистирующие клетки микроорганизмов / Н.В. Евдокимова, Т.В. Черненькая // Клин. микробиология и антимикроб. химиотер. – 2013. – Т. 15. - № 3. – С. 192-197.
16. Езепчук, Ю.В. Биомолекулярные основы патогенности бактерий / Ю.В. Езепчук. – М.: Наука, 1977. – 215 с.
17. Езепчук, Ю.В. Нейраминидаза *Corynebacterium diphtheriae* как фактор патогенности с функцией распространения / Ю.В. Езепчук, Ю.В. Вертиев, Н.Н. Костюкова // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1973. – Т. 75. - № 2. – С. 63-65.
18. Еремина, О.Ф. Изучение уровня специфических противодифтерийных антител у больных с различными формами дифтерийной инфекции / О.Ф. Еремина, М.М. Шкарупета, Т.А. Новикова, Н.Д. Ющук // Иммунология. – 1997. – № 5. – С. 61-62.
19. Зайнуллин, А.А. Аутоантитела к РНК и ДНК в сыворотке крови здоровых людей / А.А. Зайнуллин, А.С. Зайнуллина, А.В. Богданова, Л.И. Саттарова,

- Н.В. Ткачева, В.Г. Винтер // Мед. иммунология. – 2003. – Т. 5. - № 1-2. – С. 157-160.
20. Здановский, А. Г. Структура и функции дифтерийного токсина / А.Г. Здановский, М.В. Здановская, Н.К. Янковский // Мол. генетика, микробиол. и вирусол. – 1988. – № 12. – С. 3-10.
 21. Иванова, В.В. Бактерионосительство токсигенных коринебактерий дифтерии на эпидемическом спаде заболеваемости дифтерией / В.В. Иванова, О.В. Родионова, Т.Б. Корженевская // Рос. мед. журн. – 2003. – № 5. – С. 38-41.
 22. Иванова, В.В. Иммунный ответ и тяжесть клинических проявлений дифтерийной инфекции у детей / В.В. Иванова, О.В. Родионова, А.А. Аксёнов // Эпидемиология и инфекц. болезни. – 1998. – № 1. – С. 45-49.
 23. Иванова, В.В. Принципы терапии дифтерийной инфекции у детей / В.В. Иванова, О.В. Родионова, Г.П. Курбатова // Дифтерия у детей. – СПб., 2000. – С. 197-231.
 24. Ильина, Т.С. Биоплёнки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития / Т.С. Ильина, Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург // Генетика. – 2004. – Т. 40. - № 11. – С. 1445-1456.
 25. Ильина, Т.С. Системы коммуникаций у бактерий и их роль в патогенности / Т.С. Ильина, Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург // Мол. генетика, микробиол. и вирусол. – 2006. – № 3. – С. 22-29.
 26. Капустин, В.А. Осложнение дифтерии / В.А. Капустин, В.В. Болдырев, Е.Ф. Седак // Терапевт. арх. – 1993. – Т. 65. - № 3. – С. 75-77.
 27. 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.
 28. Кветная, А.С. Лабораторные методы диагностики дифтерии / А.С. Кветная, О.А. Аксёнов // Дифтерия у детей. – СПб., 2000. – С. 81-93.

29. Комбарова, С.Ю. Применение ПЦР с универсальными праймерами риботипирования мультилокусного энзимного электрофореза для анализа штаммов *C. diphtheriae*, выделенных в России в 1995-1997 г. / С.Ю. Комбарова, В.Г. Мельников, О.Ю. Борисова // Генодиагностика инфекционных болезней: сб. тр. 5-ой Всерос. науч. - практ. конф. – М., 2004. – Т. 2. – С. 291-292.
30. Кондратьева, И.А. Практикум по иммунологии: учебное пособие / под ред. И.А. Кондратьевой, В.Д. Самуилова. – М.: МГУ, 2001. – 224 с.
31. Костюкова, Н.Н. Бактерионосительство как форма персистенции менингококков / Н.Н. Костюкова, В.А. Бехало // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2009. – № 4. – С. 8-12.
32. Костюкова, Н.Н. Возбудитель дифтерии и условно-патогенные коринебактерии / Н.Н. Костюкова // Клин. лаб. диагностика. – 2001. – № 6. – С. 25-31.
33. Костюкова, Н.Н. Иммунологическое изучение поверхностных соматических антигенов дифтерийных бактерий / Н.Н. Костюкова, Ю.В. Езепчук, Х.В. Кадырова, Н.Б. Павлова // Детские капельные инфекции: матер. науч-практ. конф. – Киев, 1971. – С. 47-49.
34. Костюкова, Н.Н. Уроки дифтерии / Н.Н. Костюкова // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1999. – № 2. – С. 92-96.
35. Крюков, А.И. Биоплёнки в этиологии и патогенезе хронического тонзиллита / А.И. Крюков, В.Н. Жуховицкий, А.С. Товмасын // Вестн. оториноларингологии. – 2008. – № 3. – С. 71-73.
36. Лабинская, А.С. Руководство по медицинской микробиологии. Кн. 2 Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций. / под ред. А.С. Лабинской, Н.Н. Костюковой, С.М. Ивановой. – М.: Медицина, 2012. – 1152 с.
37. Лабораторная диагностика дифтерии: методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. – 58 с.
38. Лабушкина, А.В. Противодифтерийный иммунитет у детей с аллергическими заболеваниями / А.В. Лабушкина, Г.Г. Харсеева, Е.П. Москаленко // Вестн. РУДН. – 2009. – № 4. – С. 144-148.

