

ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
«РОСТОВСКИЙ-НА-ДОНУ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ»
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

На правах рукописи

КОРШЕНКО ВИКТОРИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

АНТИЛАКТОФЕРРИНОВАЯ АКТИВНОСТЬ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

03.02.03 – микробиология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

И.Я. Черепихина

Ростов-на-Дону

2015 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 Обзор литературы	14
1.1 Роль лактоферрина в защите макроорганизма против возбудителей инфекционных болезней.....	14
1.2 Антилактоферриновая активность как фактор персистенции микроорганизмов.....	26
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	32
ГЛАВА 2 Материалы и методы	32
2.1 Штаммы.....	32
2.2 Реактивы и диагностические препараты.....	32
2.3 Лабораторные животные.....	38
2.4 Лабораторная посуда.....	38
2.5 Питательные среды.....	39
2.6 Оборудование.....	39
2.7 Методика определения антилактоферриновой активности у холерных вибрионов <i>in vitro</i>	39
2.8 Методика определения АЛФА <i>in vivo</i>	41
2.9 Методика определения нейтрализации антилактоферриновой активности сахарами.....	42
2.10 Методика определения уровня антилактоферриновой активности у штаммов <i>E.coli</i>	43
2.11 Методика определения антикомплементарной активности (АКА) холерных вибрионов.....	43
2.12 Методика определения антилизосимной активности (АЛА) холерных вибрионов.....	43
2.13 Рибонуклеазная активность холерных вибрионов.....	44
2.14 Методика определения резистентности к желчи (билирезистентности) холерных вибрионов.....	44
2.15 Методика определения уровня адгезии на культуре клеток Нер -2 и NuTu 80.....	45
2.16 Методика создания кислотного стресса.....	46
2.17 Методика создания комбинированного стресса.....	47
2.18 Детекция генов персистенции с помощью ПЦР.....	48
2.19 Метод постановки электрофореза.....	49
2.20 Статистические методы исследования.....	50
Глава 3 Антилактоферриновая активность холерных вибрионов ...	51
3.1 Антилактоферриновая активность холерных вибрионов <i>in vitro</i> ...	51
3.1.1 Антилактоферриновая активность холерных вибрионов Эль Тор.....	51
3.1.2 Антилактоферриновая активность холерных вибрионов O139 серогруппы.....	60

3.1.3	Антилактоферриновая активность классических холерных вибрионов.....	62
3.1.4	Антилактоферриновая активность условно-патогенных микроорганизмов.....	64
3.2	Оценка уровней лактоферрина и АЛФА холерных вибрионов Эль Тор при инфекционном процессе <i>in vivo</i>	65
3.3	Действие различных видов стресса на антилактоферриновую активность.....	67
3.3.1	Действие кислотного стресса на антилактоферриновую активность.....	68
3.3.2	Действие комбинированного стресса на антилактоферриновую активность.....	69
Глава 4 Изучение природы антилактоферриновой активности.....		73
4.1	Исследование роли лектинов в антилактоферриновой активности	73
4.2	Роль гемагглютинин/протеазы в антилактоферриновой активности	80
4.3	Исследование генов протеаз холерных вибрионов для установления их роли в АЛФА.....	82
ГЛАВА 5 Изучение роли антилактоферриновой активности в адгезии холерных вибрионов.....		86
5.1	Изучение уровня адгезии холерных вибрионов на культурах клеток Нер-2 и NuTu 80	87
5.2	Сравнительный анализ адгезивной и антилактоферриновой активностей.....	96
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....		100
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....		101
ВЫВОДЫ.....		111
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....		113

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Продолжающаяся более 50 лет седьмая пандемия холеры в настоящее время характеризуется интенсивными проявлениями заболевания в Африке, Азии и Америке с высокой вероятностью выноса инфекции в другие страны, в том числе и в Российскую Федерацию. Основным этиологическим агентом продолжает оставаться *Vibrio cholerae El Tor*, сменивший с начала 60-х годов прошлого столетия холерный вибрион классического биовара.

Особенностью седьмой пандемии холеры является выраженная адаптивная изменчивость возбудителя в различных экологических нишах, приводящая как к генетическим перестройкам, так и к фенотипическим вариациям [107]. Длительность последней пандемии свидетельствует о том, что в процессе эволюции холерный вибрион Эль Тор приобрел (помимо повышенной патогенности) ряд свойств, способствующих длительному выживанию (персистированию) не только в окружающей среде, но и в адаптивно меняющейся среде организма человека.

Персистирование микроорганизмов, в том числе холерных вибрионов, в различных экологических нишах – одна из наиболее интересных и интенсивно разрабатываемых проблем в современной микробиологии. В литературе на протяжении последних двадцати лет обсуждается роль так называемых «факторов персистенции» в адаптации патогенных и условно-патогенных микроорганизмов к условиям окружающей среды, участии этих факторов в формировании бактерионосительства, обеспечении антагонистических эффектов в биоценозе и сохранении жизнеспособности популяции за счет приобретения его устойчивости к защитным механизмам хозяина [24]. Таким образом, экологические аспекты биологии возбудителя холеры приобретают все большее

значение при анализе эволюционных изменений одного из самых патогенных представителей микробной флоры.

В настоящее время достаточно хорошо изучен механизм персистенции у грамположительных и грамотрицательных бактерий с помощью модификации поверхностных антигенов (пептидогликана). Способность бактериальных поверхностных структур связывать сывороточные белки, в частности иммуноглобулины, - универсальный экранировочный прием микроорганизмов при их персистировании [21]. Важная роль в персистенции отводится колонизации и адгезии бактерий [76], устойчивости к антибиотикам, определяющей их «госпитальный» характер [8,129].

В последние годы продолжается широкое изучение так называемых «маркеров персистенции» - секретлируемых факторов бактерий, вызывающих деградацию системы защиты хозяина, обеспечивая им длительное переживание в его организме. Выявление секретлируемых начал у бактерий позволило сформулировать понятие «персистентный потенциал» микроорганизмов, который может быть отнесен к так называемым «малым» факторам патогенности. «Персистентный потенциал» бактерий реализует лишь их защитную функцию, тогда как агрессивные свойства в полной мере обусловлены вирулентностью. Поэтому способность к альтерации и выживанию микроорганизмов в организме хозяина (вирулентность и персистенцию) предпочтительно оценивать как отдельные аспекты их патогенности [51].

Основными маркерами секреторной персистенции являются антилизоцимная (АЛА), антикомплементарная (АКА), антиинтерфероновая (АИА), антииммуноглобулиновая активности (АИГА). Установлена роль в процессах бактериальной персистенции антикарнозиновой и антигистоновой активностей микроорганизмов [34,17,62,25,35,37,32]. У бактерий-ассоциантов с простейшими определяется антигистоновая активность, что, по мнению А.О. Плотникова с соавт. [100], может иметь определенное значение в формировании симбиотических связей в природных ассоциациях.

Опубликованы единичные работы по характеристике генов персистенции

[53, 119, 131]. У холерных вибрионов Эль Тор в составе большой хромосомы обнаружены мобильные генетические элементы – так называемые «острова пандемичности» *VSP1* и *VSP2* (*V. seventh pandemic island*), которые содержат гены, кодирующие продукцию факторов, обеспечивающих высокий уровень адаптации патогена к условиям окружающей среды (в том числе, гены персистенции *vpsR* и *mshA*, кодирующие, соответственно, продукцию холерными вибрионами экзополисахарида и синтез маннозочувствительных пилей адгезии) [12, 57]. Эти «острова пандемичности» отсутствуют у классических холерных вибрионов.

Рядом исследователей [38] было показано, что антилактоферриновая активность также может рассматриваться как фактор персистенции у ряда патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. В основе механизма действия данного фактора лежат процессы, направленные на инактивацию железосвязывающего белка - лактоферрина. Как известно, лактоферрин, являясь одним из факторов неспецифической защиты организма, обладает рядом функций, в том числе антибактериальной активностью, связывая железо и тем самым лишая его микроорганизмов, кроме того, лактоферрин препятствует микробной адгезии и колонизации. Используя механизм инактивации лактоферрина (так называемую «антилактоферриновую активность» - АЛФА) бактерии тем самым реализуют свой персистентный потенциал. И.В. Вальшева и Э.М. Вахитов [40, 43] на модели условно-патогенных микроорганизмов показали, что высокий уровень АЛФА способствует их длительному переживанию в организме человека.

Исследования в области изучения антилактоферриновой активности немногочисленны, носят фрагментарный характер, в основном, касающийся проблемы бактерионосительства, вызванного условно-патогенными микроорганизмами. Роль антилактоферриновой активности в реализации персистентного потенциала возбудителями особо опасных инфекций, в том числе холерных вибрионов, никем ранее не изучена. Вопросы, касающиеся роли АЛФА в патогенезе холеры (помимо борьбы за железо), участия этого маркера

персистенции в адгезии и колонизации в желудочно-кишечном тракте, выяснении диапазона активности данного признака в различных биотопах (организме человека и объектах окружающей среды), установлении наличия или отсутствия корреляции АЛФА с другими признаками патогенности и персистенции, выяснении механизма действия антилактоферриновой активности остаются до настоящего времени малоизученными. Все вышеизложенное дает основание говорить об актуальности исследований, касающихся роли антилактоферриновой активности в патогенезе холеры и в реализации персистентного потенциала холерных вибрионов. Решению этих вопросов и посвящена данная диссертационная работа.

Цель исследования: Изучить антилактоферриновую активность холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, дать оценку роли этого фактора в патогенезе холеры и персистенции холерных вибрионов, сформулировать представление о механизме антилактоферриновой активности у возбудителя холеры.

Задачи исследования:

1. Адаптировать методику изучения антилактоферриновой активности у условно-патогенных микроорганизмов для исследования штаммов холерных вибрионов.
2. Изучить *in vitro* и *in vivo* антилактоферриновую активность холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп. Сравнить АЛФА холерных вибрионов, различающихся по источнику выделения и эпидемической значимости.
3. Определить наличие корреляционных связей между АЛФА и другими свойствами, обуславливающими персистенцию холерных вибрионов.
4. Изучить влияние различных углеводов на антилактоферриновую активность вибрионов.
5. Определить участие гемагглютинин/протеазы (НА/Р) холерных вибрионов в АЛФА.
6. Разработать метод определения уровня адгезии у холерных вибрионов на культуре клеток Нер-2 и NuTu 80. Определить наличие коррелятивных связей между уровнем адгезии и АЛФА.

7. Изучить влияние различных видов стресса на антилактоферриновую активность.
8. С помощью генетического анализа определить возможность участия других (кроме НА/Р) протеаз в антилактоферриновой активности холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп.

Научная новизна и теоретическая значимость работы:

- Впервые показано наличие антилактоферриновой активности у холерных вибрионов различных биоваров и серогрупп. Выявлены достоверные различия в уровнях АЛФА у *Vibrio cholerae El Tor*, *Vibrio cholerae O139* и *Vibrio cholerae classical*. Наиболее высокие показатели отмечены в группе Эль Тор вибрионов, несколько ниже – у вибрионов O139 серогруппы, обладающих защитной капсулой; холерные вибрионы классического биовара в большинстве своем или не обладают АЛФА, или демонстрируют очень слабую активность. Это свидетельствует о значении этого признака именно для возбудителей холеры, характеризующихся высоким персистентным потенциалом, сформировавшимся в предпандемичный период и в период седьмой пандемии холеры.
- При комплексной оценке антилактоферриновой активности у эпидемически значимых штаммов (*ctxAB⁺tcpA⁺*) вибрионов Эль Тор, выделенных от людей (больных, вибрионосителей), зарегистрированы высокие показатели АЛФА, что косвенно указывает на роль антилактоферриновой активности в патогенезе холеры, возможно, в роли «малых факторов» патогенности.
- Впервые показано, что потенциально эпидемически опасные вибрионы ЭльТор, с генотипом *ctxAB⁻tcpA⁺* (лишенные способности продуцировать холерный токсин, но сохранившие или приобретшие гены токсинкорегулируемых пилей адгезии) обладают максимально выраженной способностью к продукции антилактоферринового фактора, что свидетельствует о значительной роли этого признака в персистенции этой группы вибрионов.
- Впервые установлено наличие прямой корреляционной связи АЛФА с признаками персистенции, характерными для холерных вибрионов Эль Тор, выделенных от людей (антикомплементарной активностью и

билирезистентностью). С признаками персистенции, характерными для вибрионов, изолированных из объектов окружающей среды (антилизоцимная и РНК-азная активности), корреляция практически отсутствовала или была слабой. Это доказывает, что антилактоферриновая активность может рассматриваться как новый признак в составе «персистентного потенциала» холерных вибрионов.

- Получены новые сведения о механизме действия антилактоферриновой активности. Впервые доказано участие в механизме АЛФА углеводных лектиновых рецепторов, как связующего звена между лактоферрином и клетками холерного вибриона. Показано участие в процессе АЛФА гемагглютинин/протеазы.

- Отработан метод оценки уровня адгезии холерных вибрионов на модели культур клеток аденакарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu 80. Подобраны критерии оценки уровня адгезии штаммов холерных вибрионов. Методика согласована с комиссией по контролю соблюдения требований биологической безопасности (протокол №13 от 10 декабря 2014 г.). Материалы направлены в Федеральную службу по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам для получения патента на изобретение. Справка о приоритете № 2014149782 от 9.12.2014 г.

- Впервые на модели клеточной линии аденакарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu 80 дана количественная оценка адгезивной активности холерных вибрионов и доказана ее прямая коррелятивная связь с АЛФА.

- С помощью анализа наличия генов протеаз у исследуемых штаммов холерных вибрионов было установлено, что основная роль в расщеплении лактоферрина принадлежит НА/Р.

Научно-практическая ценность работы:

- В Государственной коллекции патогенных бактерий (ГКПБ) ФКУЗ Российский-научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора депонирован авторский штамм *Vibrio cholerae* P-18775 O1 серогруппы биовара Эль Тор, обладающий высокой антикомплементарной и

антилактоферриновой активностью (штамму присвоен номер *Vibrio cholerae* КМ275 Государственной коллекции патогенных бактерий).

- По материалам работы оформлен раздел в методических рекомендациях «Методики создания условий стресса для холерных вибрионов при изучении персистентного потенциала возбудителя холеры», которые рассмотрены на заседании Ученого Совета ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора 04.12.2014г. протокол №12 от 04.12.2014г, утверждены директором института.

- По материалам работы оформлен раздел в методических рекомендациях по изучению свойств, обуславливающих персистенцию холерных вибрионов, которые рассмотрены на заседании Ученого Совета ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора 20.11.2009г., протокол №10 от 20.11.2009г., утверждены директором института. В методических рекомендациях приведены методики, позволяющие изучать персистентные свойства холерных вибрионов с использованием методических приемов, адекватных, с точки зрения требований биологической безопасности, при работе с микроорганизмами II группы патогенности.

- Результаты исследований по определению уровня адгезии используются в Ростовском Государственном Медицинском Университете на кафедре микробиологии при чтении лекций, проведении практических занятий (акт о внедрении от 7.10.2015 г.).

- Модифицирована методика определения антилактоферриновой активности холерных вибрионов, которая согласована с комиссией по контролю соблюдения требований биологической безопасности (протокол №13 от 10 декабря 2014г).

Положения, выносимые на защиту:

1. Используемая методика анализа холерных вибрионов по антилактоферриновой активности позволяет количественно оценивать АЛФА у штаммов, различающихся по источнику выделения, эпидемической значимости, биовару и серогруппе.

2. Анализ антилактоферриновой активности холерных вибрионов дает возможность выявить наличие прямой корреляционной связи с факторами персистенции, присущими штаммам, выделенным от больных и вибрионосителей (антикомплементарной активностью и билирезистентностью), и отсутствие или наличие очень слабой связи, характерной для штаммов, персистирующих в воде открытых водоемов (антилизоцимной и РНК-азной активностью).

3. Сравнительная оценка антилактоферриновой активности холерных вибрионов позволяет отнести АЛФА к числу признаков, составляющих «персистентный потенциал» возбудителя холеры.

4. В механизме антилактоферриновой активности принимают участие углеводные лектиновые рецепторы как связующее лактоферрин звено и гемагглютинин/протеаза как фактор, расщепляющий этот белок.

5. Разработанный метод количественной оценки адгезивной активности на модели клеточной линии аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека NuTu 80 позволяет определить уровень этой активности и дать заключение о наличии прямой коррелятивной связи между АЛФА и способностью к адгезии у холерных вибрионов Эль Тор, различающихся по эпидемической значимости и источнику выделения.

6. Анализ «потенциально эпидемически опасных» вибрионов Эль Тор, характеризующихся генотипом *ctxAB⁻tcpA⁺*, показывает, что именно эта группа штаммов обладает наиболее выраженным персистентным потенциалом, по сравнению с эпидемически опасными и эпидемически не опасными штаммами, максимально высокими показателями адгезивной и антилактоферриновой активностей.

Апробация работы:

Результаты исследований были представлены на научных конференциях:

1. Конференция молодых ученых ФКУЗ Рост НИПЧИ Ростов-на-Дону, 2010 г.

2. Проблемная комиссия «Холера и патогенные для человека вибрионы». Ростов-на-Дону, 2010 г.
3. Проблемная комиссия «Холера и патогенные для человека вибрионы». Ростов-на-Дону, 2011 г.
4. Материалы III научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. Оболенск, 2011 г.
5. 18 Российская Гастроэнтерологическая неделя, 2012г.
6. Проблемная комиссия «Холера и патогенные для человека вибрионы». Ростов-на-Дону, 2012 г.
7. Проблемная комиссия «Холера и патогенные для человека вибрионы». Ростов-на-Дону, 2013 г.
8. 19 Российская Гастроэнтерологическая неделя, 2013 г.
9. Юбилейная 20 объединенная Российская Гастроэнтерологическая неделя, 2014г.
10. Проблемная комиссия «Холера и патогенные для человека вибрионы». Ростов-на-Дону, 2014 г.
11. Конференция молодых ученых ФКУЗ РостНИПЧИ Ростов-на-Дону, 2015.
12. 21 Российская Гастроэнтерологическая неделя, 2015 г.
13. Проблемная комиссия «Холера и патогенные для человека вибрионы». Ростов-на-Дону, 2015 г.
14. Диссертационная работа выполнена в рамках двух тем № 097-4-07 «Свойства, обуславливающие персистенцию холерных вибрионов» и № 151-4-12 «Влияние стрессорных воздействий на свойства, обуславливающие персистенцию холерных вибрионов в организме человека и объектах окружающей среды».

Личный вклад соискателя

Личный вклад соискателя состоит в участии в постановке всех исследовательских задач, подготовке и проведении экспериментальных работ, активном участии в обработке, обсуждении и интерпретации всех полученных

результатов, в подготовке публикаций, депонировании тест-штамма, оформлении патента на изобретение.

Публикация результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 14 научных работ, 6 из них в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденных ВАК; 12 с первым авторством.

Депонирован штамм *V.cholerae P-18775* – тест-штамм КМ 275 для оценки продукции антилактоферринового и антикомплементарного факторов холерными вибрионами.