39. Ланкин, Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Ланкин. – М.: Высшая школа, 1990. –352 с.
40. Мазурова, И.К. Молекулярно-биологические методы в диагностике и наблюдении за возбудителем дифтерийной инфекции / И.К. Мазурова, С.Ю. Комбарова, В.М. Михайлова // Проблемы эпидемиологии, микробиологии и клиники капельных и кишечных инфекций: сб. науч. тр. – М., 1996. – Т. 1. – С. 76-79.
41. Мазурова, И.К. Мониторинг возбудителя дифтерийной инфекции / И.К. Мазурова, С.Ю. Комбарова, О.Ю. Борисова // Эпидемиол. и вакцинопрофилактика. – 2009. – № 3. – С. 17-22.
42. Мазурова, И.К. Некоторые аспекты дифтерийного бактерионосительства / И.К. Мазурова, В.Г. Мельников, Т.В. Платонова // Проблемы эпидемиологии, микробиологии и клиники капельных и кишечных инфекций: сб. науч. тр. – М.; 1996. – Т. 1. – С. 64-67.
43. Максимова, Н.М. Иммунизация взрослого населения против дифтерии и России в 2006-2007 гг. / Н.М. Максимова, С.С. Маркина, К.А. Яцковский, В.В. Черкасова, Г. Ф. Лазикова // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2008. – № 6. – С. 27-31.
44. Максимова, Н.М. Характеристика антитоксического противодифтерийного иммунитета в различных возрастных группах населения России в последние годы / Н.М. Максимова, С.С. Маркина, Н.А. Кошкина // Вакцинация. – 2006. – № 7. – С. 10-11.
45. Маркина, С.С. Дифтерия в России в 1990 - 1994 годах / С.С. Маркина, А.А. Монисов, Н.М. Максимова [и др.] // Проблемы эпидемиологии, микробиологии и клиники капельных и кишечных инфекций: сб. науч. тр. – М., 1996. – С. 18-20.
46. Маркина, С.С. Заболеваемость дифтерией в России в настоящее время / С.С. Маркина, Н.М. Максимова, Г.Ф. Лазикова // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2005. – № 1. – С. 31-37.
47. Маркина, С.С. Эпидемиологическая ситуация по дифтерии в России в настоящее время / С.С. Маркина, Н.М. Максимова, В.В. Черкасова, Н.А.

- Кошкина // Вакцинация. – 2006. – № 1. – С.7-9.
48. 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.
49. МУ 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: методические указания. – М., 2004. – 91 с.
50. Николь, Н. Электронные таблицы EXCEL 5.0: практическое пособие / Н.Николь, Р.Альбрехт. – М.: Эком,1996. – 352 с.
51. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений: приказ Минздрава СССР от 22 апреля 1985 г. № 535. – М., 1985. – 16 с.
52. Онищенко, Г.Г. Сохранение здоровья нации - борьба инфекциями и паразитарными заболеваниями / Г.Г. Онищенко // Эпидемиология и инфекц. болезни. – 2007. – № 5. – С. 4-10.
53. Плакунов, В.К. Персистенция и адаптивный мутагенез в биопленках / В.К. Плакунов, Е.А. Стрелкова, М.В. Журина // Микробиология. – 2010. – Т. 79. - № 4. – С. 447-458.
54. Пшежецкий, А.В. Десалилирование поверхностных рецепторов: новое направление в регуляции клеточных систем / А.В. Пшежецкий, Л.И. Ашмарина // Биохимия. – 2013. – Т. 78. - № 7. – С. 949-961.
55. Романова, Ю.М. Биоплёнки патогенных бактерий и их роль в хронизации инфекционного процесса. Поиск средств борьбы с биоплёнками / Ю.М. Романова, Л.В. Диденко, Э.Р. Толордова, А.Л. Гинцбург // Вестн. РАМН. – 2011. – № 10. – С. 31-39.
56. 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.
57. Турьянов, М.Х. Ведущие синдромы дифтерии. Осложнения дифтерии / М.Х.

- Турьянов, Н.М. Беляева // Дифтерия. – М.: Медицина, 1996. – С. 118-146.
58. Турьянов, М.Х. Патогенез дифтерии / М.Х. Турьянов // Дифтерия. – М.: Медицина, 1996. – С. 34-54.
59. Тюкавкина, С.Ю. Роль апоптоза в формировании иммунопатологических процессов, способствующих развитию инфекционных заболеваний / С.Ю. Тюкавкина // Иммунология. – 2013. – № 1. – С. 52-57.
60. Харсеева, Г.Г. Патогенные свойства *C. diphtheriae*, циркулирующих в г. Ростове-на-Дону и Ростовской области в межэпидемический период / Г.Г. Харсеева, Е.П. Москаленко, А.Л. Трухачев, Т.В. Митрофанова // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2006. – № 6. – С. 6-9.
61. Харсеева, Г.Г. Адгезия *Corynebacterium diphtheriae*: роль поверхностных структур и механизм формирования / Г.Г. Харсеева, А.А. Алиева // Журн. микробиологии, эпидемиологии, иммунобиологии. – 2014. – № 4 – С. 109 - 119.
62. 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.
63. Харсеева, Г.Г. Дифтерия: микробиологические и иммунологические аспекты / под ред. Г.Г. Харсеевой. – М.: Практическая медицина, 2014. – 241 с.
64. Харсеева, Г.Г. Состояние иммунитета к дифтерии у населения Ростова-на-Дону и Ростовской области в последние годы / Г.Г. Харсеева, А.Р. Квасов, Э.Л. Алутина // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2009. – № 6. – С. 80-83.
65. Чеботарь, И.В. Антибиотикорезистентность биоплёночных бактерий / И.В. Чеботарь, А.Н. Маянский, Е.Д. Кончакова, В.П. Лазарева // Клин. микробиология и антимикроб. химиотерапия. – 2012. – Т. 14. - № 1. – С. 51-57.
66. Чеботарь, И.В. Механизмы антибиопленочного иммунитета / И. В.Чеботарь // Вестник РАМН. – 2012. – № 12. – С. 22-29.
67. Allesen – Holm, M. A. Characterization of DNA – release in *Pseudomonas aue-*

- ruginosa cultures and biofilms / M. Allesen – Holm, B. Barken, L. Yang // *Mol. Microbiol.* – 2006. – Vol. 59. - N 4. – P. 1114-1128.
68. An, Y.H. Mechanisms of bacterial adhesion and pathogenesis of implant and tissue infections / Y.H. An, R.B. Dickinson, R.J. Doyle // *Handbook of bacterial adhesion: principles, methods, and applications.* – N. Y., 2000. – P. 1-27.
69. Balaban, N.Q. Bacterial persistence as a phenotypic switch / N.Q. Balaban // *Science.* – 2004. – Vol. 305. - N 5690. – P. 1622-1625.
70. Bassler, B.L. Small talk: cell-to -cell communication in bacteria / B.L. Bassler // *Cell.* – 2002. – Vol. 109. - N 4. – P. 421-424.
71. Black, C.E. Current concepts regarding the effect of wound microbial ecology and biofilms on wound healing / C.E. Black, J.W. Costerton // *Surg. Clin. North. Am.* – 2010. – Vol. 90. - N 6. – P. 1147-1160.
72. Bortner, C.D. Apoptotic volume decrease and the incredible shrinking cell / C.D. Bortner, J.A. Cidlowski // *Cell Death Differ.* – 2002. – Vol. 9. - N 12. –P. 1307-1310.
73. Brown, A.A dose - response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms / A. Brown, S. Lin, K. Lewis // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2000. – Vol. 44. - N 3. – P. 640-646.
74. Burkovski, A. Cell envelope of Corynebacteria: structure and influence on pathogenicity / A. Burkovski // *ISRN Microbiology.* – 2013. – Vol. 2013. – P. 1-11.
75. Burnolle, M. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multi-species biofilms / M. Burnolle, J.S. Webb, D. Rao // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2006. – Vol. 72. - N 6. – P. 3916-3923.
76. Camilli, A. Bacterial small-molecule signaling pathways / A. Camilli, B.L. Bassler // *Science.* – 2006. – Vol. 311. - N 5764. – P. 1113-1116.
77. Carpentier, B. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry / B. Carpentier, O. Cerf // *J. Appl. Bacteriol.* – 1993. – Vol. 75. - N 6. – P. 499-511.
78. Chang, S. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing

- the vanA resistance gene / S. Chang, D.M. Sievert, J.C. Hageman, M.L. Boulton, F.C. Tenover, F.P. Downes // *N. Engl. J. Med.* – 2003. – Vol. 348. - N 14. – P. 1342-1347.
79. Coller, R.I. Chimeric toxins: toxic, disulfide linked conjugate of con A with fragment A from diphtheria toxin / R.I. Coller, D.G. Crilliland, J.M. Mochring // *PNAS.* – 1978. – Vol. 75. - N 11. – P. 5310-5323.
80. Colvin, K.M. The Pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa* [Electronic resource] / K.M. Colvin, V.D. Gordon, K. Murakami, B. R. Borlee, D.J. Wozniak, G.C. Wong, M.R. Parsek // *PLoS Pathog.* – 2011. – 7:e1001264. – Mode of access: doi: 10.1371/journal.ppat.1001264. – 16.03.15.
81. Costerton, J.W. Bacterial biofilms in nature and disease / J.W. Costerton, K-J. Cheng, G.G. Geesey, T.I. Ladd, J.C. Nickel, M. Dasgupta, T.J. Marrie // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1987. – Vol. 41. - N 1. – P. 435-464.
82. Costerton, J.W. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections / J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg // *Science.* – 1999. – Vol. 284. - N 5418. – P. 1318-1322.
83. Costerton, J.W. Microbial biofilms / J.W. Costerton, Z. Lewandowski, D.E. Caldwell, D.R. Korber, H.M. Lappin-Scott // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1995. – Vol. 49. - N 1. – P. 711-745.
84. Costerton, J.W. The biofilm primer / J.W. Costerton. – Berlin: Springer, 2007. – Vol. 1. – 200 p.
85. Costi, D.S. Quorum sensing: talk sense / D.S. Costi // *Clin. Inf. Dis.* – 2008. – Vol. 47. - N 8.– P. 1070-1076.
86. Darouiche, R.O. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence / R.O. Darouiche // *Clin. Infect. Dis.* – 2001. – Vol. 33.- N 9. – P. 1567-1572.
87. Davey, M.E. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics / M.E. Davey, G.A. O'Toole // *Microbiol Mol. Biol. Rev.* – 2000. – Vol. 64. - N 4. – P. 847-867.