План диссертационной работы утвержден на заседании Ученого совета ФКУЗ Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора (протокол № 15 от 17.12.2014 г).

Структура диссертации

Работа изложена на 144 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы. Библиография включает 273 источников, в том числе зарубежных – 141. Диссертация иллюстрирована 17 рисунками и 22 таблицами.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Роль лактоферрина в защите макроорганизма против возбудителей инфекционных болезней

Лактоферрин (от лат. *lactis* - молоко и *ferrum* - железо) - железосвязывающий белок, являющийся одним из факторов неспецифической защиты организма, маркером острофазовых реакций и активности воспалительного процесса. С момента идентификации лактоферрина (Лф) как "красного" белка в составе коровьего молока в 1939 году и его выделения в 1960 году из человеческого молока [215], этот белок вызывает повышенный интерес исследователей, а изучение ЛФ представляется исключительно актуальным и в настоящее время [63].

Лактоферрин относится к семейству трансферринов - гликопротеинов, связывающих и переносящих ионы железа Fe^{3+} [63,139,213,214]. Лактоферрины различных видов млекопитающих имеют высокую степень гомологии по первичной структуре (до 60—70%) [265].

Он имеет структурное сходство с сывороточным трансферрином и обладает такими же свойствами связывания железа, но более эффективно связывает трехвалентное железо при низком рН [144].

Лактоферрин - белок с молекулярной массой 76-83 кДа, образован одной полипептидной цепью, 673 аминокислотных остатка, которая, согласно данным рентгеноструктурного анализа, образует два гомологичных домена, называемых N- и С-долями, соединенных - спиралью (рисунок 1). Каждый из этих фрагментов, в свою очередь, состоит из двух доменов: N1, N2 и С1, С2, соответственно, формирующих карман, где ион железа (Fe^{3+}) связан с шестью лигандами: два остатка *Tyr* (тирозин), один *His* (гистидин), один *Asp* (аспарагин) и две жесткие связи с (би)карбонатными ионами [240,234]. Каждая доля

содержит по одному железосвязывающему центру и обратимо связывает один ион железа [146, 145].

Интересно, что структуры железонасыщенного и железоненасыщенного лактоферрина различны, причем, как видно из рисунка 1, эти различия касаются в основном N-доли. Для апо- ЛФ характерна открытая конформация N-доли, в которой угол между N1- и N2-доменами составляет 53 градуса и закрытая конформация C-доли. В Fe-ЛФ обе доли имеют закрытую конформацию [146, 235].

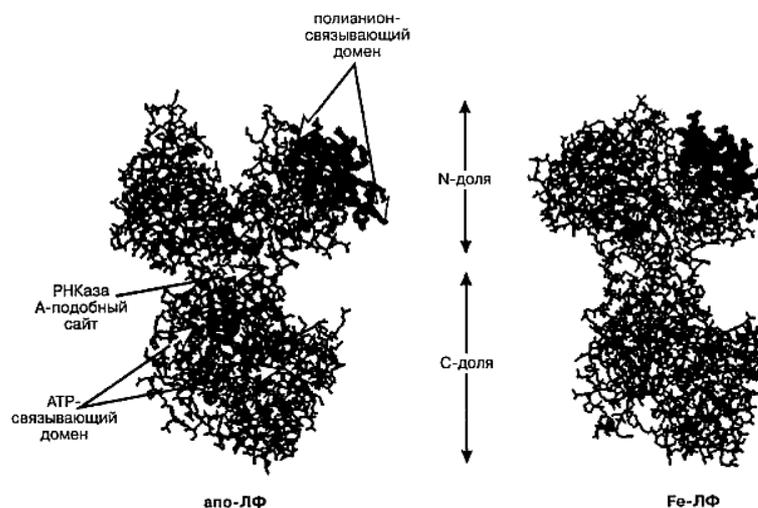


Рисунок 1 - Пространственная организация апо- и Fe-лактоферрина [63]

Лактоферрин содержит два сайта потенциального гликозилирования [112, 16], однако степень гликозилирования белка может быть разной (именно поэтому его молекулярная масса может варьировать). Тем не менее, тип гликозидных остатков, которые могут входить в состав Лф, уже охарактеризован Р.М. VanBerkel и А. Nakansson [254, 188] показали, что высокая устойчивость ЛФ к деградации (различные протеазы, пониженные значения рН) обусловлена высокой степенью гликозилирования белка. Лактоферрин содержит 3% гексоз, 1% гексозамина и особенно богат маннозой [63].

Сродство Лф к ионам железа чрезвычайно высоко ($K_d = 1 \text{ нМ}$) [63]. Связывание каждого иона железа приводит к одновременной фиксации иона

бикарбоната, которая тем самым компенсирует положительный (3^+) заряд иона железа [146]. Кроме железа лактоферрин может связывать значительное количество непрочно связанных ионов цинка или меди [203]. Этот белок участвует не только в транспорте ионов железа, цинка и меди, но и в регуляции их всасывания [167].

Лактоферрин экспрессируется эпителиальными клетками внутренних желез с последующей секрецией белка в слизистую и другие биологические жидкости [210]. Этот белок синтезируется в апоформе (без железа) и присутствует в большинстве биологических жидкостей. Так, лактоферрин все время присутствует на поверхности слизистого эпителия, проявляя антимикробную активность, тогда как его секреция в кровь или ткани происходят в ответ на воспаление [201].

В зависимости от тяжести заболевания наблюдаются различия в содержании лактоферрина в сыворотке крови больных (так, например, у больных с диспластическим коксартрозом концентрация лактоферрина в 2,5 раза превышала физиологическую норму). Установлена сходная динамика изменения концентрации лактоферрина в сыворотке крови у больных с дисплазией тазобедренного сустава и диспластическим коксартрозом в послеоперационном периоде. Происходило повышение концентрации лактоферрина на 14 сутки и нормализация к концу сроков исследования. Эти показатели могут быть использованы в качестве дополнительного критерия для диагностики и иметь прогностическое значение в оценке эффективности проводимого лечения [97], а также иметь важное клиническое значение для оценки активности патологического процесса и прогноза заболевания на ранних стадиях [50]. Кроме того увеличение концентрации белка может свидетельствовать о развитии воспалительного процесса [84].

Высокая экспрессия и секреция лактоферрина в молоко и, особенно, в слизистую пищеварительного тракта определяется тем, что этот белок отвечает за первичную защиту организма [201].

В сыворотке крови других внеклеточных средах внутри тела лактоферрин обычно присутствует в сравнительно небольших концентрациях (0,18-1,5 мкг/мл) за исключением участков воспаления, но обнаруживается в высоких концентрациях в слезах (1-3 мг/мл), молоке (до 5 г/мл), бронхиальных секретах (11,5% тотального белка), в слюне у практически здоровых людей, концентрация лактоферрина составляет 1,01 мкг/мл [113, 132, 210, 195, 197, 189, 203].

По литературным данным известно, что лактоферрин слюны может являться маркером развития кариеса [86]. Кроме того, в последнее время очень актуальным стало определение уровня лактоферрина в ротовой жидкости пациентов с герпесвирусной инфекцией [7] для оценки состояния секреторного иммунитета полости рта. Помимо этого, в ходе исследований было показано, что уровень лактоферрина слюны может быть достоверным прогностическим признаком развития деструктивных осложнений при санации полости рта у больных, которым проводится лучевая терапия [60].

В кровеносной системе Лф синтезируется в созревающих нейтрофилах на миелоцитарной стадии созревания этих клеток и накапливается во вторичных гранулах этих же клеток [63, 211, 143, 187, 198, 239, 227, 151, 6, 99, 55, 147, 160].

Регуляция экспрессии лактоферрина различается в различных тканях по большей частью конститутивной экспрессией в эпителиальных клетках желез на большинстве слизистых поверхностей, в то время как ткань молочной железы и матки подвергаются гормональной регуляции [245, 236].

Показано, что в организме человека ЛФ взаимодействует со специфическими клеточными рецепторами, локализованными на мембранах эпителиальных и иммунных клеток [127, 263]. Разнообразие типов клеточных рецепторов, которые специфически связываются с ЛФ человека, а также то, что для этих рецепторов известны и другие, не специфические лиганды, затрудняют дифференцирование специфической активности, которую проявляет собственно молекула Лф человека [16].

Лактоферрин уникален своей исключительной полифункциональностью (рисунок 2).



Рисунок - 2 Многофункциональность лактоферрина

Основной особенностью Лф, определяющей спектр его многочисленных функций является его способность специфически связывать ионы железа и некоторых других металлов. Функции, в основе которых лежит комплексообразующая способность лактоферрина – детоксицирующая, транспортная, антимикробная.

Неполный список свойств лактоферрина включает в себя антибактериальные, антивирусные, антиканцерные, антиоксидантные активности, регуляцию роста и дифференциацию клеток, экспериментально установлено, что Лф усиливает рост эпителиальных клеток и, возможно, способствует созреванию кишечника у новорожденных [177], противовоспалительные и иммуномодуляционные характеристики, известно, что при воспалении Лф активно высвобождается из гранул активированных нейтрофилов [77, 196, 203, 263, 156, 272, 176, 200, 223, 199, 182].

Широкий спектр иммуномодулирующих свойств Лф обусловлен активацией НК-клеток, лимфокинов — активирующих киллерных клеток [251] и макрофагов [181].

На поверхности клеток, чувствительных к действию Лф, находятся рецепторы Лф, взаимодействие с которыми определяет иммуномодулирующие и другие эффекты Лф на функции клеток [133, 184]. Предполагается, что уменьшение случаев заболевания легочной инфекцией и онкологическими заболеваниями у детей при грудном вскармливании объясняется активацией Лф иммунной системы детей [185, 205]. Особый интерес в настоящее время представляет возможности использования лактоферрина человека в педиатрической практике [15]. Проводятся исследования по возможности использования лактоферрина как добавки в детские смеси [172].

Открыта его протеолитическая [190] и рибонуклеазная [63] активности, способность ингибировать образование бактериальной пленки [232] и обуславливать активацию роста костных клеток [164], стимулировать рост остеобластов и тормозить рост остеокластов [165], предотвращать остеопороз [261].

Не менее актуальным современным направлением в медицине, является разработка средств борьбы с биопленками лактоферрином. Результатом таких исследований явилось использование комплексного человеческого Лф (чЛф) препарата «Лапрот» и антибактериального препарата ципрофлоксацина на рост и образование биопленки. Комбинация антибиотика в сниженных по сравнению с обычно применяемыми дозами в сочетании с Лф может оказаться эффективной альтернативой при лечении иммунодефицитных больных с целью предотвращения возникновения у них очагов хронической инфекции, связанных со способностью возбудителя формировать биопленки [2].

Обнаружено, что Лф и его производные подавляют развитие опухолей и метастазов у экспериментальных животных [179, 250].

Ряд физиологических эффектов, которые проявляет Лф, включает в себя взаимодействие этого белка с другими клеточными компонентами. Это относится к бактериальным липополисахаридам (ЛПС) [138, 171], глюкозаминогликанам [208] и специфическим клеточным рецепторам, которые локализованы на мембранах эпителиальных и иммунных клеток [148, 263, 155,

241]. Разнообразие типов клеточных рецепторов, которые связываются с Лф, а также то, что для этих рецепторов известны другие лиганды затрудняют дифференцирование специфической активности, которую проявляет только молекула Лф, как индивидуальный рецептор-связывающий агент.

Лактоферрин проявляет много биологических функций, относящихся к защитной системе организма. Антибактериальная активность для этого белка была установлена одной из первых.

Лактоферрин подавляет рост многих патогенных и условно - патогенных микроорганизмов. Перечень чувствительных организмов включает Грам-отрицательные и Грам-положительные микробы, (палочки и кокки), факультативные анаэробы и аэротолерантные анаэробы (*E.coli*, *S.typhimurium*, *S.dysenteriae*, *L.monocytogenes*, *V.cholerae*, *H.influenzae*, *L.pneumophila*, *K.pneumophila*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *Enterococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*) [140,138,157, 264,137, 224, 238].

В настоящее время доказано, что лактоферрин может оказывать на микрофлору как бактериостатическое, так и бактерицидное действие.

Бактериостатическая активность Лф связана с высокой аффинностью к железу, а также с тем, что Лф синтезируется и секретируется преимущественно в свободной от металла форме (апоформе), что приводит к активному связыванию этим белком, действующим как хеллатор, свободных ионов железа из окружающей среды, что замедляет рост микроорганизмов [44, 158,157, 228, 203, 173].

Результаты опытов J.J. Bullen [158], проведенные *in vitro*, получили подтверждение в экспериментах с лабораторными животными на модели заражения морских свинок патогенным штаммом *E.coli* 0111. Прямое доказательство антибактериальной активности лактоферрина было получено в опытах, когда пероральное введение этого белка приводило к подавлению бактериальной инфекции пищеварительной системы, при этом развитие полезных для организма микроорганизмов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* стимулировалось лактоферрином.

Поскольку все бактерии нуждаются в железе для своего развития, существует строгая корреляция между доступностью ионов железа и вирулентностью микроорганизма. В слизистой кишечника и легких, где находится первичная линия защиты организмов против микрофлоры, низкий уровень железа определяет ингибирование роста патогенов. В случае высокой концентрации железа из-за какой-либо патологии в организме бактериальная вирулентность резко возрастает [139].

Вместе с тем в основе антиинфекционной активности лактоферрина могут лежать и другие механизмы, не зависящие от способности белка связывать ионы железа, например стимулирующее действие лактоферрина на фагоцитоз и влияние на активность комплемента [271].

Другой механизм — специфический — обуславливает прямое бактерицидное действие. Белок вызывает быструю потерю жизнеспособности ряда микроорганизмов, которая не может быть восстановлена введением экзогенного железа в среду роста [161, 177, 209].

Бактерицидные свойства лактоферрина определяются его прямым взаимодействием с поверхностью микроорганизмов. Молекулярный механизм бактерицидной активности лактоферрина для Грам-отрицательных и Грам-положительных микроорганизмов сходен и в обоих случаях вызывает разрушение бактериальной мембраны [262]. При этом данное свойство Лф проявляется и в отношении антибиотикостойчивых патогенов [192, 173].

Эксперименты демонстрируют, что наиболее важен контакт Лф непосредственно с бактерией с последующей сорбцией на мембране микроорганизма, которое приводит к гибели клеток бактерий [220].

Отсутствие узкой специфичности указывает на общую природу атакуемой молекулы бактериальной мембраны и первым кандидатом такой атаки считают мембранные фосфолипиды [259]. Уже известно, что лактоферрины взаимодействуют с поверхностью различных бактерий и с мембранами клеток хозяина через глюкозаминогликаны [268], гепаран сульфат [238].

Установлено, что лактоферрин связывается с, так называемыми, поринами, которые находятся на внешней мембране микроорганизмов [180], и индуцируют быстрое освобождение липополисахаридов (ЛПС). Это приводит к повышенной осмочувствительности клетки микроорганизма, ее доступности к лизоциму и другим антибактериальным факторам, и, как следствие, гибели бактерий [202]. Имеются данные [171] о связывании лактоферрина с липидной областью ЛПС. Кроме того, показано, что лактоферрин связывается с ЛПС бактериальных клеток, и входящая в состав белка окисленная форма железа инициирует их перекисное окисление [173].

Молекулярный механизм действия Лф на Грам-положительные микроорганизмы, видимо, похож на действие других катионных антибактериальных пептидов. Такие пептиды взаимодействуют с клеточной стенкой по ионному механизму, связываясь с отрицательно заряженным липидным матриксом, и разрушает неполярный слой мембраны в результате гидрофобных взаимодействий [183, 266].

Показано, что лактоферрин обладает выраженной противовирусной активностью против широкого спектра вирусов человека и животных с ДНК и РНК геномами. На данный момент показано действие белка против вирусов простого герпеса 1 и 2, цитомегаловируса, ВИЧ, вируса гепатита С, хантавирусов, ротавирусов, полиовирусов первого типа, аденовирусов, респираторного синцитиального вируса, мышинового вируса лейкоза Френда [178, 225, 257, 141, 219, 142].

В отличие от противовирусного и антибактериального действия лактоферрина, о противогрибковом механизме действия белка известно мало. Показано, что антигрибковая активность лактоферрина обеспечивается разрушением клеточной стенки и связыванием белка с плазматической мембраной *C. albicans*. Действие лактоферрина на *C. albicans in vitro* приводит к изменению мембранного потенциала и закислению цитоплазмы клеток *Candida*, что говорит о прямом или косвенном взаимодействии лактоферрина с плазматической мембраной [258].

Дополнительно к антибактериальным свойствам лактоферрина установлена способность этого белка, модулировать подвижность и колонизацию патогенных микроорганизмов. Этот белок ингибирует адгезию бактерий путем взаимодействия с клеточной стенкой микроорганизма J.Qiu., D. R. Hendrixson и M. T. Massucci [226, 190, 212] показали, что Лф гидролизует микробный фактор адгезии Nap, причем ЛФ в этом случае функционирует, как сериновая протеаза с активным центром, который располагается в N-концевой доле белка. Только 10% молекул ЛФ обладают протеиназной активностью [137, 212]. По данным литературы активный протеиназный центр молекулы Лф до сих пор не идентифицирован.

E.J. Dial и L.M. Lichtenberger [168] показали ингибирование колонизации в желудке *Helicobacter felix* путем связывания бактериальных адгезинов с олигоманнозными антеннами белка Лф.

Оригинальные исследования, выполненные на модели *Pseudomonas aeruginosa*, продемонстрировали, что комплексообразование Лф со свободным железом приводит к эффективному подавлению формирования бактериальной биопленки [233]. Экспериментально показано, что белок Лф ингибирует формирование биопленки, стимулируя особый тип движения микроворсинок на поверхности клеток *P. aeruginosa*, который не позволяет бактериям прикрепиться к поверхности клеток хозяина и сформировать микроколонии. Надо отметить, что антибиопленочная активность Лф проявляется при крайне низкой концентрации Лф (0,02 мг/мл), то есть в пять раз меньше, чем это требуется для прямого ингибирования роста бактерий Лф.

Показано, что лактоферрин относительно устойчив к протеолизу в пищеварительном тракте, а в тонком кишечнике были идентифицированы специфические Лф-рецепторы, локализованные на поверхности энтероцитов [191, 242, 193]. Известно, что рецепторы играют важную роль в интернализации лактоферрина, но механизм до сих пор не ясен [193].

Трипсин и химотрипсин почти не разлагают этот белок, особенно в железо-насыщенной форме. Однако, Лф подвержен действию пепсина, в

результате чего протеолиз этого белка приводит к образованию больших фрагментов, которые, так же как и небольшие количества неизмененного Лф, можно обнаружить в стуле младенцев, находящихся на грудном вскармливании [166].

Экспериментально показано, что бычий Лф (Лфб), пройдя через ЖКТ у взрослых людей, в больших количествах сохранялся неизменным, в то время как рекомбинантный Лф человека переваривался полностью [249].

При воздействии на Лф пепсина образуются фрагменты, называемые лактоферрицинами (Лф-цины) или лактоферрампинами (Лф-пины), [248, 260], известно, что и те и другие обладают антимикробной активностью [233]. Лф-цины представляет собой небольшие катионные антимикробные пептиды, состоящие из 49 N-концевых аминокислот.