88. De Keersmaecker, S.C. Let LuxS speak up in AI-2 signaling / S. C. De Keersmaecker, K. Sonck, J. Vanderleyden // Trends Microbiol. – 2006. – Vol. 14. - N 3. – P. 114-119.
89. Diemond-Hernandez, B. Production of icaADBC encoded polysaccharide intercellular adhesin and therapeutic failure in pediatric patients with staphylococcal device-related infections / B. Diemond-Hernandez, F. Solórzano-Santos, B. Leños-Miranda, L. Peregrino-Bejarano, G. Miranda-Novales // BMC Infect. Dis. – 2010. – Vol. 10. – P. 68-74. – doi: 10.1186/1471-2334-10-68.
90. Donlan, R.M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms / R.M. Donlan, J.W. Costerton // Clin. Microbiol. Rev. – 2002. – Vol. 15. - N 2. – P. 167-193.
91. Dos Santos, C.S. Non-opsonic phagocytosis of homologous non-toxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains by human U-937 macrophages / C.S. dos Santos, L.S. dos Santos, M.C. de Sours // Microbiol. Immunol. – 2010. – Vol. 54, Issue. 1. – P. 1-10.
92. Dubois, M. Colorimetric method for determination of sugars and related substances / Dubois M., Gilles K.A., Hailton J.K. // Anal. Chem. – 1956. – Vol. 28. - N 3. – P. 350-356.
93. Dular, V. Comparative studies of the in vivo toxin neutralization and the in vitro vero cell assay methods for use in potency testing of diphtheria component in combined vaccines toxoids / V. Dular // Biologicals. – 1993. – Vol. 21. – P. 53-59.
94. Dunne, W.M. Diffusion of rifampin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilm / W.M. Jr. Dunne, E.O. Mason, S.L. Kaplan // Antimicrob. Agents Chemother. – 1993. – Vol. 37. - N 12. – P. 2522-2526.
95. Eckhart, L. Nase 1L2 suppresses biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* / L. Eckhart, H. Fischer, K.B. Barken, T. Tolker-Nielsen, E. D. Tschachler // Brit. J. Dermatol. – 2007. – Vol. 156. - N 6. – P. 1342-1345.
96. El-Azizi, M. Molecular basis of bacterial adhesion / M. El-Azizi, S. Rao, T.

- Kanchanapoom, N. Khardori // *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* – 2005. – Vol. 7. – P. 29-41.
97. Fredhem, E.G. *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide einter cellular adhesion activates complemebt / E.G. Fredhem, H.N. Granso, T. Flaegtad // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2011. – Vol. 63. - N 2. – P. 269-280.
 98. Fuqua, W.C. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserinelacton Quorum sensing / W.C. Fuqua, M.R. Parces, E.P. Greenberg // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2002. – Vol. 3. - N 9. – P. 685-695.
 99. Gera, C. Quorum-sensing: the phenomenon of microbial communication / C. Gera, S. Srivastava // *Current Science.* – 2006. – Vol. 90. - N 5. – P. 666-677.
 100. Golaz, A. Epidemic diphtheria in the newly independent states of the former soviet union: implications for diphtheria control in the united states / A. Golaz, I.R. Hardy, T.G. Glushkevich, E.K. Areytchiuk // *J. Infect. Dis.* – 2000. – Vol. 181. - N 1. – P. 237-243.
 101. Gomes, D. L. R. *Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence / D. L. R. Gomes, C. A. S. Martins, L.M. D. Faria, L.S. Santos, S.S. Cintia, P. S. Sabbadini, M.C. Souza, G. B. Alves, A. C. P. Rosa, P. E. Nagao, G.A. Pereira, R. Hirata, A. L. Mattos-Guaraldi // *J. Med. Microbiol.* – 2009. – Vol. 58. - N 11. – P. 1419-1427.
 102. Gomes, D. L. R. SubMICs of penicillin and erythromycin enhance biofilm formation and hydrophobicity of *Corynebacterium diphtheriae* strains / D. L. R. Gomes, R. S. Peixoto, E. A. B. Barbosa, F. Napolea'o, P. S. Sabbadini, K. R. N. dos Santos,3 A. L. Mattos-Guaraldi1, R. Hirata // *J. Med. Microb.* – 2013. – Vol. 62, Pt 5. – P. 754-760.
 103. Gupta, K. Antimicrobial tolerance of *Pseudomonas aeruginosa*. Biofilms is activated during an early developmental stage and requires the two-component hybrid sags / K. Gupta, C. N.H. Marques, O.E. Petrova, K. Sauer // *J. Bacteriology.* – 2013. – Vol. 195. - N 21. – P. 4975-4987.
 104. Hall-Stoodley, L.P. Evolving conceptson biofilm infections / L.P. Hall-Stoodley

- // Cell. Microbiol. – 2009. – Vol. 11. - N 7. – P. 1034-1043.
105. Hcilmann, C.O. Molecular basis of inter cellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* / C.O. Hcilmann, C.Schweitzer, N. Gerke, D. Vanittanakom // Mol. Microbiol. – 1996. – Vol. 20. – P. 1083-1091.
 106. Hibbing, M.E. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle / M.E. Hibbing, C.M. Fuqua, M.R. Parsek, S.B. Peterson // Nat. Rev. Microbiol. – 2010. – Vol. 8. - N 1. – P. 15-25.
 107. Hu, V.W. Evidence for direct insertion of fragments A and B of diphtheria toxin into model membranes / V.W. Hu, R.C. Holmer // J. Biol. Chem. – 1984. – Vol. 259. - N 19. – P. 12226-12233.
 108. Hultgren S.J. Pilus and non pilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition / S.J. Hultgren // Cell. – 1993. – Vol. 73. - N 5. – P. 887-901.
 109. Karatan, E. Signals, regulatory networks and marials that build and break bacterial biofilms / E. Karatan, P. Watnik // Mol. Rev. Microbiol. – 2009. – Vol. 73. - N 2. – P. 310-347.
 110. Keren, I. Specialized persister cells and the Mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli* / I. Keren // J. Bact. – 2004. – Vol. 186. - N 24. – P. 8172-8180.
 111. Khan, W. Aminoglycoside resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms modulated by extracellular polysaccharide / W. Khan, S.P. Bernier, S.L. Kuchma, J.H. Hammond, F. Hasan, G.A. O'Toole // Int. Microbiol. – 2010. – Vol. 13. – N 4. – P. 207 - 212.
 112. Kim, S. Regulation of *Vibrio vulnificus* virulence by the luxS quorum-sensing system // Mol. Microbiol. – 2003. – Vol 48, Iss. 6. – P. 1647-1664.
 113. Kotsougiani, D. Activation of T-lymphocytes in response to persistent bacterial infectioni induction of CD 11 b and of toll-like receptors on T cells [Electronic resource] / D. Kotsougiani, M. Pioch, B. Prior, V. Heppert, G. Maria Hänsch, C. Wagner // Inf. J. Inflamm. – 2010. – Vol. 2010. – Article ID 526740, 10 p. – Mode of access: <http://dx.doi.org/10.4061/2010/526740>. – 14.03.15
 114. Kwaszewska, A. K. Hydrophobicity and biofilm formation of lipophilic skin *Corynebacteria* / A. K. Kwaszewska, A. Brewczyńska, E. M. Szewczyk // Polish

- J. Microbiol. – 2006. – Vol. 55. - N 3. – P. 189-193.
115. Latasa, C. Biofilm-associated proteins / C. Latasa, C. Solano, J.R. Penades, I. Lasa // C.R. Soc. Biol. – 2006. – Vol. 329. - N 11. – P. 849-857.
116. Leid, J.G. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing / J.G. Leid, C.J. Willson, M.E. Shirtliff // J. Immunol. – 2005. – Vol. 175. - N 11. – P. 7512-7518.
117. Lemon, K.P. Biofilms: a component with an emphasis on *Bacillus subtilis* / K.P. Lemon, A.M. Earl, H.C. Vlamakis // Curr. Top Microbiol. Immunol. – 2008. – Vol. 322. – P. 1-16.
118. Leung, V.A. A stress-inducible quorum sensing peptide mediates the formation of persister cells with non-inherited multidrug tolerance / V. Leung, C.M. Leversque // J. Bacteriol. – 2012. – Vol. 194. - N 9. – P. 2265-2274.
119. Lewis, K. Persister cells and the riddle of biofilm survival / K. Lewis // Annu. Rev. Microbiol. – 2010. – Vol. 64. - N 1. – P. 357-372.
120. Lewis, K. Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance / K. Lewis // Handb. Exp. Pharmacol. – 2012. – Vol. 211. – P. 121-133.
121. Li, Ch. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies / Ch. Li, W. Yumei // Int. J. Oral. Sci. – 2011. – Vol 3. - N 2. – P. 66-73.
122. Lombardia, E. LuxS-dependent cell-to-cell language regulates social behavior and development in *Bacillus subtilis* / E. Lombardia, J. Adria'n, A. Rovetto, L. Arabolaza, R.A. Grau // Am. Soc. Microbiol. – 2006. – Vol. 188. - N 12. – P. 4442-4452.
123. Lowry, O.H. Protein measurement with the folin-phenol reagent / O.H. Lowry, M.J. Rosenbrough, R.Z. Farrar // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193. - N 1. – P. 265-276.
124. Mack, D. Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesion / D. Mack, M. Nedelmann, A. Krokotsch, A. Schwarzkopf, J. Heesemann, R. Laufs // Infect. Immun. – 1994. – Vol. 62. - N 8. – P. 3244-3253.