Полагают, что Лф-цины крупного рогатого скота могут проявлять большую антимикробную активность, чем Лф-цины человека, поскольку они образуют в растворе β -складчатую структуру с несколькими гидрофобными остатками на одной стороне. При этом положительно заряженные остатки обеспечивают контакт с целевой клеткой, гидрофобные остатки взаимодействуют с ее мембраной. Лф-цины человека образуют извитую структуру без упорядоченного расположения гидрофобных остатков, возможно, поэтому они проявляют более слабую антимикробную активность [256].

Хотя есть данные о том, что Лф-цин обладает более выраженным антибактериальным действием по сравнению с Лф [59]. Недавно был обнаружен другой катионный фрагмент Лф, (лактоферрампин), проявляющий даже более выраженные антибактериальные и антифунгицидные свойства, чем нативный Лф [16].

Хорошо изучены две молекулы Лф-цина, которые получают из человеческого (чЛф-цина) и коровьего (кЛф-цина) лактоферрина. Первичная структура кЛф-цина хорошо изучена и представлена 25 аминокислотными остатками, что соответствует 17–41 остатку нативного кЛф. Проведенные опыты, показали, что добавление Лф и Лф-цина в кисломолочные продукты

может увеличить срок годности готового продукта без внесения синтетических консервантов [58].

Кроме этого, весьма перспективным является направление создания биологически активной добавки, в состав которой входят пробиотические бактерии и лактоферрин [105]. Добавка будет способствовать оздоровлению населения, а ее применение в технологии молочных продуктов позволит обогатить их функциональными компонентами и расширить линейку продуктов здорового питания [163].

На современном этапе большое внимание в качестве профилактических и терапевтических средств уделяется природным соединениям, выполняющим защитную функцию в организме. Перспективны в этом отношении полифункциональные сывороточные белки молока, участвующие в поддержании гомеостаза желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Значимая роль здесь отводится лактоферрину α -лактальбумину (α -ЛА) [72]. Препараты гидролизатных комплексов Лф α и -ЛА можно рассматривать в качестве активной основы при разработке новых природных профилактических средств антидизбактериозной направленности [107].

Помимо этого, актуальными считаются исследования по изучению действия рекомбинантной формы компонента грудного молока – лактоферрина, полученного из молока коз-продуцентов (неолактоферрин) на рост перививаемых опухолей. Инновационный продукт «Неолактоферрин» представляет собой естественную комбинацию рекомбинантного лактоферрина человека (90%) и лактоферрина козы (10%), выделенных из молока коз-продуцентов, несущих в геноме полноразмерный ген лактоферрина человека [127].

К настоящему времени рчЛф получен в разных странах при помощи современных биотехнологических методов, а также растений [163,207], микроскопических грибов [135] и животных [255, 273] в качестве продуцентов.

В Российской Федерации в рамках Программы союзного государства (Россия–Белоруссия) рчЛф получен в составе козьего молока [185]. По физико-

химическим параметрам и биологической активности рчЛф соответствует природному чЛф [112]. Проведенные исследования показали, что препарат «Неолактоферрин» обладает иммуотропной активностью, его действие в определенной степени направлено на сдерживание иммунных процессов или их развитие по Th2-зависимому пути [127].

В работе В.А. Коблякова с соавторами [69] проведенные эксперименты показали, что «Неолактоферрин» тормозит скорость роста перевиваемой опухоли рака шейки матки мышей РШМ -5 и время появления первых опухолевых узелков у мышей. Наблюдались отдельные случаи полного рассасывания опухоли в группах животных, получавших препарат.

Помимо этого есть другие работы, в которых авторы указывают, что человеческий лактоферрин, полученный из молока трансгенных коз, оказывал слабое противоопухолевое действие у мышей при карциноме Эрлиха и гепатоме 22а [118].

Все вышесказанное характеризует лактоферрин как защитный фактор макроорганизма против микробных и вирусных инфекций и позволяет определить его не только как ключевой компонент первичной защитной системы организма, но и как многофункциональный регуляторный фактор, который взаимодействует и влияет на микробные, вирусные или клеточные компоненты, вовлеченные в процесс инфекции.

1.2 Антилактоферриновая активность как фактор персистенции микроорганизмов

Изучение персистенции микроорганизмов является в настоящее время одним из актуальных аспектов современной биологии, т.к. продолжающаяся эволюция патогенных микроорганизмов, в частности холерных вибрионов, напрямую связана с процессами совершенствования механизмов их адаптации в организме человека и объектах окружающей среды [11, 106,79]. Как известно, персистенция (от лат. *persistere* – оставаться, упорствовать) - длительное переживание возбудителя в организме хозяина и во внешней среде.

Широкое изучение так называемых «маркеров персистенции» - секретлируемых факторов бактерий, вызывающих деградацию системы защиты хозяина, обеспечивая микробам, длительное выживание в его организме, началось более тридцати лет назад благодаря работам О.В. Бухарина и его школы [19,20,21,23, 30,29,25, 51].

Было установлено, что бактерии способны ингибировать факторы естественной резистентности организма хозяина, и показано, что этот дистанционный механизм бактериальной иммуносупрессии хозяина способствует длительному выживанию (персистированию) патогенных и условно-патогенных бактерий в макроорганизме [22].

В персистировании микроорганизмов имеет важное значение их индифферентность к воздействующим внешним факторам физико-химической природы, обеспечение стабильных антагонистических эффектов в биоценозе с сохранением жизнеспособности популяции за счет приобретения устойчивости к защитным механизмам хозяина [28].

Все вышесказанное относится и к холерным вибрионам. Установлено, что смена экологической ниши сопровождается появлением новых или модифицированных биологических свойств, которые облегчают персистенцию холерных вибрионов в измененных условиях существования [78, 57].

Выявление многочисленных «маркеров персистенции» у бактерий позволило исследователям сформулировать понятие «персистентный потенциал». «Персистентный потенциал» – та сумма свойств микроорганизмов, которые обуславливают их переживание (адаптацию) как в макроорганизме, так и в объектах окружающей среды [24, 126,124, 122, 10, 101,110].

Персистентный потенциал микроорганизмов имеет важное патогенетическое значение в инфекционном процессе и может быть использован в медицинской практике, в диагностике заболеваний, определении их исхода и определении бактерионосительства [96,40, 38].

Основными маркерами секреторной персистенции являются антилизозимная (АЛ), антикомплементарная (АКА), антиинтерфероновая

(АИА), антииммуноглобулиновая активности (АИГА). Установлена роль в процессах бактериальной персистенции антикарнозиновой и антигистоновой активностей микроорганизмов [34,26,27,17,62,25,35,89,37,33,32].

Указанные факторы достаточно подробно изучены, доказана их роль в инфекционном процессе, обозначены пути снижения персистентного потенциала патогенных микроорганизмов [68, 1, 95, 93,128, 66,67,103,104,4,18, 31,120,125,123, 9].

Открытие антилактоферриновой активности (АЛФА) как фактора персистенции микроорганизмов, специфически инактивирующего лактоферрин, произошло сравнительно недавно [114]. В основе механизма действия АЛФА лежат процессы, направленные на инактивацию лактоферрина (Лф) микроорганизмом.

Еще в 90-е годы прошлого столетия были получены доказательства того, что нативная молекула лактоферрина может быть атакована бактериальными и животными протеолитическими ферментами, тем самым проявляя антилактоферриновую активность [150,154]. В работе С.Тома [247] также указывалось на роль протеаз в деградации лактоферрина у холерных вибрионов не O1 серогруппы.

Рядом зарубежных исследователей было установлено, что, преодолевая бактерицидный и бактериостатический эффект лактоферрина, патогены могут решать проблему дефицита железа двумя путями, – синтезируя собственные хелатирующие металл биомолекулы или отбирая железо непосредственно у трансферрина и/или лактоферрина [253].

В первом случае бактерия синтезирует и секретирует небольшие молекулы, которые образуют комплексы с железом (их называют сидерофоры) [229]. Сидерофоры можно отнести к вирулентным бактериальным факторам – особо активные патогенные штаммы обладают именно такой системой обеспечения себя железом [153].

Для *V.cholerae* также характерна абсолютная необходимость в железе, вибрионы приобретают железо в организме человека, а также в разных природных нишах [269].

Во втором случае патогены могут получать железо непосредственно от лактоферрина или трансферрина [153, 136, 238]. Такой механизм получения железа присутствует у высоко адаптированных бактерий и определяется связыванием белковой молекулы лактоферрина или трансферрина, содержащей железо, с поверхностными рецепторами микроорганизма [186]. Эти рецепторы называют Лф-связывающие белки LbpA и LbpB [204, 222]. Предполагается, что при взаимодействии Лф с рецептором LbpA происходят конформационные изменения этого полипептида, что приводит к ослаблению связи белка с железом в С-концевой части белка [170].

A.J. Beddek и A.B. Schryvers [149] показали, что у Грам-негативных бактерий существуют поверхностные рецепторы, способные специфически связывать лактоферрин в организме хозяина и экстрагировать железо из лактоферрина в качестве источника железа для размножения.

Таким образом, было показано, что при взаимодействии с лактоферрином у ряда патогенных и условно-патогенных микроорганизмов имеются механизмы, позволяющие им, с одной стороны, избегать бактерицидного и бактериостатического действия этого пептида на популяцию возбудителя, с другой – обеспечивать себя железом, без которого жизнедеятельность микробных клеток невозможна.

У нас в стране исследование антилактоферриновой активности, как маркера персистенции, проводилось, в основном, в институте клеточного и внутриклеточного симбиоза УрОРАН (г. Оренбург) в лаборатории О.В.Бухарина.

И.В. Вальшевой [39], О.В. Бухариным [30], О.А. Капустиной и А.Ю. Гаранкиной [64] было показано, что антилактоферриновая активность является широко распространенным признаком микроорганизмов разных видов, выделенных из различных биотопов человека. Данный признак встречается у

стафилококков, сальмонелл, кишечных палочек, стрептококков, грибов рода *Candida*, клебсиелл, нейсерий [39,40, 48, 130, 70].

Наиболее высокие значения АЛФА регистрировали у микроорганизмов, изолированных из репродуктивного тракта женщин. Авторы предполагают, что высокая встречаемость АЛФА у микрофлоры репродуктивного тракта определяется высоким уровнем в нем лактоферрина, что ранее показано Г.П. Германом и Л.И.Дворецким [45, 49].

Значимость этого признака была подтверждена при анализе данных о распространении и выраженности АЛФА у клинических изолятов *Staphylococcus aureus*: хроническое течение гнойно-воспалительных заболеваний и бактерионосительство характеризуются более высокими значениями пенетрантности и экспрессии АЛФА по сравнению с острым течением [38].

И.В. Вальшевой [40] в диссертационной работе показано, что система «лактоферрин хозяина – антилактоферриновая активность микроорганизмов» имеет диагностическое значение и может быть использована для прогнозирования бактерионосительства. Высокий уровень АЛФА сальмонелл и сниженная концентрация ЛФ в кишечнике в разгар заболевания обуславливают развитие реконвалесцентного сальмонеллезного бактерионосительства [36].

Анализ данных о широте распространения АЛФА и диапазоне ее активности позволили О.В. Бухарину [21] высказать предположение об экологической детерминированности факторов персистенции и АЛФА в том числе. Им было установлено, что у бактерий вагинального и цервикального микробиоценозов больных распространенность выраженность признака значительно выше, чем у изолятов от здоровых людей. Автор объясняет это селекцией вариантов, способных адаптироваться к лактоферрину и обладающих максимальной выраженностью признака.

Установлено, что в процессе адаптации к защитным факторам хозяина у микроорганизмов возникли механизмы устойчивости к лактоферрину [41]. Автор, как и W. Bellamy [150], В. Е. Britigan [154], С. Тома [247], предполагает, что ведущим фактором инактивации лактоферрина являются протеазы.

Изложенная выше информация интересна тем, что позволяет с других позиций (проблемы персистенции патогена) подойти к возможной ревизии применяемых средств комплексной терапии, которая в ряде случаев нуждается в безусловном пересмотре в связи с расширением наших знаний о механизмах персистенции микроорганизмов.

Огромные возможности открываются перед врачами, использующими различные терапевтические приемы для лечения больных, в плане регулирующего их воздействия на персистентные свойства патогенов, в частности на антилактоферриновую активность.

Но вопросы, касающиеся роли АЛФА в патогенезе инфекционных болезней (помимо борьбы за железо), участия этого маркера персистенции в адгезии и колонизации возбудителей инфекций, в том числе – холерного вибриона в желудочно-кишечном тракте, выяснении диапазона активности данного признака в различных биотопах (организме человека и объектах окружающей среды), установлении наличия или отсутствия корреляции АЛФА с другими признаками патогенности, выяснении механизма действия антилактоферриновой активности остаются до настоящего времени малоизученными. Решению этих вопросов и посвящена данная диссертационная работа.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Штаммы

В опытах по изучению антилактоферриновой активности было изучено 48 штаммов холерных вибрионов биовара Эль Тор, 10 штаммов - классического биовара и 12 штаммов холерных вибрионов 0139 серогруппы, выделенных от человека и из объектов окружающей среды. Помимо этого, в работе использовано 10 штаммов условно-патогенных микроорганизмов: *E.coli*, *S.typhimurium*, *S.enteritidis*, *S.sonnei*, *S.flexneri*, *S.paratyphiB*, *P.mirabilis*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Hafnia*, а также 2 штамма *E.coli*, содержащие и не содержащие ген *HA/P*. Микроорганизмы для исследования получены из музея живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора и от д.б.н. Е.В. Монаховой.

Характеристика исследуемых культур представлены в таблице 1. Перед началом работы штаммы холерных вибрионов были охарактеризованы в соответствии с Методическими указаниями 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры» [82].

Во время проведения экспериментальной работы штаммы холерных вибрионов хранили в 0,3% полужидком агаре Мартена рН 7,6 – 7,8 при температуре 20 – 22°C, штаммы условно-патогенных микроорганизмов - в 0,3% полужидком мясо-пептонном агаре рН 7,1 – 7,2.

Перед постановкой экспериментов производили высевы на щелочной и мясо-пептонный агары, инкубируя посеvy при 37°C.

Таблица 1 - Характеристика и паспортные данные исследуемых штаммов холерных вибрионов

№ п/п	№ штамма	Дата выделения	Место выделения	Источник выделения	Агглютинабельность сыворотками					Лизабельность фагами				Гемолит. активность в пробе Грейга	Наличие генов	
					в развернутой реакции агглютинации				в слайд-агглютинации	класс.	Эль Тор	ctx ⁺	ctx ⁻		ctx AB	tcp A
					01	Огава	Инаба	PO								
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
<i>V. cholerae El Tor</i>																
1	15436	1991	р. Ерик, г. Вилково	вода	Т	Т	отр.	отр.	отр.	отр.	10 ⁻³	н/и	н/и	отр.	+	+
2	15443	1991	г. Вилково	больной	Т	Т	отр.	отр.	отр.	отр.	ц	н/и	н/и	отр.	+	+
3	15449	1991	г. Вилково	больной	Т	Т	отр.	отр.	отр.	отр.	10 ⁻³	н/и	н/и	отр.	+	+
4	17427	1994	г. Хасавюрт	носитель	Т	Т	1/4Т	отр.	отр.	отр.	ц	отр.	отр.	отр.	+	+
5	17428	1994	г. Дербент	больной	Т	Т	1/2Т	1/2Т	отр.	отр.	отр.	н/и	н/и	отр.	+	+
6	17431	1994	г. Хасавюрт	носитель	Т	1/2Т	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	н/и	н/и	отр.	+	+
7	17442	1996	р. Терек, г. Кизляр	вода	1/2Т	1/2Т	1/8Т	отр.	отр.	отр.	10 ⁻¹	н/и	н/и	отр.	+	+
8	17471	1996	г. Кизляр	больной	1/4Т	1/2Т	отр.	отр.	отр.	отр.	10 ⁻²	н/и	н/и	отр.	+	+
9	17472	1996	г. Кизляр	носитель	1/2Т	Т	отр.	отр.	отр.	отр.	10 ⁻²	н/и	н/и	отр.	-	-
10	17504	1995	р. Нева, г. С.-Петербург	вода	Т	отр.	Т	отр.	отр.	отр.	отр.	н/и	н/и	полож.	-	-
11	17572	1994	оз. Лангасы, г.Находка	вода	отр.	отр.	отр.	Т	отр.	отр.	отр.	н/и	н/и	полож.	-	-
12	17821	1998	г. Дербент	больной	Т	Т	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	н/и	н/и	отр.	+	+
13	17822	1998	г. Дербент	больной	Т	Т	1/4Т	1/4Т	отр.	отр.	отр.	н/и	н/и	отр.	+	+
14	17824	1998	г. Дербент	носитель	Т	Т	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	н/и	н/и	отр.	+	+
15	17899	1999	р. Темерник, г. Ростов	вода	Т	отр.	Т	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	полож.	-	-
16	17904	1999	г. Ростов	сточные воды	Т	Т	1/2Т	отр.	отр.	отр.	отр.	н/и	н/и	полож.	-	-
17	17905	1999	р. Дон, г. Ростов	вода	отр.	отр.	отр.	1/8Т	отр.	отр.	отр.	н/и	н/и	полож.	-	-
18	18246	2000	г. Челябинск	больной	Т	отр.	1/2Т	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	полож.	-	-
19	18247	2000	г. Астрахань	больной	Т	Т	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	н/и	н/и	полож.	-	-
20	18257	2000	г. Астрахань	носитель	Т	1/2Т	1/4Т	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	-	+
21	18373	2001	г. Казань	носитель	Т	Т	отр.	отр.	отр.	отр.	10 ⁻³	отр.	отр.	отр.	+	+