125. Madshus, J. The N-terminal alfa-helix of fragment B diphtheria toxin promotes translocation of fragment A into the cytoplasm of eukaryotic cells / J. Madshus // J. Biol. Chem. – 1994. – Vol. 269. - N 26. – P. 17723-17729.
126. Maira-Litran, T. An evaluation of the potential of the multiple antibiotic resistance operon [max] and the multidrug efflux pump *acrAB* to moderate resistance towards ciprofloxacin in *Escherichia coli* biofilms / T. Maira-Litran, D.G. Allison, P. Gilbert // J. Antimicrob. Chemother. – 2000. – Vol. 45. - N 6. – P. 789-795.
127. Mandlik, A. Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development / A. Mandlik, A. Swieczynski // Trends Microbiol – 2008. – Vol. 16, Iss. 1. – P. 33-40.
128. Mandlik, A. *Corynebacterium diphtheriae* employs specific minor pilins to target human pharyngeal epithelial cells / A. Mandlik, A. A. Das Swieczynski // Mol. Microbiol. – 2007. – Vol. 64, Issue 1. – P. 111-124.
129. Mattos-Guaraldi, A.L. Cell surface component and adhesion in *Corynebacterium diphtheriae* / A.L. Mattos-Guaraldi, L.C.D. Formiga, G.A. Pereira // Microbes Infect. – 2000. – Vol. 2. - N 12. – P. 1507-1512.
130. Mehta, P. Information processing and signal integration in bacterial quorum sensing / P. Mehta // Mol. Syst. Biol. – 2009 – Vol. 5. – P. 325.
131. Millar, M.R. Influence of lysozyme on aggregation of *Staphylococcus aureus* / M.R. Millar, T. Inglis // J. Clin. Microbiol. – 1987. – Vol. 25. - N 9. – P. 1587-1590.
132. Miller, M.B. Quorum sensing in bacteria / M.B. Miller, B.L. Bassler // Annu. Rev. Microbiol. – 2001. – Vol. 55. - N 1. – P. 165-199.
133. Mittal, R. Contribution of macrophages secretory products to urovirulence of *Pseudomonas aeruginosa* / R. Mittal, S. Aggarwal, S. Sharma // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2009. – Vol. 57- N 2. – P. 156-164.
134. Mohamed, J.A. Biofilm formation by enterococci / J.A. Mohamed, D.B. Huang // J. Med. Microb. – 2007. – Vol. 56. - N 12. – P. 1581-1588.
135. Moner, N. *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug - tolerant persister cells in response to quorum - sensing signaling molecules / N. Moner //

- J. Bacteriol. – 2010. – Vol. 192. - N 7. – P. 1946-1955.
136. Moons, P. Bacterial interactions in biofilms / P. Moons // Crit. Rev. Microbiol. – 2009. – Vol. 35. - N 3. – P. 157-168.
137. Moreira, L.O. Novel lipoarabinomannan - like lipoglycfn (CdiLAM) contributes to the adherence of *Corynebacterium diphtherial* to epithelial cells / L.O. Moreira, A.L. Mattos-Guaraldi, F.F.B. Andrade // Arch. Microbiol. – 2008. – Vol. 19. - N 15. – P. 521-530.
138. Mulcahy, H. Extracellular DNA chelatescations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms [Electronic resource] / H. Mulcahy, L. Charon-Mazenod, S. Lewenza // PLoSPathog. 2008. – 4(11):e1000213. – Mode of access: doi:10.1371 /journal.ppat.1000213. – 14.03.15.
139. Nakao, H. Heterogeneity of diphtheria toxin gene, tox and its regulatory element, dtxR, in *Corynebacterium diphtheriae* strains causing epidemic diphtheria in Russia and Ukraine / H. Nakao, J.M. Pruckler, I.K. Mazurova // J. Clin. Microbiol. – 1996. – Vol. 34. - N 7. – P. 1711-1716.
140. 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. - N 1. – P. 174-229.
141. Nguyen, D. Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilm sand nutrient-limited bacteria / D. Nguyen, A. Joshi-Datar, F. Lepine, E. Bauerle, O. Olakanmi, K. Beer, G. McKay, R. Siehnel, J. Schafhauser, Y. Wang, B.E. Britigan, P.K. Singh // Science. – 2011. – Vol. 334. - N 6058. – P. 982-986.
142. Novick, R.P. Autoinduction and signal transduction in the regulation of *Staphylococcus aureus* / R.P. Novick // Infect. and Immun. – 2003. – Vol. 48. - N 6. – P. 1429-1449.
143. Olieveria-Garcia, D. de Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces / D. de Olieveria-Garcia, M. Dall' Agnol, M. Rosales // Cell. Microbiol. – 2003. – Vol. 5. - N 9. – P. 625-636.
144. O'Toole, G. A. The initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analy-