Таблица 1 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
22	18374	2001	г. Казань	больной	Г	Г	отр.	отр.	отр.	отр.	10 ⁻³	отр.	отр.	отр.	+	+
23	18392	2001	р. Нокса, г. Казань	вода	Г	Г	1/4Г	отр.	отр.	отр.	10 ⁻³	отр.	отр.	отр.	+	+
24	18418	2001	г. Казань	больной	Г	Г	отр.	отр.	отр.	отр.	10 ⁻³	отр.	отр.	отр.	+	+
25	18419	2001	г. Казань	сточные воды	Г	Г	отр.	отр.	отр.	отр.	10 ⁻³	отр.	отр.	отр.	+	+
26	18570	2002	р. Чулым, Новосибирская обл.	вода	отр.	отр.	отр.	Г	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	полож.	-	-
27	18594	2003	р. Кутум, г. Астрахань	вода	Г	Г	отр.	отр.	отр.	1/4Г	отр.	отр.	отр.	полож.	-	-
28	18725	2003	оз. Хотынг-Юрях, г. Якутск	ил	Г	отр.	1/2Г	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	полож.	-	-
29	18746	2004	г. Белорецк	больной	Г	отр.	Г	отр.	отр.	отр.	10 ⁻²	отр.	отр.	отр.	+	+
30	18750	2004	г. Сочи	носитель	Г	Г	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	полож.	-	-
31	18774	2005	р. Темерник, г. Ростов	вода	Г	Г	1/4Г	1/5Г	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	полож.	-	-
32	18775	2005	Каменский р-н Ростовской обл.	больной	Г	Г	1/4Г	1/4Г	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	полож.	-	+
33	18777	2005	р. Дон, г. Ростов	вода	Г	Г	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	полож.	-	-
34	18778	2005	Каменский р-н Ростовской обл.	носитель	Г	Г	1/4Г	1/4Г	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	полож.	-	+
35	18779	2005	р. Темерник, г. Ростов	вода	Г	отр.	Г	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	полож.	-	-
36	18780	2005	Каменский р-н Ростовской обл.	больной	Г	Г	отр.	отр.	отр.	отр.	10 ⁻³	отр.	отр.	полож.	-	+
37	18781	2005	Каменский р-н Ростовской обл.	носитель	Г	Г	отр.	отр.	отр.	отр.	10 ⁻²	пол.	отр.	полож.	-	+
38	18782	2005	Каменский р-н Ростовской обл.	сточная вода до обеззараж.	Г	Г	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	полож.	-	+
39	18785	2005	Каменский р-н Ростовской обл.	носитель	Г	Г	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	пол.	отр.	полож.	-	+
40	18786	2005	Каменский р-н Ростовская обл.	носитель	Г	Г	отр.	отр.	отр.	отр.	ц	отр.	отр.	полож.	-	+

Таблица 1 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
41	18788	2005	Каменский р-н Ростовской обл.	вода из карьера	Г	Г	отр.	отр.	отр.	отр.	ц	отр.	пол.	полож.	-	+
42	18793	2005	Каменский р-н Ростовской обл.	носитель	Г	Г	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	полож.	-	+
43	18801	2005	Каменский р-н Ростовской обл.	сточная вода после обеззараж.	Г	Г	отр.	отр.	отр.	отр.	ц	отр.	отр.	полож.	-	+
44	18804	2005	Каменский р-н Ростовской обл.	вода из карьера	Г	Г	отр.	отр.	отр.	отр.	10-2	отр.	отр.	полож.	-	+
45	18821	2005	Каменский р-н Ростовской обл.	носитель	Г	Г	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	полож.	-	+
46	18826	2005	г. Тверь	больной	Г	отр.	Г	отр.	отр.	отр.	10-3	отр.	отр.	отр.	+	+
47	18847	2005	р. Нева, г. С.- Петербург	вода	Г	Г	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	пол.	отр.	+	+
48	18950	2006	р. Подкумок, г. Ессентуки	вода	Г	отр.	Г	отр.	отр.	отр.	10-3	отр.	отр.	полож.	-	-
<i>V. cholerae classical</i>																
49	437	1942	Астрахань	труп	Г	1/2Г	отр.	отр.	отр.	10 ⁻³	отр.	н/и	н/и	отр.	+	+
50	680	1965	Афганистан	больной	Г	отр.	1/2 Г	отр.	отр.	10 ⁻³	отр.	н/и	н/и	отр.	+	+
51	792	1955	Китай	больной	Г	Г	Г	отр.	отр.	10 ⁻³	отр.	н/и	н/и	отр.	+	+
52	569 В (971)	1968	Индия	больной	Г	отр.	Г	отр.	отр.	10 ⁻²	отр.	н/и	н/и	отр.	+	+
53	1077	1955	Индия	больной	Г	Г	отр.	отр.	отр.	10 ⁻³	отр.	н/и	н/и	отр.	+	+
54	1392	1958	Индия	больной	Г	отр.	Г	отр.	отр.	10 ⁻²	отр.	н/и	н/и	отр.	+	+
55	1399	1960	Афганистан	больной	Г	Г	отр.	отр.	отр.	10 ⁻²	отр.	н/и	н/и	отр.	+	+
56	1601		Индия	больной	Г	отр.	Г	отр.	отр.	10 ⁻³	отр.	н/и	н/и	отр.	+	+
57	10353	1958	Камбоджа	больной	Г	отр.	Г	Г	отр.	10 ⁻⁴	отр.	н/и	н/и	отр.	+	+
58	11109	1970	Индия	больной	Г	1/2 Г	Г	отр.	отр.	10 ⁻²	отр.	н/и	н/и	отр.	+	+

Таблица 1 (продолжение)

<i>V. cholerae</i> 0139																
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
59	16064	1993	г. Азов	больной	отр.	отр.	отр.	отр.	полож.	отр.	отр.	н/и	н/и	отр.	+	+
60	16065	1993	г. Азов	больной	отр.	отр.	отр.	отр.	полож.	отр.	отр.	н/и	н/и	отр.	+	+
61	16067	1993	Индия	больной	отр.	отр.	отр.	отр.	полож.	отр.	отр.	н/и	н/и	отр.	+	+
62	17258	1994	г. Бешкек	больной	отр.	отр.	отр.	отр.	полож.	отр.	отр.	н/и	н/и	отр.	+	+
63	17470	1996	р. Обь, г. Новосибирск	вода	отр.	отр.	отр.	отр.	полож.	отр.	отр.	н/и	н/и	полож.	-	-
64	17625	1997	р. Москва, г. Москва	вода	отр.	отр.	отр.	отр.	полож.	отр.	отр.	н/и	н/и	полож.	-	-
65	17785	1998	р. Иня, г. Новосибирск	вода	отр.	отр.	отр.	отр.	полож.	отр.	отр.	н/и	н/и	полож.	-	-
66	17792	1998	г. Новосибирск	сточные воды	отр.	отр.	отр.	отр.	полож.	отр.	отр.	н/и	н/и	полож.	-	-
67	17907	1999	р. Дон, г. Ростов	вода	отр.	отр.	отр.	отр.	полож.	отр.	отр.	н/и	н/и	полож.	-	-
68	18162	1998	г. Москва	сточные воды	отр.	отр.	отр.	отр.	полож.	отр.	отр.	н/и	н/и	полож.	-	-
69	18772	2005	р. Москва, г. Москва	вода	отр.	отр.	отр.	отр.	полож.	н/и	н/и	н/и	н/и	полож.	-	-
70	18925	2006	р. Ангара, г. Иркутск	вода	отр.	отр.	отр.	отр.	полож.	отр.	отр.	отр.	отр.	полож.	-	-

2.2 Реактивы и диагностические препараты

В работе использовали:

- забуференный физиологический раствор pH 7,2
- деионизованную воду pH 5,0
- пул сывороток здоровых людей - источник лактоферрина
- 30% растворы сахаров:
 - маннозы (Serva)
 - глюкозы («Лаверна»)
 - D-глюкозамина (Cal-Biochem, USA)
 - D –галактозы(Serva)
 - D-галактозамина(Cal-Biochem, USA)
- препарат ацидин-пепсин (производитель РУП «Белмедпрепараты» Республика Беларусь, таблетки по 250 мг).
- желчь крупного рогатого скота сухая (производство ООО «ШАКО», расфасовано МЕДИС – 1)
- тест-систему «ЛАКТОФЕРРИН-ИФА-БЕСТ» ЗАО «Вектор-Бест»
- тест-систему «Nucult biotech» НК329 Human lactoferrin ELISA KIT
- коммерческий препарат «Лактоферрин » сухой, фирмы Sigma
- препарат рекомбинантной гемагглютинин/протеазы, выделенной из штамма - продуцента (предоставлен д.б.н. Монаховой Е.В.)
- трипсин (HyClon)
- версен (HyClon)
- 0,5% раствор новокаина
- ксила, раствор для инъекций
- 5% эмбриональную бычью сыворотку
- ампициллин
- канамицин
- 40% глюкозу
- 10% раствор NaOH

- краситель по Романовскому – Гимза
- - бромтимоловый голубой
- - Кумасси R-250
- - трис HCl
- - 5% глицерин
- - 5% раствор формалина
- культуру клеток аденакарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu 80
- культуру клеток эпидермоидной карциномы гортани человека Her-2

2.3 Лабораторные животные

Для определения уровня антилактоферриновой активности *in vivo* использовали крольчат-сосунков в возрасте трех недель. Содержание и уход за животными, а также их эвтаназия проводились в соответствии с требованиями Министерства здравоохранения РФ к работе экспериментально-биологических клиник и «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей».

2.4 Лабораторная посуда

В работе использовали:

- стекла (диски) 12,0 X 0,11 SPL Lifesciences
- пластмассовые центрифужные пробирки с завинчивающимися крышками «Falcon» объемом 10 мл
- культуральные 24-луночные панели «Costar»
- эксикатор со стеариновой свечой
- пленку Parafilm
- пипетки стерильные 1-10 мл
- наконечники для автоматических пипеток объемом 200 мкл
- наконечники для автоматических пипеток объемом 1000 мкл
- пробирки – эппендорф объемом 0,5 мл

- пробирки – эппендорф объемом 1,5 мл
- флаконы объемом 50 и 100 мл

2.5 Питательные среды

В работе использовали:

- агар Мартена рН 7,6-7,8
- бульон Мартена рН 7,6-7,8
- мясо-пептонный агар рН 7,1 – 7,2
- мясо-пептонный бульон рН 7,1 – 7,2
- агарLB (Luria-Bertani) рН 7,6-7,8
- среда DMEM
- раствор Хенкса рН 7,4

2.6 Оборудование

В работе использовали:

- рН-метр «MettlerToledo»
- прибор денситометр «Densi-La-Meter» для определения мутности бактериальной суспензии Erba Lachema
- термостат «Incucell», отрегулированный на 37⁰С
- спектрофотометр «Bio Tek» ELx800
- электронные весы «Acculab»
- термостат «Терцик» ЗАО «НПФ ДНК-Технология»
- центрифугу «Eppendorf» 5702
- центрифугу «miniSpin» фирмы Eppendorf
- инвертированный микроскоп«Nikon»
- камеру для электрофореза «Bio-Rad»
- CO₂ инкубатор«Nuare»
- автоматические одноканальные пипетки переменного объема «BioHit» (10-100 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл)

2.7 Методика определения антилактоферриновой активности у холерных вибрионов in vitro

Для определения антилактоферриновой активности использовали методику, разработанную И.В. Вальшевой с соавт. в 2003 году [41], с нашими модификациями. Необходимо было проводить исследования с возбудителями II группы патогенности. Методика согласована с комиссией по контролю соблюдения биологической безопасности, протокол №13 от 10 декабря 2014 г.

Для безопасности работы, увеличив объем реакционной смеси, заменили 96 - луночные планшеты на стеклянные бактериологические пробирки. Осаждали реакционную смесь для получения супернатанта в центрифуге miniSpin в боксе биологической безопасности II класса. Все манипуляции проводили с соблюдением требований биологической безопасности в соответствии с СП 1.3 – 3118-13 [14].

Методика постановки реакции: из суточных агаровых культур исследуемых штаммов, готовили взвеси микроорганизмов густотой 1 млрд. м.к/мл (контроль на приборе - денситометр) в жидкой питательной среде (бульон Мартена рН 7,6). В качестве источника лактоферрина использовали пул 20-25 сывороток здоровых людей, предварительно определив в них уровень лактоферрина. Раствор лактоферрина готовили в концентрации 200 нг/мл на забуференном физиологическом растворе. Для этого в рабочем пуле сывороток предварительно определяли уровень лактоферрина. Исходя из полученных результатов, пул разводили так, чтоб рабочий раствор получился 200 нг/мл. Взвесь исследуемых штаммов холерных вибрионов объемом 0,5 мл смешивали с раствором лактоферрина в том же объеме.

Параллельно с опытными пробами ставили контроль: в равных объемах по 0,5 мл смешивали раствор лактоферрина и стерильной жидкой питательной среды. Пробы инкубировали 18-24 часа при 37⁰С. После инкубации содержимое пробирок переносили в пластиковые пробирки erpendorf, заклеивали пленкой Parafilm и центрифугировали при 8000 об/мин в течение 20 минут для получения бесклеточных супернатантов.

Определение концентрации лактоферрина в супернатантах опытных и

контрольных проб проводили твердофазным иммуноферментным методом с использованием тест-системы «Лактоферрин» производства ЗАО «Вектор-Бест» (Россия). Регистрацию результатов осуществляли на фотометре ELx800 BioTek при длине волны 450 нм.

Антилактоферриновую активность выражали в абсолютных величинах – нанограмм на мл (нг/мл) лактоферрина, инактивированного микроорганизмом, и рассчитывали по формуле:

$$АЛфА = Kк - Kо,$$

где АЛфА - антилактоферриновая активность;

Kк - концентрация лактоферрина в контроле;

Kо - концентрация лактоферрина в опыте.

Для интерпретации результатов нами были введены условные значения уровней АЛфА: 0 – 40 – низкий; 41 – 70 – средний; от 71 и более – высокий.

2.8 Методика определения АЛфА in vivo

Чтобы определить, как изменяется уровень лактоферрина в организме биопробного животного при попадании в него холерного вибриона, определяли уровень этого белка в кишечнике здоровых кроликов-сосунков и крольчат, зараженных штаммами холерного вибриона.

Кроликов - сосунков оперировали под местным наркозом (для анестезии использовали препарат «Ксила» в дозе 0,15 мл на 1 кг веса животного), а также 0,5 % новокаин для обезболивания, в соответствии с Методическими указаниями 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры» [82].

Шприцем осуществляли забор содержимого тонкого кишечника и определяли уровень лактоферрина в ИФА с помощью тест-системы «Лактоферрин» ЗАО Вектор-Бест. Затем кроликов - сосунков заражали взвесью штаммов холерных вибрионов приготовленных по стандарту густотой 1 млрд. м.к./мл (на приборе - денситометр) в объеме 0,1 – 0,2 мл.

После гибели или усыпления животных, на четвертые сутки в содержимом кишечника снова определяли уровень лактоферрина. Помимо этого, у выделенных из кишечника штаммов холерных вибрионов определяли антилактоферриновую активность и сравнивали ее с АЛФА до заражения.

2.9 Методика определения нейтрализации антилактоферриновой активности сахарами

При изучении природы антилактоферриновой активности была изучена роль лектинов (поверхностных белков микробной клетки, обладающих рецепторной активностью) в процессе связывании лактоферрина.

Для этого были проведены опыты по изучению возможности их рецепции с различными углеводами и определения на этом фоне уровня антилактоферриновой активности. Для изучения этого факта перед определением АЛФА взвесь холерных вибрионов инкубировали с 1% растворами маннозы, глюкозы, D-галактозы, D-галактозамина, D-глюкозамина.

Из суточных агаровых культур готовили взвесь микроорганизмов густотой 1 млрд. м.к./мл (контролировали на приборе денситометр) на забуференном физиологическом растворе и смешивали с углеводами, так чтобы конечная концентрация каждого сахара, была 1%. Смеси инкубировали в течение часа при 37⁰С. Затем к опытной пробе добавляли раствор лактоферрина в конечной концентрации 100 нг/мл и оставляли на контакт 18-24 часа.

По истечении срока определяли значения лактоферрина в опытных и контрольных пробах и рассчитывали уровень АЛФА по формуле приведенной выше в разделе 2.7.

О роли лектинов в АЛФА судили по снижению ее уровня после контакта холерных вибрионов с сахарами в результате блокировки ими поверхностных лектиновых рецепторов и как следствие – снижение или

отсутствие связи с лактоферрином.

2.10 Методика определения уровня антилактоферриновой активности у штаммов *E.coli*

Штаммы кишечной палочки, несущие в своем геноме клонированный ген *hapA* *E.coli*HP61 и *E.coli*QE30, не имеющего его (штаммы любезно предоставлены для данного эксперимента д.б.н. Е.В. Монаховой) выращивали на плотной питательной среде Мартена рН 7,6 с добавлением 50 мкг/мл ампициллина, 25 мкг/мл канамицина и 0,5% глюкозы, для поддержания культур.

Пересев осуществляли каждые 2-3 дня. Непосредственно перед опытом культуры пересевали на агар Мартена рН 7,6 с добавлением 50 мкг/мл ампициллина. В работу брали суточные агаровые культуры и определяли уровень антилактоферриновой активности по методике, представленной ранее.

2.11 Методика определения антикомплементарной активности холерных вибрионов

Сенсибилизацию эритроцитов барана гемолитической сывороткой и определение их количества проводили по стандартной методике [80]. Определение титра комплемента и гемолитической единицы комплемента (CH_{50}) осуществляли по стандартным методикам [81,80].

Антикомплементарную активность у холерных вибрионов определяли по методике радиального гемолиза в геле [18].

Данной методике посвящен раздел в методических рекомендациях «Изучение свойств, обуславливающих персистенцию холерных вибрионов», который адаптирован с точки зрения требований биологической безопасности, при работе с микроорганизмами II группы патогенности» [92].

2.12 Методика определения антилизоцимной активности (АЛА) холерных вибрионов

Антилизозимную активность (АЛА) холерных вибрионов и энтеробактерий определяли чашечным методом, предложенным О.В. Бухариным [26].

Данной методике посвящен раздел в методических рекомендациях «Изучение свойств, обуславливающих персистенцию холерных вибрионов», который адаптирован с точки зрения требований биологической безопасности, при работе с микроорганизмами II группы патогенности» [92].

2.13 Рибонуклеазная активность холерных вибрионов

Рибонуклеазную активность определяли по методике Т. Маниатиса с соавт., [90] с использованием аппаратуры GelDoc 1000/2000 гель документирующей системы (BioRad).

2.14 Методика определения резистентности к желчи (билирезистентности) холерных вибрионов

В растопленный и остуженный щелочной агар pH 7,6 – 7,8 добавляли желчь крупного рогатого скота в концентрациях от 5 до 400 мг/мл и разливали в стерильные чашки Петри. Для контроля разливали агар без добавления желчи.

Из суточной агаровой культуры холерных вибрионов, выращенной на агаре Мартена pH 7,6 – 7,7, готовили 1 млрд. взвесь по стандарту мутности ОСО ГИСК им. Тарасевича (контролировали на денситометре). Для этого в 5 мл стерильного физиологического раствора суспендировали культуру *V. cholerae* и наносили на поверхность агара с желчью полную стандартную бактериологическую петлю, суспензии культуры холерного вибриона и распределяли в виде пятна. Посевы инкубировали в течение 18-24 часов при 37⁰С. Через 48 часов учитывали выросшие на агаровых чашках культуры холерных вибрионов.

Для интерпретации результатов уровня резистентности холерных вибрионов к желчи условно были приняты следующие критерии:

- а) низкий – 10 – 40 мг/мл среды
- б) умеренный - 60 – 80 мг/мл среды

в) высокий - более 80 мг/мл среды

Данной методике посвящен раздел в методических рекомендациях «Изучение свойств, обуславливающих персистенцию холерных вибрионов», который адаптирован с точки зрения требований биологической безопасности, при работе с микроорганизмами II группы патогенности» [92].

2.15 Методика определения уровня адгезии на культуре клеток Нер -2 и HuTu 80

Для определения уровня адгезии холерных вибрионов, использовали методику A.Carrello[159], но со своими модификациями.

Культуры холерных вибрионов готовили непосредственно перед опытом. Для этого штаммы выращивали на агаре Мартена (рН 7,6 – 7,8) в течение 18 часов, по истечении этого срока засекали одну стандартную петлю ($d=2$ мм) исследуемой культуры в бульон LB (рН 7,6 – 7,8), выдерживали в термостате при 37°C в течение 3 часов. После этого с помощью денситометра (ErbaLachema) определяли концентрацию холерных вибрионов в бульонных культурах. Все культуры доводили до концентрации 10^8 м.к/мл.

В 1мл среды DMEM с 5% сыворотки эмбриональной бычьей добавляли по 10 мкл стандартизованной взвеси для получения конечной концентрации 10^6 м.к./мл испытуемых штаммов холерных вибрионов и вносили в пенфлаконы с дисками (диски 12,0 X 0,11 SPL Lifesciences), на которых сформирован разреженный монослой HuTu 80 или Нер-2.

Инкубировали в течение 90 минут при 37°C в CO₂ инкубаторе (Nuare), затем удаляли питательную среду и промывали разреженный монослой дважды раствором Хенкса рН 7,4 от несвязавшихся с монослоем клеток холерных вибрионов, фиксировали 5% формалином 1 час для соблюдения требований биологической безопасности, высушивали и окрашивали диски по Романовскому – Гимза в разведении 1:5 в течение 35-40 минут. Окрашенные диски три раза промывали раствором Хенкса рН 7,4 доставали

из флаконов, высушивали, просматривали под световым микроскопом фирмы Nikon (увеличение 100x10).

Просмотр дисков всегда начинали с контроля. Адгезивные свойства бактерий определяли по числу вибрионов, связавшихся, со 100 клетками NuTu 80 или Нер-2и рассчитывали индекс адгезии по формуле:

$$ИА = \frac{\Sigma КБ}{100К} \quad \text{где:}$$

ИА – индекс адгезии

ΣКБ - количество клеток бактерий, прикрепившихся к 100 клеткам линии Нер -2 или NuTu 80

100К – 100 клеток линии Нер -2 или NuTu 80

По полученным результатам введены критерии оценки уровня адгезии: меньше 10 – низкий, от 10 до 20 – средний, выше 20 высокий.

2.16 Методика создания кислотного стресса

В ходе предварительно проведенных экспериментов было установлено, что оптимальной реакцией для изучения кислотного стресса является рН 4,0 при использовании препарата ацидин-пепсин (бетаин+пепсин). При более низких показателях холерные вибрионы погибают.

Для имитации кислого содержимого желудка (рН 4,0) готовили раствор ацидин-пепсина в кипяченой водопроводной воде. Для этого растворяли две таблетки коммерческого препарата ацидин-пепсина в 50 мл кипяченой водопроводной воды. Измеряли рН полученного раствора при помощи рН-метра. Обычно он приближался к рН 2,0. Затем в этот же флакон добавляли кипяченую водопроводную воду, рН которой приближался к 8,0, для подщелачивания полученного раствора в таком количестве, чтобы показатель стал равным 4,0 (опытная проба).

Из суточной агаровой культуры изучаемого штамма готовили взвесь в физиологическом растворе густотой $1 \cdot 10^9$ м.к./мл, густоту взвеси контролировали в денситометре. Затем в пробирки наливали по 9 мл

раствора ацедин-пепсина и добавляли по 1 мл приготовленной взвеси. Пробы выдерживали в термостате при 37⁰С в течение двух часов.

Стрессированные культуры после воздействия ацидин-пепсином отмывали. Для этого пробы в центрифужных пробирках с завинчивающимися крышками центрифугировали при 3000 об./мин в течение 20 минут. После центрифугирования из пробирок удаляли в дезраствор надосадочную жидкость так, чтобы не взболтать осадок (все манипуляции проводили с соблюдением норм биологической безопасности). В каждую пробирку приливали по 2 мл физиологического раствора, встряхивали до образования равномерной взвеси и определяли концентрацию полученных взвесей с помощью денситометра.

2.17 Методика создания комбинированного стресса

Комбинированный стресс– это одновременное воздействие кислоты, щелочного рН, желчи и микроаэрофильных условий. Создание этих условий имитирует попадание и нахождение холерного вибриона в организме человека.

Сначала готовили взвесь из суточной агаровой культуры изучаемых штаммов в физиологическом растворе густотой $1 \cdot 10^9$ м.к./мл, густоту взвеси контролировали в денситометре. Затем в пробирки наливали по 9 мл раствора ацедин-пепсина (как приготовить препарат см. ранее) и добавляли по 1 мл к приготовленной взвеси. Пробы выдерживали в термостате при 37⁰С в течение двух часов.

По истечении срока инкубации стрессированные культуры отмывали несколько раз. Их центрифугировали при 3000 об./мин в течение 20 минут. После центрифугирования из опытных пробирок удаляли в дезраствор надосадочную жидкость так, чтобы не взболтать осадок.

В каждую пробирку приливали по 2 мл физиологического раствора, встряхивали до образования равномерной взвеси. Взвесь доводили до густоты $1 \cdot 10^9$ м.к./мл, густоту взвеси контролировали в денситометре.

В бульон Мартена рН 7,6-7,8 добавляли сухую желчь в концентрации 50 мг/мл, растворяли и доводили раствор до рН 9,0 с помощью 10% раствора NaOH. Разливали бульон в центрифужные пробирки с завинчивающимися крышками по 9 мл и добавляли по 1 мл взвеси после кислотного стресса. Контакт 5 часов при 37⁰С в эксикаторе в микроаэрофильных условиях. Стрессированные культуры после воздействия комбинированного стресса отмывали несколько раз. Для этого пробы центрифугировали при 3000 об/мин в течение 20 минут.

После центрифугирования из опытных пробирок удаляли в дезраствор надосадочную жидкость так, чтобы не взболтать осадок. В каждую пробирку приливали по 2 мл физиологического раствора, встряхивали до образования равномерной взвеси и определяли концентрацию полученных взвесей с помощью денситометра.

После воздействия комбинированного стресса полученную взвесь использовали для определения антилактоферриновой активности. Уровень АлфА определяли по методике приведенной ранее в разделе 2.7, с помощью тест-системы «Нусcult biotech» НК329-01 Human lactoferrin ELISA KIT.

2.18 Детекция генов персистенции с помощью ПЦР

Материалом для ПЦР служили супернатанты прогретых при 100⁰С 30 минут, взвесей суточных агаровых культур в дистиллированной воде. Амплификацию искомым фрагментов генов персистенции с помощью специфических праймеров осуществляли на программируемом термостате «Терцик» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология», Москва).

Синтез праймеров выполнен ООО «СибЭнзим» (Новосибирск), НПФ «Литех» (Москва) и «Евроген» (Москва). По окончании реакции содержимое пробирок подвергали электрофорезу в горизонтальном 2% агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия, в электрическом поле напряженностью 7,5 вольт/см.

Фрагменты визуализировали в ультрафиолетовом свете с использованием транс-иллюминатора.

У исследуемых штаммов определяли наличие следующих генов:

- муциназы (*tagA*)
- структурной единицы маннозочувствительных пилей адгезии (*mshA*)
- гемагглютинин/протеазы (*hapA*) – ключевой протеазы холерных

вибрионов

- протеазы *PrtV* (ген *prtV* входит в состав *hly*-локуса)
- сериновой протеазы (*VC1649*)
- коллагеназы (*VC1650*)
- регуляторного белка *HapR* (*hapR*)

Нуклеотидные последовательности использованных праймеров приведены в таблице 2.

Таблица 2–Праймеры для детекции генов холерных вибрионов

Ген	Нуклеотидные последовательности праймеров	Длина ампликона, п.н.	Ссылка
<i>tagA</i>	CAATGGAGTGGTTGTGCATGGA CGAGCATCGTATGCCAATGTGT	680	[5]
<i>mshA</i>	TCTCGGTATCTTGGCCGTCACA TGCATAGCAACCGTTGCAGGAT	432	[92]
<i>hapA</i>	TCAACTACAACACCGCAGAC GACGACAATCCCAAGAAGAG	270	[52]
<i>prtV</i>	CATACTGAGATGCTCTACGAT TTTCACCATGTTTCGGGCGTGA	864	[241]
<i>VC1649</i>	GGTGGTAGTTATCTTGGTGG GTCACAACCTCGCTCCTGAA	843	[241]
<i>VC1650</i>	CGGCGTGGCTGGATACATTG GTCACACTTAAATAGTAGCGT	389	[96]
<i>hapR</i>	TCGAAAAACGCCCTCGAACTCG ATTCGCCACGCTCCATCGCTT	447	[92]

Помощь в проведении данных исследований оказали д.б.н. Е.В. Монахова, к.б.н. Е.А. Меньшикова, н.с. Е.М. Курбатова.

2.19 Метод постановки электрофореза

Электрофоретические исследования проводили в 7,5% ПААГ по Леммли [100]. Помощь в постановке электрофореза оказала к.б.н. О.В. Дуванова.

2.20 Статистические методы исследования

Статистическую обработку полученных результатов проводили общепринятыми методами [46], вычисляя среднеарифметические величины, их средние ошибки, критерии линейной регрессии и корреляции, достоверность различий по критерию Стьюдента. Результаты считали достоверными, если вероятность ошибки не превышала 0,05 и 0,01 ($p < 0,05$; $p < 0,01$) по отношению к контролю.

Глава 3 АНТИЛАКТОФЕРРИНОВАЯ АКТИВНОСТЬ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

3.1 Антилактоферриновая активность холерных вибрионов *in vitro*

С учетом, появившихся в литературе сведений о роли антилактоферриновой активности (АЛФА) в жизнедеятельности различных микроорганизмов [30,64, 48, 65] изучение этого ранее не исследованного фактора у холерных вибрионов может предоставить исследователям новые данные о его роли в патогенезе холеры, вызванной возбудителями, имеющими различный потенциал АЛФА.

Приступая к работе по изучению антилактоферриновой активности у холерных вибрионов, мы руководствовались методикой, изложенной в статьях И.В. Валышевой с соавт. [41,42] и впоследствии - в ее диссертационной работе [40].

С учетом необходимости проведения исследований с возбудителем холеры (ПБА II группы патогенности) в методику были внесены некоторые изменения и дополнения, касающиеся соблюдения требований биологической безопасности, которые приведены в главе «Материалы и методы».

В данной серии опытов было изучено 48 штаммов холерных вибрионов Эль Тор, 12 штаммов -*V.cholerae* O139 серогруппы, 10 штаммов - классических холерных вибрионов, а также 10 штаммов условно-патогенных микроорганизмов.

3.1.1 Антилактоферриновая активность холерных вибрионов Эль Тор

Данный признак присутствовал у всех изученных культур холерных вибрионов Эль Тор, что говорит о способности возбудителя холеры к инактивации лактоферрина (таблица 3).

Полученные результаты дали возможность комплексно оценить антилактоферриновую активность, как у отдельных культур, так и в группах штаммов, различающихся по источнику выделения и по эпидемической значимости.

Таблица 3 - Антилактоферриновая активность холерных вибрионов Эль Тор

Место выделения	Год выделения	Источник выделения	№№ штамма	Наличие генов		Уровень АЛФА нг/мл*	Средний уровень АЛФА в группе в нг/мл (M±m)
				<i>ctxAB</i>	<i>tcpA</i>		
Вилково	1991	Больные	15443	+	+	57	75,4±20,5
	1991		15449	+	+	100	
Казань	2001		18374	+	+	75	
	2001		18418	+	+	75	
Дербент	1994		17428	+	+	100	
	1998		17821	+	+	75	
	1998		17822	+	+	40	
Кизляр	1996		17471	+	+	75	
Тверь	2005		18826	+	+	76	
Белорецк	2004		18746	+	+	32	
Каменский р-н, РО	2005		18775	-	+	100	
	2005		18780	-	+	100	
Челябинск	2000		18246	-	-	75	
Астрахань	2000		18247	-	-	75	
Казань	2001	Вибрионосители	18373	+	+	75	87,1±13,2
Хасавюрт	1994		17427	+	+	100	
Хасавюрт	1994		17431	+	+	57	
Дербент	1994		17824	+	+	75	
Каменский р-н, РО.	2005		18778	-	+	91	
	2005		18781	-	+	100	
	2005		18785	-	+	95	
	2005		18786	-	+	100	
	2005		18793	-	+	100	
	2005		18821	-	+	94	
Астрахань	2000		18257	-	+	93	
Сочи	2004		18750	-	-	78	
Кизляр	1996		17472	-	-	74	

Таблица 3 (продолжение)

р. Ерик	1991	Вода открытых водоемов	15436	+	+	55	67,3±19,4
р. Нокса	2001		18392	+	+	40	
р. Терек	1996		17442	+	+	57	
р. Нева	2005		18847	+	+	51	
Каменский р-н, РО	2005		18788	-	+	100	
			18804	-	+	100	
р. Нева	1995		17504	-	-	75	
оз. Лангасы	1994		17572	-	-	75	
р. Темерник	1999		17899	-	-	75	
р. Дон	1999		17905	-	-	75	
р. Чулым	2002		18570	-	-	70	
р. Кутум	2003		18594	-	-	75	
оз. Хотынг- Юрях	2004		18725	-	-	46	
р. Темерник	2005		18774	-	-	40	
р. Дон	2005		18777	-	-	79	
р. Темерник	2005		18779	-	-	100	
р. Подкумок	2006	18950	-	-	31		
Казань	2001	Сточная вода	18419	+	+	75	82,75±10,2
Каменский р-н, РО	2005		18782	-	+	81	
	2005		18801	-	+	100	
Ростов	1999		17904	-	-	75	

* - среднее значение после трех определений

Установлено, что в группах штаммов вибрионов Эль Тор, выделенных от больных, вибрионосителей и сточной воды средние показатели АЛФА были высокими и составляли 75,4 -87,1 нг/мл. Группа штаммов, выделенных из воды открытых водоемов, характеризовалась средней активностью (67,3 нг/мл).

При этом обращает на себя внимание, что в каждой группе встречались штаммы с разной степенью антилактоферриновой активности. Так в группе штаммов, выделенных от больных, превалировали культуры с высокой АЛФА – 78,6%, количество культур с низкой и средней степенью активности составляло всего 21,4%. У штаммов, изолированных от вибрионосителей и из сточной воды, также самый удельный вес составляли культуры с высокой активностью (92,3% и 100%,

соответственно). У *V.cholerae El Tor* из воды количество низко- и среднеактивных штаммов составляло 41,2%, а высокоактивных было меньше, чем в первых трех группах (58,8%).

Особый интерес в опытах по изучению антилактоферриновой активности представляли штаммы, выделенные в 2005 году в Каменском районе Ростовской области, которые характеризовались очень высокой АЛФА (81-100 нг/мл). Все они имели один общий установленный источник инфекции. Обращает на себя внимание, что при этой вспышке были выделены только две культуры от больных и 30 - от вибрионосителей.

В этой связи возникает вопрос – не способствует ли АЛФА формированию вибрионосительства? Ранее на это обращали внимание исследователи, изучающие антилактоферриновую активность у условно - патогенных бактерий. Так, И.В. Валышева в своей диссертационной работе [40] обозначила систему «лактоферрин хозяина – антилактоферриновая активность микроорганизмов», как систему, имеющую диагностическое значение, для возможности ее использования в прогнозировании сальмонеллезного бактерионосительства.

При анализе показаний АЛФА в группах штаммов, выделенных из различных источников (больных, вибрионосителей, воды открытых водоемов, сточной воды) с учетом наличия генов токсинообразования (*ctxAB*) и токсинкорегулируемых пилей адгезии (*tcpA*) было установлено (рисунок 3), что в группе «больные» наиболее высоким показателем антилактоферриновой активности характеризовались штаммы с генотипом *ctxAB⁻tcpA⁺* (100 нг/мл), затем штаммы с генотипом *ctxAB⁻tcpA⁻* (75,0 нг/мл) и штаммы *ctxAB⁺tcpA⁺* (70,5 нг/мл – за счет низких показаний у двух штаммов). Различия в показателях АЛФА между последними двумя группами были незначительными.

В группе «вибрионосители» показатели АЛФА более значительно отличались друг от друга (76,0-96,14 нг/мл), при этом наивысшими также являлись значения в группе *ctxAB⁻tcpA⁺* (96,14 нг/мл).

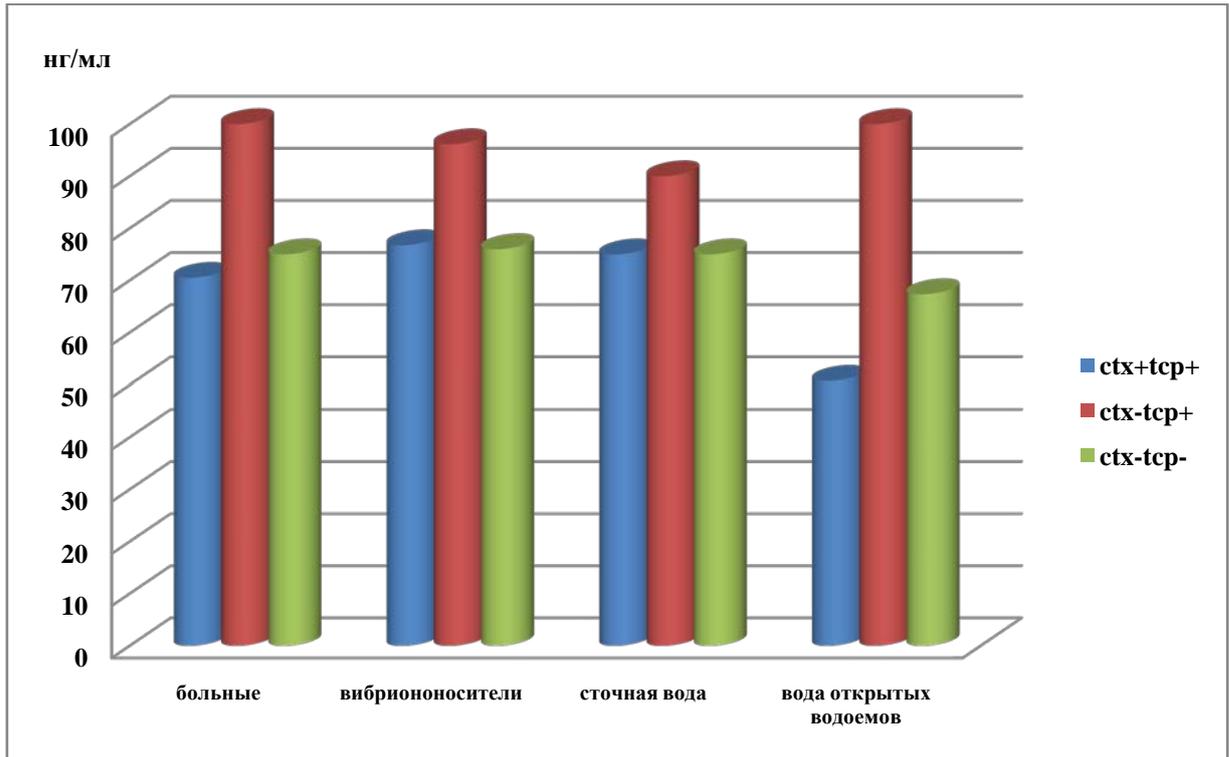


Рисунок 3 - Антилактоферриновая активность холерных вибрионов Эль Тор, ранжированных по источнику выделения

В остальных двух группах «вода открытых водоемов» и «сточная вода» преимущество показателей АЛФА также отмечено у группы штаммов с генотипом $ctxAB^- tcpA^+$ (100,0 нг/мл и 90,0 нг/мл, соответственно).