- sis / G.A. O'Toole, R. Kolter // *Mol. Microbiol.* – 2007. – Vol. 28. - N 3. – P. 449-461.
145. Ott, L. *Corynebacterium diphtheriae* invasion-associated protein (DIP 1281) is involved in cell surface organization, adhesion and internalization in epithelial cells / L. Ott, M. Holler, R.G. Geriach, M. Hensel, J. Rheinlaender, T.E. Schaffer, A. Burkovski // *BMC Microbiology.* – 2010. – Vol. 10. - N 1. – P. 2-10.
146. Ott, L. Strain-specific differences in pili formation and the interaction of *Corynebacterium diphtheriae* with host cells [Electronic resource] / L. Ott, M. Holler, J. Rheinlaender // *BMC Microbiology.* – 2010. – Vol.10. – Article 257. – Mode of access: doi:10.1186/1471-2180-10-257. –14.03.15.
147. Pace, J.L. *Biofilms, infection, and antimicrobial therapy* / J.L. Pace. – Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006. – 495 p.
148. Pappas, K. Chemical communication in proteobacteria: biochemical and structural studies of signal synthase and receptors required for intercellular signaling / K. Pappas, C. Weingart, S. Winans // *Mol. Microbiol.* – 2004. – Vol. 53. – P. 756-769.
149. Pappenheimer, A.M. Diphtheria toxin / A.M. Pappenheimer // *Ann. Rev. Biochem.* – 1977. – Vol. 46. – P. 250-257.
150. Parsek, M. R. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms / M. R. Parsek, E. P. Greenberg // *Trends Microbiol.* – 2005. – Vol. 13. - N 1. – P. 27-33.
151. Parsek, M.R. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms / M.R. Parsek, E.P. Greenberg // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – Vol. 97. - N 16. – P. 8789-8793.
152. Parsek, M.R. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis / M.R. Parsek, P.K. Singh // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2003. – Vol. 57. - N 1. – P. 677-701.
153. Petrelli, D. Analysis of methicillin-susceptible and methicillin-resistant biofilm-forming *Staphylococcus aureus* from catheter infections isolated in a large Italian

- hospital / D. Petrelli // J. Med. Microb. – 2008. – Vol. 57, N 3. – P. 364-372.
154. Pinegin, B.V. Neitrofilny: struktura i funktsiya / B.V. Pinegin, A.N. Mayanskii // Immunologia. – 2007. – Vol. 28. - N 6. – P. 374-382.
 155. Pirarro - Cerda, J. Bacterial adhesion and entry into host cells / J. Pirarro - Cerda, P. Cossart // Cell. – 2006. – Vol. 124. - N 4. – P. 715-727.
 156. Prabhakara, R. Murine immune response to a chronic *Staphylococcus aureus* biofilm infection / R. Prabhakara, J.M. Harro, J.G. Leid // Infect. Immun. – 2011. – Vol. 79. - N 4. – P.1789-1796.
 157. Qin, Z. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* / Z. Qin, Y. Ou, L. Yang, Y. Zhu, T. Tolker-Nielsen, S. Molin, D. Qu // Microbiology. – 2007. – Vol. 153. - N 7. – P. 2083-2092.
 158. Roders, E.A. Adhesion by pathogenic *Corynebacteriae* / E.A. Roders, A. Das, H. Ton-That // Adv. Exp. Med. Biol. – 2011. – Vol. 715. - N 91. – P. 103.
 159. Roy, V. Cross species quorum quenching using a native AI-2 processing enzyme / V. Roy // ACS Chem. Biol. – 2010. – Vol. 5. - N 2. – P. 223-232.
 160. Sadovskaya, I. Potential use of poly – N-acetyl-beta-(1,6)-glucosamine as an antigen for diagnosis of staphylococcal orthopedic – prosthesis-related infections / I. Sadovskaya, S. Faure, D. Watier // Clin. Vacc. Immunol. – 2007. – Vol. 14. - N 12. – P. 1609-1615.
 161. Schauder, S. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal, molecule / S. Schauder, K. Shokat, M. G. Surette, B. L. Bassler // Mol. Microbiol. – 2001. – Vol. 41. - N 2. – P. 463-476.
 162. Shahrooei, M. Vaccination with SesC decreases *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation / M. Shahrooei, V. Hira, L. Khodaparast // Infect. Immun. – 2012. – Vol. 80. - N 10. – P 3660-3668.
 163. Sims, K.K. DNA fragmentation and cytolysis in U937 cells treated with diphtheria toxin or other inhibitors of protein synthesis / K.K. Sims, R.J. Collier // Exp. Cell Res. – 1993. – Vol. 208, Iss. 1. – P. 296-302.
 164. Singh, R. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilm / R. Singh, P. Ray, A. Das, M. Sharma // Antimicrob.