Таким образом, было впервые установлено, что наиболее высокие показатели АЛФА характерны для так называемых «потенциально эпидемически опасных штаммов», т.е. штаммов, лишенных способности продуцировать холерный токсин, но сохранивших (или приобретших) гены токсинкорегулируемых пилей адгезии ($ctxAB^- tcpA^+$).

Полученные результаты были подтверждены при ранжировании тех же штаммов по эпидемической значимости - (I группа – $ctxAB^+ tcpA^+$), (II группа – $ctxAB^- tcpA^+$), (III группа – $ctxAB^- tcpA^-$). Результаты приведены в таблице 4.

Таблица 4 - Уровни АЛФА у штаммов холерных вибрионов Эль Тор, различающихся по эпидемической значимости

Место выделения	Год выделения	№№ штамма	Группа	Наличие генов		Уровень АЛФА нг/мл	Источник выделения	Средний уровень АЛФА в группе нг/мл (M±m)
				<i>ctxAB</i>	<i>tcpA</i>			
Вилково	1991	15443	I	+	+	57	Больные	66,45±11,1
	1991	15449		+	+	100		
Казань	2001	18374		+	+	75		
	2001	18418		+	+	75		
Дербент	1994	17428		+	+	100		
	1998	17821		+	+	75		
	1998	17822		+	+	40		
Кизляр	1996	17471		+	+	75		
Тверь	2005	18826		+	+	76		
Белорецк	2004	18746		+	+	32		
Казань	2001	18373		+	+	75	Вибрионосители	
Хасавюрт	1994	17427		+	+	100		
Хасавюрт	1994	17431		+	+	57		
Дербент	1994	17824		+	+	75	Вода	
р. Ерик	1991	15436		+	+	55		
р. Нокса	2001	18392		+	+	40		
р. Терек	1996	17442	+	+	57			
р. Нева	2005	18847	+	+	51			
Казань	2001	18419	+	+	75	Сточная вода		
Каменский р-н, РО.	2005	18775	II	-	+	100	Больные	96,5±5,5
	2005	18780		-	+	100		
	2005	18778		-	+	91	Вибрионосители	
	2005	18781		-	+	100		
	2005	18785		-	+	95		
	2005	18786		-	+	100		
	2005	18793		-	+	100		
	2005	18821		-	+	94		
Астрахань	2000	18257		-	+	93		
Каменский р-н, РО	2005	18788		-	+	100	Вода	
	2005	18804		-	+	100		
	2005	18782		-	+	81	Сточная вода	
	2005	18801	-	+	100			

Таблица 4 (продолжение)

Челябинск	2000	18246	III	-	-	75	Больные	72,62±3,7
Астрахань	2000	18247		-	-	75		
Сочи	2004	18750		-	-	78	Вибриононосители	
Кизляр	1996	17472		-	-	74		
р. Нева	1995	17504		-	-	75	Вода	
оз. Лангасы	1994	17572		-	-	75		
р. Темерник	1999	17899		-	-	75		
р. Дон	1999	17905		-	-	75		
р. Чулым	2002	18570		-	-	70		
р. Кутум	2003	18594		-	-	75		
оз. Хотынг-Юрях	2004	18725		-	-	46		
р. Темерник	2005	18774		-	-	40		
р. Дон	2005	18777		-	-	79		
р. Темерник	2005	18779		-	-	100		
р. Подкумок	2006	18950	-	-	31			
Ростов	1999	17904	-	-	75	Сточная вода		

Обращают на себя внимание показатели средних значений АЛФА в этих группах. Во II группе потенциально эпидемически опасных штаммов показатель самый высокий ($96,5 \pm 5,5$), что свидетельствует о значимости антилактоферриновой активности для персистенции вибрионов в организме хозяина при отсутствии генов токсинопродукции.

В I и III группах штаммов показатели приблизительно одинаковые ($66,45 \pm 11,1$ и $72,62 \pm 3,7$), соответственно, причем у эпидемически неопасных штаммов значение даже немного выше.

Во всех трех группах штаммов, вне зависимости от уровня патогенности, высокой АЛФА обладали штаммы, выделенные от людей (больных и вибриононосителей) и из сточной воды (рисунок 4).

В I группе, характеризующейся генотипом $ctxAB^+tcpA^+$, показатели составляли 73,6 нг/мл и 75,0 нг/мл; во II группе с генотипом $ctxAB^-tcpA^+$ 97,0 и 90,0 нг/мл, соответственно, в III группе с генотипом $ctxAB^-tcpA^-$ 75,5 и 75,0 нг/мл. Показатели АЛФА у штаммов из воды открытых водоемов в I и

III группах были немного ниже, чем у вышеперечисленных (50,75; 67,36 нг/мл).

Во II группу вошли потенциально эпидемически опасные штаммы с генотипом *ctxAB tcpA*⁺, выделенные в Каменском районе Ростовской области и один штамм, выделенный от носителя в Астрахани. Показатели АЛФА во всех подгруппах этой группы были сходными и очень высокими (90-100 нг/мл).

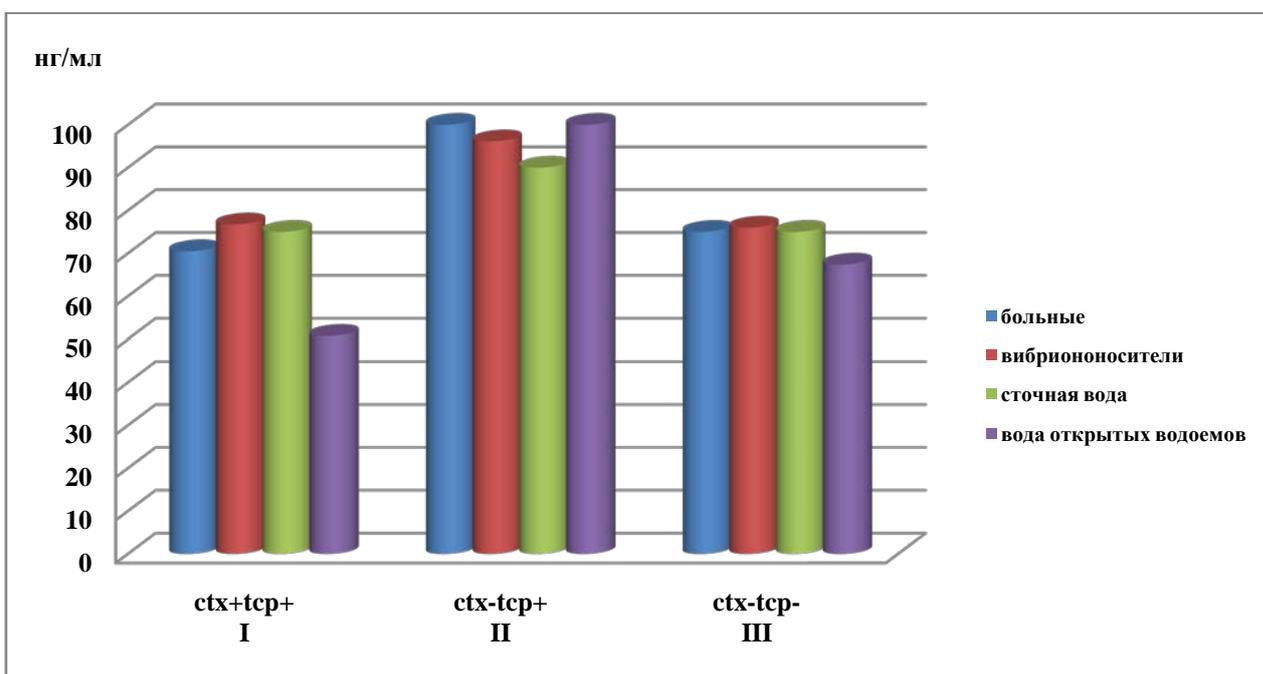


Рисунок 4 - Антилактоферриновая активность холерных вибрионов Эль Тор, ранжированных по наличию генов патогенности (*ctx AB* и *tcp A*)

Можно предположить, что антилактоферриновая активность является вспомогательным свойством, т.е. используется по мере необходимости и в зависимости от задач, которые «ставит» перед собой холерный вибрион. Для I группы штаммов, вызывающих «классический» инфекционный процесс, основной задачей является закрепиться в кишечнике человека и осуществить выброс токсина, а для II и III групп штаммов, лишенных способности к токсинопродукции, возникает необходимость, как можно дольше сохранять популяцию в данных условиях.

Таким образом, и при таком варианте анализа было показано, что именно штаммы с генотипом *ctxAB tcpA*⁺ обладают наиболее выраженной способностью к продукции антилактоферринового фактора.

Проведенное исследование показало, что все штаммы холерных вибрионов Эль Тор обладают антилактоферриновой активностью, при этом более высокие показатели отмечены у культур, выделенных от людей и сточной воды (в которую холерные вибрионы попадают опять-таки от людей), что косвенно указывает на роль АЛФА в патогенезе холеры. Активность этого фактора у штаммов, изолированных из воды открытых водоемов (за исключением выделенных во время эпидемических вспышек в Ростовской области в 2005 году), ниже, чем АЛФА от людей.

На возможную роль АЛФА в патогенезе холеры и персистенции холерных вибрионов косвенно указывает наличие корреляционных связей с другими ранее изученными свойствами [122,125,123,10], обуславливающими персистентный потенциал холерных вибрионов (таблица 5 и рисунок 5).

Таблица 5 - Определение коэффициента корреляции АЛФА с другими свойствами, обуславливающими персистенцию у холерных вибрионов Эль Тор

Источник выделения	АЛФА нг/мл	АКА* анти-СН50	Били- резистентность мг/мл	АЛА* мкг/мл	РНК-аза* INT/mm ²
Больные	75,4	0,9	174,3	4,11	1122
Носители	87,1	0,91	160,7	3,9	1070
Вода открытых водоемов	67,3	0,77	115,7	4,07	1104
Сточная вода	82,75	0,98	195	5,25	1126
Коэффициент корреляции (r)		0,8181	0,6951	0,2363	-0,3794

- * - АКА – антикомплементарная активность
- АЛА – антилизоцимная активность
- РНК-аза – РНК-азная активность

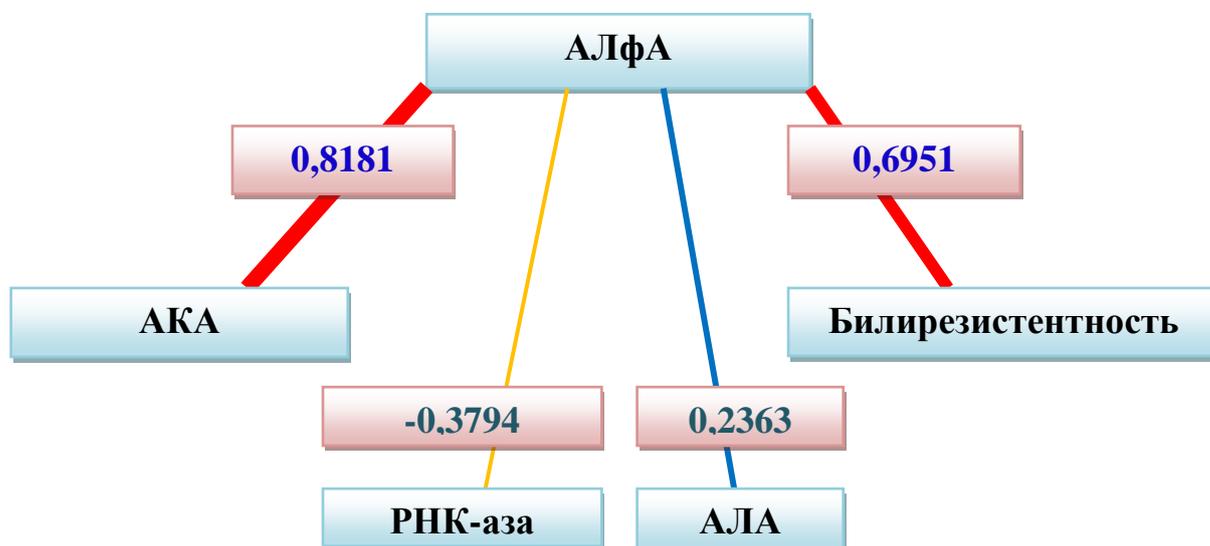


Рисунок 5 - Графическое изображение коррелятивных связей АЛФА с другими свойствами, характеризующими персистентный потенциал холерных вибрионов

Так, наиболее высокая корреляционная связь АЛФА была с антикомплементарной активностью ($r=0,8181$) и умеренная - с билирезистентностью ($r=0,6951$).

Указанные свойства более характерны для штаммов, выделенных от больных и вибрионосителей [74].

И, напротив, с признаками, характерными для штаммов, изолированных из объектов окружающей среды (антилизоцимная и РНК-азная активности) коэффициенты корреляции практически отсутствовали или были слабыми ($r= 0,2363$ и $r= -0,3794$).

3.1.2 Антилактоферриновая активность холерных вибрионов O139 серогруппы

При анализе АЛФА у сравнительно небольшого количества штаммов

холерных вибрионов O139 серогруппы было установлено, что, хотя все изученные штаммы инактивировали лактоферрин, но активность их была значительно ниже, чем у *V.cholerae* O1 серогруппы (таблицы 6,7).

Таблица 6 - Антилактоферриновая активность холерных вибрионов O139 серогруппы

Штаммы	Место выделения	Источник выделения	Год выделения	Наличие генов в ПЦР		Уровень АЛфА у штаммов, в нг/мл	Средний уровень АЛфА, в группе штаммов в нг/мл (M±m)
				ctxAB	tcpA		
16064	Азов	больные	1993	+	+	57	40,25±16,25
16065	Азов			+	+	56	
16067	Индия			+	+	24	
17258	Бишкек		1994	+	+	24	
17792	Новосибирск	сточная вода	1998	-	-	75	65,0±10,0
18162	Москва		1998	-	-	55	
17470	р.Обь	вода открытых водоемов	1996	-	-	57	56,3±0,94
17625	р.Москва		1997	-	-	55	
17785	р. Иня		1998	-	-	57	
17907	р.Дон		1999	-	-	57	
18772	р.Москва		2005	-	-	55	
18925	р.Ангара		2006	-	-	57	

Таблица 7 - Сравнение уровней антилактоферриновой активности у холерных вибрионов Эль Тор и O139 серогрупп

Источник выделения	Количество штаммов O1 серогруппы	Среднее значение АЛфА нг/мл (M±m)	Количество штаммов O139 серогруппы	Среднее значение АЛфА нг/мл (M±m)
Больные	14	75,4±20,5	4	40,25±16,25
Вибрионосители	13	87,1±13,2	-	-

Таблица 7 (продолжение)

Сточная вода	4	82,75±10,5	2	65,0 ±10,0
Вода открытых водоемов	17	67,3±19,4	6	56,3±0,94

Ни один из 12 изученных штаммов O139 серогруппы не обладал высокой АЛФА, максимальные показатели были у штаммов, изолированных из сточной воды (65,0±10 нг/мл). У больных эти показатели были средними (40,25±16,25 нг/мл), однако у штаммов, выделенных в Азове, показатели были выше, чем у остальных двух штаммов. Холерные вибрионы, выделенные из воды открытых водоемов, также обладали средним показателем АЛФА (56,3±0,94), лишь немного превышающим показатели антилактоферриновой активности у штаммов, выделенных от больных.

Можно предположить, что причина сравнительно низкой АЛФА у холерных вибрионов O139 серогруппы заключается в капсуле, которая создает препятствие для связи лактоферрина с поверхностными структурами клетки и предохраняет тем самым возбудитель холеры от его воздействия. Возможно, такая защита не требует повышенной индукции фактора, отвечающего за антилактоферриновую активность.

У вибрионов, выделенных от больных, капсула толще [134], можно предположить, что в сточной воде и воде открытых водоемов в присутствии детергентов капсула частично растворяется и АЛФА проявляется в большей мере. С другой стороны, даже при низком уровне АЛФА наличие капсулы может препятствовать бактерицидному действию лактоферрина на клетки холерных вибрионов.

3.1.3 Антилактоферриновая активность классических холерных вибрионов

При изучении антилактоферриновой активности у десяти штаммов классических холерных вибрионов, выделенных от больных или умерших от холеры (таблица 8), было установлено, что АЛФА у них либо отсутствует

совсем (показатели равны 0 нг/мл), либо имеет низкое значение (от 10 до 40 нг/мл). Только у одного штамма показатель АЛФА имеет среднее значение (47 нг/мл). Данный штамм был выделен в Афганистане в 1965 году.

Таблица 8 - Антилактоферриновая активность холерных вибрионов классического биовара

№ п/п	Штаммы	АЛФА нг/мл
1.	<i>V.cholerae classical 437</i>	40
2.	<i>V.cholerae classical 680</i>	47
3.	<i>V.cholerae classical 792</i>	28
4.	<i>V.cholerae classical 569 B</i>	0
5.	<i>V.cholerae classical 1077</i>	10
6.	<i>V.cholerae classical 1392</i>	40
7.	<i>V.cholerae classical 1399</i>	13
8.	<i>V.cholerae classical 1601</i>	0
9.	<i>V.cholerae classical 10353</i>	40
10.	<i>V.cholerae classical 11109</i>	10

Можно предположить, что особенности патогенеза классической холеры, вызванной высокотоксичными штаммами (вплоть до случаев «сухой» холеры, приводящей к смерти в течение нескольких часов), практическое отсутствие или редко встречаемое в те годы явление вибриононосительства не привели к необходимости использования этого фактора для инициации заболевания.

Вероятно, именно эволюция возбудителя холеры, приведшая к началу седьмой пандемии, вызванной вибрионом ЭльТор, обусловила появление ряда признаков (в том числе АЛФА), «участвующих» в патогенезе холеры и ответственных за персистенцию *V.cholerae* как в организме человека, так и в объектах окружающей среды.

Значимость этого признака возросла при появлении потенциально эпидемически опасных (*ctxABtcpA*⁺) штаммов, характерной особенностью которых является высокий персистентный потенциал и высокий удельный

вес вибрионосителей.

3.1.4 Антилактоферриновая активность у штаммов условно-патогенных микроорганизмов

На наш взгляд, важно отметить, что уровень антилактоферриновой активности холерных вибрионов Эль Тор превосходит показатели АЛФА условно - патогенных микроорганизмов (УПМ), вызывающих, в том числе, кишечные инфекции. Так, по данным И.В. Вальшевой [40], выраженность этого признака (в зависимости от видовой принадлежности) составляла у них всего 4-13 нг/мл. В наших исследованиях значения антилактоферриновой активности у штаммов 3-4 групп патогенности были несколько выше.

Уровень АЛФА определяли по методике, приведенной в разделе 2.7, с учетом особенностей исследуемых микроорганизмов с помощью тест-системы «Нусcult biotech» НК329-01 Human lactoferrin ELISA KIT. Результаты представлены в таблице 9.

Таблица 9 - Показатели уровня антилактоферриновой активности у штаммов III – IV групп патогенности

№ п/п	Штаммы	Уровень АЛФА нг/мл	Среднее значение АЛФА в группе
1.	<i>Klebsiella</i>	48	45,8±7,8
2.	<i>E.coli</i>	52	
3.	<i>S.enteritidis</i>	56	
4.	<i>S.typhimurium</i>	44	
5.	<i>S.flexneri</i>	38	
6.	<i>S.sonnei</i>	52	
7.	<i>S.paratyphi B</i>	36	
8.	<i>Citrobacter</i>	46	
9.	<i>Hafnia</i>	54	
10.	<i>Pr. mirabilis</i>	32	

Как видно из таблицы, показатели АЛФА у УПМ варьировали от 32 до 56 нг/мл, что составляет низкий и средний уровень активности, среднее

значение $45,8 \pm 7,8$. При сравнении полученных результатов антилактоферриновой активности УПМ и холерных вибрионов, выделенных от людей можно констатировать, что у *V.cholerae El Tor* показатели были выше в среднем на 40-47%.

Вероятно, особенности и тяжесть клинического течения при холере, наличие большого количества вибриононосителей обуславливают индукцию не только основных факторов патогенности (токсино- и пилепродукцию), но и так называемых «малых факторов» патогенности, играющих важную роль в персистенции холерных вибрионов в организме человека и объектах окружающей среды, в том числе и АЛФА.

Так, по сравнению с другими энтеробактериями, у возбудителя холеры Эль Тор наблюдается также более высокая антилизоцимная и супероксиддисмутазная активности [125, 110, 111]. Эти факторы, также как и АЛФА, характеризуют персистентный потенциал холерных вибрионов.

3.2 Оценка уровней лактоферрина и АЛФА холерных вибрионов Эль Тор при инфекционном процессе *in vivo*

Для того чтобы иметь представление о взаимодействии лактоферрина и АЛФА холерных вибрионов в макроорганизме был проведен опыт по внутрикишечному заражению кроликов-сосунков. Исходя из позиций гуманного отношения к животным, в эксперименте было использовано всего три кролика-сосунка. Операция проводилась под местным наркозом (для анестезии использовали препарат «Ксила» в дозе 0,15 мл на 1 кг веса животного), а также 0,5 % новокаин для обезболивания.

Уровень лактоферрина в тонком кишечнике кроликов-сосунков до и после заражения животных определяли с помощью ИФА, используя тест-систему «Лактоферрин» ЗАО Вектор-Бест.

В опыт были взяты штаммы *V.cholerae El Tor*, отличающиеся по набору основных детерминант патогенности: патогенный ($ctxAB^+tcpA^+$); потенциально эпидемически опасный ($ctxAB^-tcpA^+$); атоксигенный ($ctxAB^-tcpA^-$). Результаты представлены в таблице 10. Как видно из таблицы,

исходный уровень лактоферрина в тонком кишечнике у здоровых кроликов-сосунков составлял 22-25 нг/мл, после заражения показание у двух штаммов возросли, у одного – остались практически без изменения. Так, при заражении кролика-сосунка атоксигенным штаммом *V.cholerae El Tor* 17899 *ctxAB⁻tcpA⁻*, не вызвавшим заболевания у экспериментального животного и вскрытого через четверо суток после заражения, уровень лактоферрина в тонком кишечнике практически не изменился, он составил 23 нг/мл.

Таблица 10 - Уровень лактоферрина в кишечнике кроликов-сосунков до и после заражения культурами холерных вибрионов

Штаммы		Наличие генов	Количество лактоферрина в тонком кишечнике кролика-сосунка до заражения	Количество лактоферрина в тонком кишечнике кролика-сосунка после заражения
<i>V.cholerae El Tor</i>	18418	<i>ctxAB⁺tcpA⁺</i>	25 нг/мл	48 нг/мл
	18775	<i>ctxAB⁻tcpA⁺</i>	23 нг/мл	48 нг/мл
	17899	<i>ctxAB⁻tcpA⁻</i>	22 нг/мл	23 нг/мл

Что касается патогенного (18418 *ctxAB⁺tcpA⁺*) и потенциально эпидемически опасного (18775 *ctxAB⁻tcpA⁺*) штаммов, то на фоне инфекционного процесса, приведшего к гибели крольчат в течение первых и третьих суток, соответственно, наблюдалась выраженная индукция этого бактерицидного фактора, т.к. уровень лактоферрина увеличился почти в два раза (48нг/мл).

Ранее было отмечено, что в разгар заболевания сальмонеллезом концентрация лактоферрина в копрофильтатах увеличивалась по сравнению со здоровыми людьми в 12 раз, постепенно снижаясь к периоду реконвалесценции [40].

При определении уровня антилактоферриновой активности в том же опыте с заражением кроликов-сосунков были получены интересные результаты, свидетельствующие, с одной стороны, о возможном участии этого фактора в развитии заболевания, с другой – о его роли в персистенции возбудителя в макроорганизме (таблица 11). Как и при других кишечных инфекциях у людей [40] при экспериментальной холере в острой фазе заболевания показания АЛФА у эпидемически опасного (*ctxAB⁺tcpA⁺*) штамма снизились (с 75 до 40 нг/мл).

Таблица 11 - Сравнение АЛФА штаммов холерных вибрионов Эль Тор in vivo и in vitro

Штаммы			Уровень АЛФА в опытах in vitro, нг/мл	Опыт in vivo		
				кролики пали или усыплены	клиника	уровень АЛФА, нг/мл
<i>V.cholerae</i> <i>El Tor</i>	18418	<i>ctxAB⁺tcpA⁺</i>	75	пал (1 сутки)	Холерогенный эффект	40
	18775	<i>ctxAB⁻tcpA⁺</i>	100	пал (3 сутки)	Энтеропатогенный эффект	100
	17899	<i>ctxAB⁻tcpA⁻</i>	75	усыплен (4 сутки)	-	80

Вероятнее всего, в данных условиях для реализации патогенеза холерный вибрион не нуждается в факторах, обуславливающих персистенцию, так как имеет для этого гены токсино-и пилеобразования. При отсутствии характерной клиники количество фактора, обуславливающего АЛФА у *ctxAB⁻tcpA⁺* и *ctxAB⁻tcpA⁻* штаммов, практически не изменилась.

3.3 Действие различных видов стресса на антилактоферриновую активность

В последние годы возрастает интерес исследователей к изучению стресса у бактерий, обусловленного действием различных средовых раздражителей – стрессоров.

В медицине под термином «стресс» Селье понимает все неспецифические проявления, свойственные необычному состоянию организма, возникающему вследствие влияния чрезвычайных раздражителей - стрессоров [13].

Основные стрессоры для микробной популяции – высокие или низкие температуры, рН, дефицит железа, отсутствие глюкозы, рост при низком парциальном давлении кислорода. Ранее действие различных видов стресса на антилактоферриновую активность не изучалось.

3.3.1 Действие кислотного стресса на антилактоферриновую активность

Одними из наиболее распространенных неблагоприятных факторов (стрессоров) для холерных вибрионов при попадании в организм человека являются кислая среда желудочного сока и воздействие желчи.

Высказано предположение, что верхние отделы кишечника человека могут оказаться уникальной нишей для свершения событий, связанных с горизонтальной передачей генов и формированием эпидемически значимых штаммов холерных вибрионов [54, 56]. Мы изучили влияние этих факторов на АЛФА. Результаты действия кислотного стресса на антилактоферриновую активность приведены в таблице 12.

Таблица 12 - Показатели уровня антилактоферриновой активности после действия кислотного стресса

№ п/п	Штаммы		Гены		Источник выделения	АЛФА нг/мл исходные	АЛФА нг/мл после кислотного стресса
			<i>ctxAB</i>	<i>tcpA</i>			
1.	<i>V.cholerae</i> <i>classical</i>	437	+	+	больной	40	12
2.		569 В	+	+		0	0

Таблица 12 (продолжение)

3.	<i>V.cholerae</i> <i>O139</i>	16065	+	+	больной	56	20
4.		18772	-	-	вода	55	32
5.	<i>V.cholerae</i> <i>El Tor</i>	18775	-	+	больной	100	64
6.		18418	+	+		75	48
7.		18750	-	-	носитель	78	31
8.		18257	-	+		93	48
9.		17899	-	-	вода	75	44
10		18774	-	-		40	22

Проведенные исследования показали, что кислотный стресс оказывает влияние на антилактоферриновую активность. У *V. cholerae O139* ее уровень снизился в среднем на 53%, у *V. cholerae El Tor* у штаммов, выделенных от больных, АЛФА снижалась на 36 %, от носителей - на 47% и из воды открытых водоемов - на 57%. Штаммов, полностью лишившихся данного признака, выявлено не было.

У классических холерных вибрионов, так же наблюдалось снижение уровня антилактоферриновой активности, у штамма, не имеющего АЛФА изменений в показателях после кислотного стресса, не произошло.

3.3.2 Действие комбинированного стресса на антилактоферриновую активность

Комбинированный стресс, включает в себя одновременное воздействие на популяцию, желчью, щелочным рН, снижением уровня кислорода в среде.

Как известно, в содержимом толстого кишечника рН достигает 9,0. Для жизнедеятельности холерных вибрионов оптимальным показателем водородных ионов является рН 7,6-7,8. Несмотря на высокую устойчивость холерных вибрионов к щелочи, показания рН 9,0-10,0 являются

стрессовыми и требуют от микроорганизмов включения адаптационного антистрессового механизма.

При подборе методики стрессового влияния желчи на холерные вибрионы исходили из данных литературы, что у взрослого человека в течение суток в кишечник выделяется 600— 1000 мл желчи [121]. При использовании препарата сухой бычьей желчи произведен перерасчет этого количества на сухой вес, который составил 40-60 мг на 1 мл кишечного содержимого.

Для имитации газового состава тонкого отдела кишечника человека, создавали микроаэрофильные условия (содержание кислорода 10-12% и диоксида углерода 5-6%). При определении уровня антилактоферриновой активности после действия комбинированного стресса (таблица 13), наблюдалось адаптивное увеличение уровня АЛФА практически у всех изученных штаммов вибрионов Эль Тор и O139 серогруппы в среднем на 36% от исходных показателей. У классических холерных вибрионов, в одном случае наблюдалось незначительное повышение уровня АЛФА, у штамма с нулевым значением показателя не изменились.

Таблица 13 - Показатели уровня АЛФА после действия комбинированного стресса

№ п/п	Штаммы		Гены		АЛФА нг/мл исходные	АЛФА нг/мл после комбинированного стресса
			<i>ctxAB</i>	<i>tcpA</i>		
1.	<i>V.cholerae</i> <i>classical</i>	437	+	+	40	45
2.		569 В	+	+	0	0
3.	<i>V.cholerae</i> <i>O139</i>	16065	+	+	56	85
4.		18772	-	-	55	80

Таблица 13 (продолжение)

5.	<i>V. cholerae El Tor</i>	18775	-	+	100	100
6.		18418	+	+	75	84
7.		18750	-	-	78	97
8.		18257	-	+	93	100
9.		17899	-	-	75	92
10.		18774	-	-	40	85

Проведенные эксперименты показали, что на первом этапе патогенеза холеры при попадании вибрионов в желудок, где на них бактериостатически воздействует соляная кислота, популяции клеток при выраженном стрессовом воздействии и в отсутствие лактоферрина не нужна АЛФА, они стремятся просто выжить.

Условия в тонком кишечнике, где реализуется комплекс всех свойств, участвующих в патогенезе холеры, приводит, в том числе, к активации антилактоферриновой активности, что свидетельствует о важности данного признака. Можно предположить, что указанные стрессовые условия являются сигналом для холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп для повышения активности факторов, участвующих в реализации АЛФА.

В результате было показано, что продукция лактоферрина и антилактоферриновая активность являются индуцибельными признаками, поскольку в зависимости от клинических проявлений в макроорганизме их показания адаптивно меняются. Сохранение высоких значений АЛФА у потенциально патогенных и апатогенных штаммов свидетельствует о роли этого признака в персистенции возбудителя холеры в макроорганизме и, возможно, формировании вибриононосительства.

Таким образом, показано, что все холерные вибрионы в разной степени обладают антилактоферриновой активностью. Были выявлены достоверные различия в уровнях АЛФА у *Vibrio cholerae El Tor*, *Vibrio cholerae O139* и *Vibrio cholerae classical*. Наибольший показатель отмечен в группе Эль Тор вибрионов, несколько ниже – у вибрионов O139

серогруппы, холерные вибрионы классического биовара или не обладают АЛФА, или демонстрируют очень слабую активность.

У эпидемически значимых вибрионов Эль Тор, выделенных от больных, зарегистрированы высокие показатели АЛФА, что косвенно указывает на роль антилактоферриновой активности в патогенезе холеры. Потенциально эпидемически опасные вибрионы ЭльТор, обладают максимально выраженной способностью к продукции АЛФА, что свидетельствует о значительной роли этого признака в персистенции холерных вибрионов с генотипом *ctxAB⁻tcpA⁺*.

Установлено наличие прямой коррелятивной связи АЛФА с признаками персистенции, характерными для холерных вибрионов Эль Тор, выделенных от людей. С признаками персистенции, характерными для вибрионов, изолированных из объектов окружающей среды, корреляция практически отсутствовала или была слабой.

Глава 4 ИЗУЧЕНИЕ ПРИРОДЫ АНТИЛАКТОФЕРРИНОВОЙ АКТИВНОСТИ

4.1 Исследование роли лектинов в антилактоферриновой активности

Знакомясь с литературой, касающейся выяснения взаимоотношений микроорганизмов с макроорганизмами, т.е. пространственного взаимодействия отдельных микробных клеток и различных субстратов, позволяющих популяции оптимальным образом организовывать процессы жизнедеятельности и выживать в окружающей среде, мы выяснили, что в качестве биосенсоров, детектирующих определенные углеводные последовательности, могут выступать лектины, являющиеся специфическими лигандами в углевод-белковом взаимодействии [87, 3, 83, 47].

Лектины – это протеины или гликопротеины, не относящиеся к классу иммунных, способные к обратимому связыванию с углеводной частью гликоконъюгатов без нарушения ковалентной структуры любых из узнаваемых гликозильных лигандов [61, 71, 117].

Лектины были обнаружены в растительном, животном мире, а также у микроорганизмов [88, 218].

Специфичность взаимодействия лектинов с молекулами определяется характерной углеводной группой, например, терминальным остатком галактозы, маннозы и т.п. (рисунок 6). В связи с этим один и тот же лектин может взаимодействовать с различными гликопротеинами, содержащими данную углеводную группу [88]. Лектины, входя в структуру тканей животных, растений, микроорганизмов, принимают участие в регулировании их метаболизма, так и в защите от некоторых агентов внешней среды.

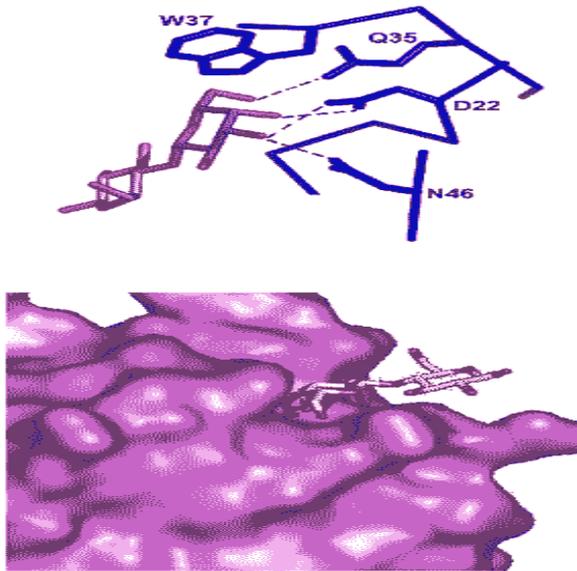


Рисунок 6 - Схема взаимодействия лектина с молекулой углевода (в данном случае с производным сахара галактозы) [91]

При этом распознавание «врага» идет с обеих сторон. Так, клеточные лектины, расположенные на мембране или в цитоплазме макроорганизма, узнают патогенные микроорганизмы, связывают их и подавляют рост и размножение; в свою очередь микроорганизмы с помощью собственных лектинов могут узнавать и связывать субстраты, действующие на возбудителя бактерицидно или бактериостатически.

В настоящее время доказано, что все холерные вибрионы Эль Тор и Бенгал (токсигенные и атоксигенные) обладают лектиновыми рецепторами, специфичными гексозам – глюкозе, маннозе, галактозе; гемолитические атоксигенные штаммы *V.cholerae O1* и *O139*, наряду с рецепторами гексоз, обладают лектинами, специфичными аминасахарам: Д-глюкозамину, Д-галактозамину, N-ацетил-Д-глюкозамину, которые полностью отсутствуют у токсигенных штаммов [85, 71].

На изучение роли лектинов в детекции лактоферрина нас побудили сведения P.Rouge, C.Chatelain, D. Pere [231] о белок-углеводной связи маннозоспецифичного растительного лектина *конканавалина А* с трансферрином (сывороточным белком плазмы крови, который, так же как и лактоферрин, входит в группу трансферринов).

Как известно, лактоферрин содержит 3% гексоз, 1% гексозамина и особенно богат маннозой [63], т.е. потенциальная связь лактоферрина с лектинами, расположенными на поверхности клеток холерных вибрионов, вполне может быть реализована.

Для уточнения роли лектинов холерных вибрионов в процессе связывания лактоферрина мы провели опыты по изучению возможности их рецепции с различными углеводами из группы гексоз (маннозой, глюкозой и галактозой), аминсахаров (Д-глюкозамином и Д-галактозамином) и определения на этом фоне уровня антилактоферриновой активности.

В работе было использовано восемь штаммов холерных вибрионов (два - *V.cholerae* O1c генотипом $ctxAB^+tcpA^+$, выделенные от больных холерой; два - *V.cholerae* O1c генотипом $ctxAB^-tcpA^+$ от вибрионосителей; два штамма из речной воды, лишённые генов токсина - и пилеобразования $ctxAB^-tcpA^-$; один токсигенный штамм *V.cholerae* O139, выделенный от больного $ctxAB^+tcpA^+$, и один – нетоксигенный, выделенный из речной воды, $ctxAB^-tcpA^-$).

Результаты представлены в таблице 14 и на рисунках 7-9.