- Agents Chemother. – 2010. – Vol. 65. - N 9. – P. 1955-1958.
165. Souli, M. Effects of slime produced by clinical isolates of coagulase-negative Staphylococci on activities of various antimicrobial agents / M. Souli, H. Giamairellou // Antimicrob. Agents Chemother. – 1998. – Vol. 42. - N 4. – P. 939-941.
 166. Sun, D. Inhibition of biofilm formation by monoclonal antibodies against *Staphylococcus epidermidis* RP62A accumulation – associated protein / D. Sun, M.A. Accavitti, J.D. Bryers // Clin. Diag. Lab. Immunol. – 2005. – Vol. 12. - N 1. – P. 93-100.
 167. Taga, M.E. The Lux S-dependent autoinducer AI-2 controls the expression of an ABC transporter that functions in AI-2 uptake in *Salmonella typhimurium* / M.E. Taga, J.L. Semmelback, B.L. Bassler // Mol. Microbiol. – 2001. – Vol. 42. - N 3. – P. 777-793.
 168. Tateda, K. The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils / K. Tateda, I. Yoshikazu, H. Manabu, T. Matsumoto, M. Shinichi, J. C. Pechere, T. J. Standiford, M. Ishiguro, K. Yamaguchi // Infect. Immun. – 2003. – Vol. 71. - N 10. – P. 5785-5793.
 169. Vendeville, A. Making ‘sense’ of metabolism: autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria / A. Vendeville, K. Winzer, K. Heurlier, C. M. Tang, K. R. Hardie // Nat. Rev. Microbiol. – 2005. – Vol. 3. - N 5. – P. 383-396.
 170. Vergara-Irigaray, M. Wall teichoic acids are dispensable for anchoring the PNAG exopolysaccharide to the *Staphylococcus aureus* cell surface / M. Vergara-Irigaray, T. Maira-Litran, N. Merino, G.B. Pier, J.R. Penades, I. Lasa, // Microbiology. – 2008. – Vol. 154. - N 3. – P. 865-877.
 171. Verschoor, C.P. The macrophage / C.P. Verschoor, A. Puchta, D.M. Bowdish // Meth. Mol. Biol. – 2012. – Vol. 844. – P.139-156.
 172. Vu, B. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation / B. Vu // Molecules. – 2009. – Vol. 14. - N 7. – P. 2535-2554.
 173. Walker, T.S. Enhanced *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development mediated by human neutrophils / T.S. Walker, K.L. Tomlin, G. S. Worther // Infect. Im-

- mun. – 2005. – Vol. 73. - N 6. – P. 3693-3701.
174. Waters, C. M. Quorum sensing: cell to cell communication in bacteria / C. M. Waters, B. L. Bassler // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* - 2005.- № 21. - P. 319-346.
175. Watnick, P. Biofilm, city of microbes / P. Watnick, R. Kolter // *J. Bacteriol.* – 2000. – Vol. 182. - N 10. – P. 2675-2679.
176. Weigel, L.M. High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm / L.M. Weigel, R.M. Donlan, D.H. Shin, B. Jensen, N.C. Clark, L. K. McDougal // *Antimicrob. Agents. Chemother.* – 2007. – Vol. 51. - N 1. – P. 231-238.
177. Williams, P. Quorum sensing, communication and crosskingdom signalling in the bacterial world / P. Williams // *Microbiology.* – 2007. – Vol. 153. - N 12. – P. 3923-3938.
178. Wolfaardt, G.M. Multicellular organization in a degradative biofilm community / G.M. Wolfaardt, J.R. Lawrence, R.D. Roberts, S.J. Caldwell, D. E. Caldwell // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1994. – Vol. 60. - N 2. – P. 434-446.
179. Wood, A.J. Are biofilm associated with an inflammatory response in chronic rhinosinusitis? / A.J. Wood, J. Fraser, S. Swi, S. Amirapu, R.G. Douglas // *Int. Forum Allergy Rhinol.* – 2011. – Vol. 1. - N 5. – P. 335-339.
180. Wozniak, D.J. Effects of subinhibitory concentration of macrolide antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa* / D.J. Wozniak, R. Keyser // *Chest.* – 2004. – Vol. 125. - N 2. – P. 62S-69S.
181. Xavier, J.B. Cooperation and conflict in microbial biofilms / J.B. Xavier, K R. Foster // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – Vol. 104. - N 3. – P. 876-881.
182. Xiao, J. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm [Electronic resource] / J. Xiao, M.I. Klein, M.L. Falsetta, B. Lu, C.M. Delahunty, J.R. Yates, A. Heydorn, H. Koo // *PLoS Pathog.* – 2012. – 8:e1002623. – Mode of access: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002623>. – 16.03.15.
183. Xiong, Y.Q. Phenotypic and genotypic characteristics of persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia in vitro and in an experimental Endo-

- carditis Model / Y.Q. Xiong // J. Inf. Dis. – 2009. – Vol. 199. - N 2. – P. 201-209.
184. Xu, K.D. Biofilm resistance to antimicrobial / K.D. Xu, G.A. McFeters, P.S. Stewart // Microbiology. – 2000. – Vol. 146. - N 3. – P. 547-549.
185. Yao, Y. Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms / Y. Yao // J. Inf. Dis. – 2005. – Vol. 191. - N 2. – P. 289-298.
186. Yarwood, J.M. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections / J.M. Yarwood, P.M. Schlievert // J. Clin. Invest. – 2003. – Vol. 112. - N 11. – P. 1620 - 1625.

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⁺* 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 diphtheria* to antibiotics // J. Konzept: Scientific and Methodological e-magazine.- Vol 1, Iss №4 (Collected works, Best Article). - 2014. - P. 36-40.