Таблица 14 - Влияние взаимодействия холерных вибрионов с углеводами на уровень АЛФА

Штаммы	Источник выделения	Место выделения	Гены патогенности	Сахар	АЛФА (нг/мл)	Снижение показаний АЛФА (в %)
<i>V. cholerae</i> El Tor 18374	больной	Казань	$ctxAB^+tcpA^+$	-	75	
				манноза	15	80,0
				глюкоза	38	49,3
				галактоза	40	46,7
				Д-глюкозамин	56	25,3
				Д-галактозамин	60	20,0
<i>V. cholerae</i> El Tor 17471	больной	Кизляр	$ctxAB^+tcpA^+$	-	75	
				манноза	14	81,3
				глюкоза	37	50,7
				галактоза	41	45,3
				Д-глюкозамин	57	24,0
				Д-галактозамин	59	21,3

Таблица 14 (продолжение)

<i>V. cholerae</i> El Tor 18821	носитель	Каменск	<i>ctxAB⁻tcpA⁺</i>	-	94	
				манноза	12	87,2
				глюкоза	40	57,4
				галактоза	48	49,0
				Д-глюкозамин	65	30,9
				Д-галактозамин	69	26,6
<i>V. cholerae</i> El Tor 18257	носитель	Астрахань	<i>ctxAB⁻tcpA⁺</i>	-	93	
				манноза	11	88,2
				глюкоза	42	54,8
				галактоза	45	51,6
				Д-глюкозамин	63	32,3
				Д-галактозамин	66	29,0
<i>V. cholerae</i> El Tor 17899	вода открытого водоема	р. Темерник	<i>ctxAB⁻tcpA⁻</i>	-	75	
				манноза	23	69,3
				глюкоза	37	50,7
				галактоза	44	41,3
				Д-глюкозамин	47	37,3
				Д-галактозамин	53	29,3
<i>V. cholerae</i> El Tor 18777	вода открытого водоема	р. Дон	<i>ctxAB⁻tcpA⁻</i>	-	79	
				манноза	24	69,6
				глюкоза	39	49,4
				галактоза	48	39,2
				Д-глюкозамин	50	36,7
				Д-галактозамин	52	30,7
<i>V. cholerae</i> O139 16065	больной	Азов	<i>ctxAB⁺tcpA⁺</i>	-	56	
				манноза	10	82,1
				глюкоза	18	67,9
				галактоза	31	44,6
				Д-глюкозамин	42	25,0
				Д-галактозамин	44	21,4
<i>V. cholerae</i> O139 18925	вода	р. Ангара	<i>ctxAB⁻tcpA⁻</i>	-	57	
				манноза	18	68,4
				глюкоза	22	61,4
				галактоза	33	42,1
				Д-глюкозамин	42	26,3
				Д-галактозамин	43	24,6

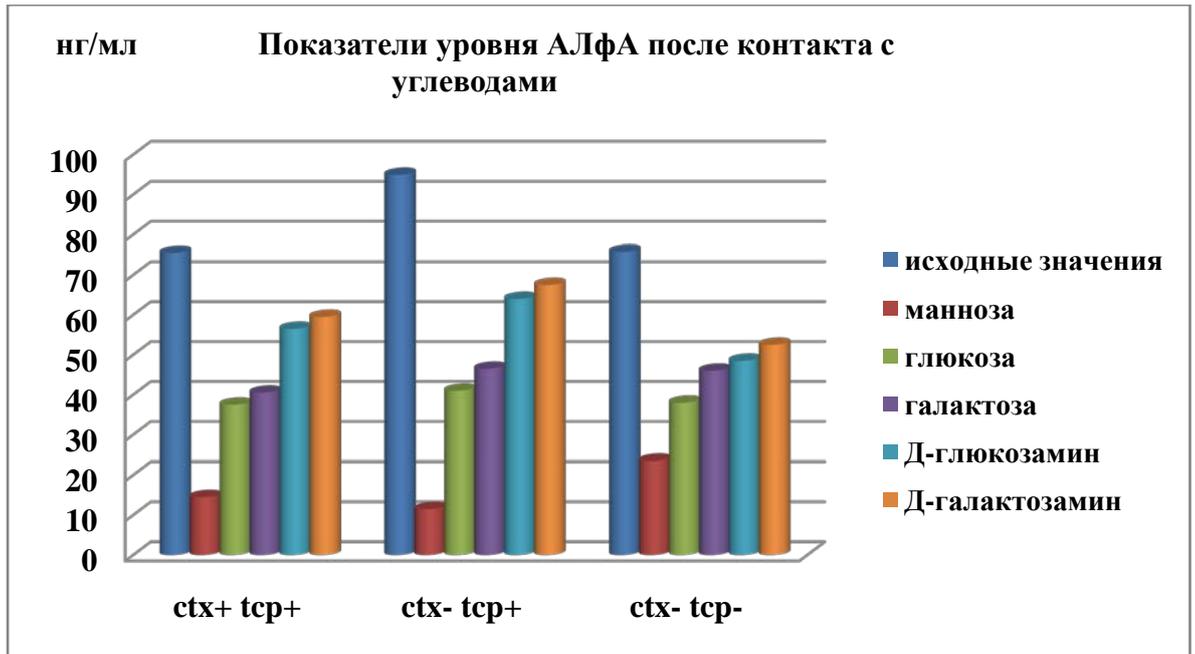


Рисунок 7 - Снижение показателей АЛФА у *V.cholerae O1* после контакта с углеводами (нг/мл)

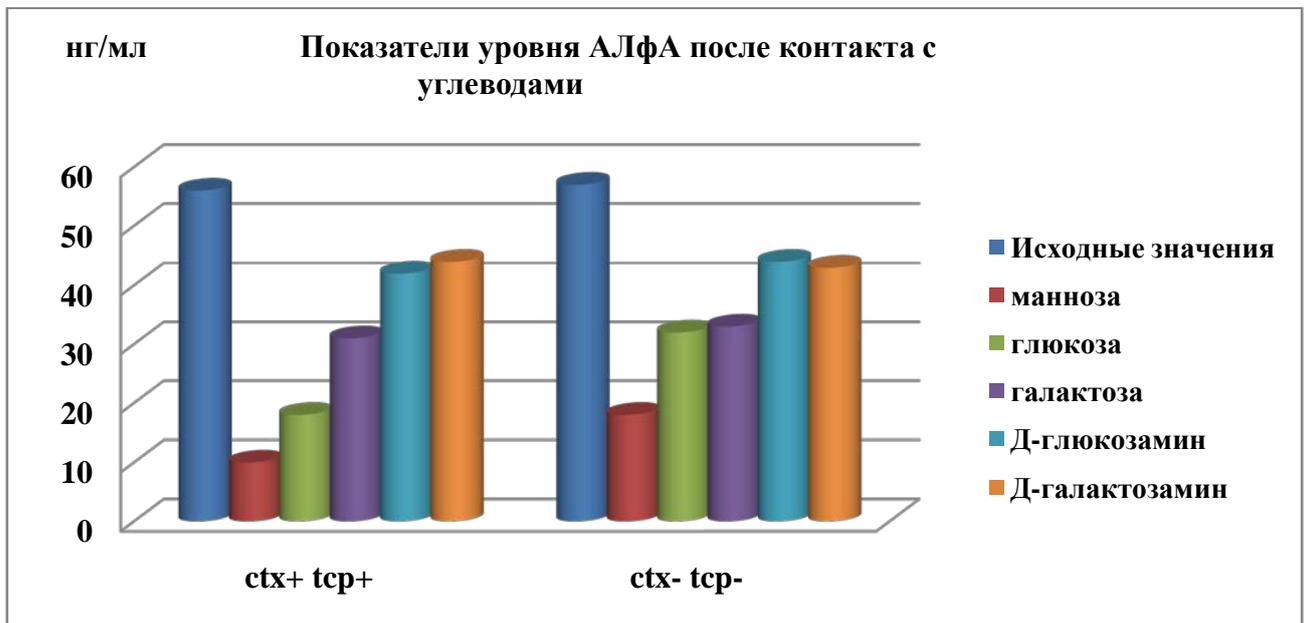


Рисунок 8 - Снижение показателей АЛФА у *V.cholerae O139* после контакта с углеводами (нг/мл)

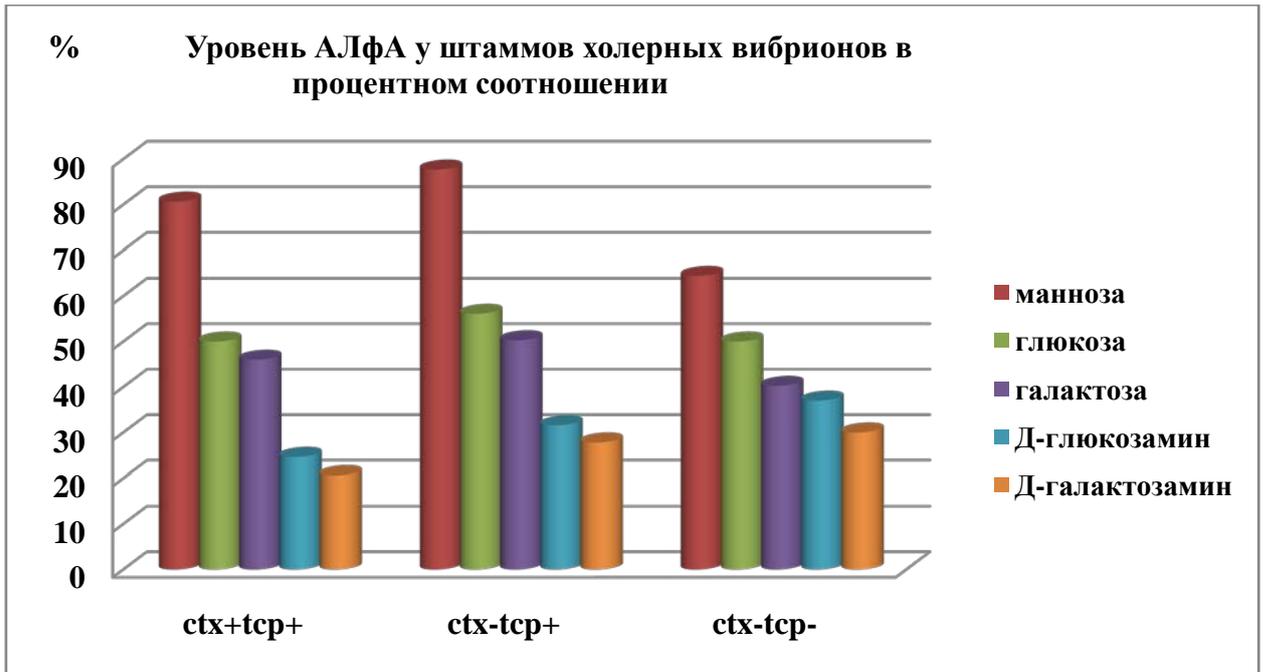


Рисунок 9 - Снижение показателей АЛФА после контакта с углеводами (в %)

У всех изученных штаммов наблюдалось снижение уровня АЛФА после инкубации с различными углеводами, но в различной степени.

Так, при изучении влияния маннозы на последующее определение АЛФА было показано, что этот углевод обладал наиболее выраженной связующей активностью при взаимодействии как с холерными вибрионами O1 серогруппы, так и с вибрионами O139 серогруппы, что выразилось впоследствии в резком снижении антилактоферриновой активности как в количественных, так и в процентных показателях: у токсигенных штаммов (*ctxAB⁺tcpA⁺*) O1 серогруппы на 80-81,3% (15 и 14 нг/мл против 75 нг/мл в контроле), O139 серогруппы – на 82,1% (10 нг/мл против 56 нг/мл в контроле).

У нетоксигенных (*ctxAB⁻tcpA⁻*) штаммов показатели снижения были также достаточно высокими, но более низкими, чем у токсигенных штаммов (69,3-69,6%; 23-24 нг/мл против 75-79 нг/мл в контроле - у *V.cholerae* O1 и 68,4% (18 нг/мл против 57 нг/мл в контроле) - у *V.cholerae* O139).

Особый интерес в этом плане вызывают потенциально эпидемически опасные штаммы (*ctxAB⁺tcpA⁺*), обладающие, по нашим данным, наиболее высокой АЛФА. У этих штаммов после контакта с маннозой антилактоферриновая активность снизилась на 87,2-88,2% (12 и 11 нг/мл против 94 и 93 нг/мл в контроле). Эти результаты могут свидетельствовать о роли маннозочувствительных пилей адгезии, являющихся, по данным автора [112] лектинами, в связывании лактоферрина, богатого маннозой.

Достаточно высокой связующей активностью обладали глюкоза и галактоза. После контакта с глюкозой у токсигенных штаммов О1 и О139 серогрупп отмечено снижение АЛФА на 49,3-67,9% (с 75 и 56 нг/мл, соответственно, в контроле, до 37-38 и 22 нг/мл в опыте), у атоксигенных – на 49,4-61,4% (с 75-79 и 57 нг/мл, соответственно, в контроле, до 37-39 и 22 нг/мл - в опыте). У потенциально патогенных штаммов О1 серогруппы после контакта с глюкозой отмечено снижение антилактоферриновой активности на 54,8-57,4% (42 и 40 нг/мл против 93 и 94 нг/мл – в опыте).

Галактозоспецифические лектины после взаимодействия с этим углеводом также обуславливали снижение АЛФА, но в более низком проценте, чем при взаимодействии с глюкозой. Так у *ctxAB⁺tcpA⁺* штаммов обеих серогрупп показатели снижения составляли 44,6-46,7% (31 и 40-41 нг/мл - в опыте против 56 и 75 нг/мл – в контроле), у нетоксигенных – 39,2-42,1% (33 и 44-48 нг/мл – в опыте против 57 и 75-79 нг/мл – в контроле). Как и при исследовании вышеуказанных углеводов, наиболее активными в отношении галактозы оказались потенциально эпидемически опасные штаммы, у которых наблюдалось снижение АЛФА на 49-51,6% (с 93-94 нг/мл - в контроле до 45-48 нг/мл - в опыте).

Что касается аминсахаров (глюкозамина и галактозамина), то выраженного снижения антилактоферриновой активности после контакта с ними не отмечено, при этом более активными в этом отношении были нетоксигенные штаммы О1 серогруппы (36,7-37,3% снижения, с 79 и 75 нг/мл до 47-50 нг/мл - после контакта с глюкозамином; 29,3-30,7%

снижения, до 52-53 нг/мл - после инкубации с галактозамином). У токсигенных штаммов показатели снижения были еще более низкими (24,0-25,3%, с 75 до 57 и 56 нг/мл - после контакта с глюкозамином, 20,0-21,3%, до 60 и 59 нг/мл – с галактозамином). У потенциально патогенных штаммов показатели снижения колебались от 30,9 до 32,3% (с 94 и 93 до 65, 63 нг/мл) после контакта с глюкозамином и от 26,6 до 29% (до 66-69 нг/мл) - после контакта с галактозамином).

Штаммы холерных вибрионов O139 серогруппы практически не отличались от вибрионов Эль Тор (у токсигенного штамма процент снижения активности после контакта с глюкозамином составлял 25,0% (с 56 до 42 нг/мл), галактозамином – 21,4% (до 44 нг/мл), у нетоксигенного – 26,3% (с 57 до 42 нг/мл после контакта с глюкозамином), 24,6% (до 43 нг/мл) – после галактозамина).

Поскольку все указанные углеводы являются составной частью лектинов [115], можно предположить, что в качестве рецепторов они могут принимать участие в реализации АЛФА, связывая лактоферрин. Вероятно, это первый этап в нейтрализации и последующем расщеплении ЛФ. Но антилактоферриновая активность у холерных вибрионов связана, на наш взгляд, не только с лектинами.

4.2 Роль гемагглютинин/протеазы в антилактоферриновой активности

Установлено, что в процессе адаптации к защитным факторам хозяина у микроорганизмов возникли механизмы устойчивости к лактоферрину [39]. Автор, как и W. Bellamy [150], В. Е. Britigan [154], С. Тома [247], предполагает, что ведущим фактором устойчивости к лактоферрину является его инактивация с помощью протеаз. Какая именно из протеаз холерного вибриона участвует в данном механизме, неизвестно. Имеется сообщение R.A.Finkelstein [174], что гемагглютинин/протеаза расщепляет лактоферрин на два крупных фрагмента, но при этом антимикробная активность у белка сохраняется.

Гемагглютинин/протеаза (НА/Р) – ключевая протеаза холерных вибрионов, была впервые описана как растворимый гемагглютинин, выделенный из культуральной жидкости штамма SA401 [175]. Считалось, что она функционирует как лектин. Однако в последующих работах сведения о лектиновой природе НА/Р не приводились, более того, при анализе, проведенном с помощью программы VectorNTISuit 9, лектиновый домен в ее молекуле не был обнаружен [94].

На сегодняшний день установлено, что НА/Р представляет собой растворимую, цинк-зависимую металлопротеазу [152, 237].

Эти сведения позволили нам предположить, что в механизме антилактоферриновой активности участвует гемагглютинин/протеаза, осуществляющая протеолиз связанного лектинами лактоферрина.

Для подтверждения этого предположения было изучено взаимодействие препарата НА/Р (любезно предоставленного д.б.н. Е.В. Монаховой) с лактоферрином (коммерческий препарат фирмы Sigma) с помощью белкового электрофореза в 7,5% полиакриламидном геле. Результаты электрофореза представлены на рисунке 10.

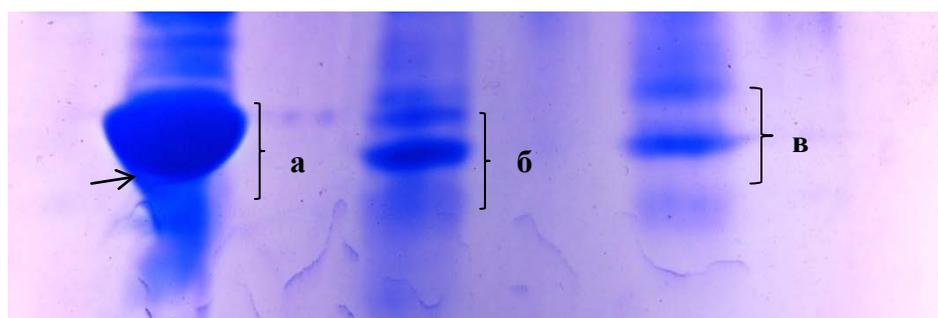


Рисунок 10 - Расщепление лактоферрина ферментом гемагглютинин/протеазой

а - лактоферрин 100 нг/мл

б – лактоферрин через 4 часа после контакта с НА/Р

в - лактоферрин через 24 часа после контакта с НА/Р

Процесс расщепления ЛФ можно было наблюдать в динамике: после 4 часов отмечено начало распада лактоферрина и после 24 - окончательное

формирование двух крупных фрагментов.

Для подтверждения участия гемагглютинин/протеазы в АЛФА был определен уровень ее активности в ИФА с помощью тест-системы «Лактоферрин» у штамма кишечной палочки, несущего в своем геноме клонированный ген *hapA* *E.coli* pHP61 и параллельно - у штамма *E.coli* pQE30, не имеющего его (штаммы любезно предоставлены для данного эксперимента д.б.н. Е.В. Монаховой). Опыты проведены в повторности. Результаты представлены в таблице 15.

Таблица 15 - Уровень антилактоферриновой активности у штаммов *E.coli*

hapA⁺ и *hapA*⁻

№ п/п	Штаммы	АЛФА нг/мл
1.	<i>E.coli</i> pQE30 (<i>hapA</i> ⁻)	30-35
2.	<i>E.coli</i> pHP61 (<i>hapA</i> ⁺)	70-65

Как видно из таблицы, уровень АЛФА у штамма *hapA*⁺ почти в два раза выше, чем у *hapA*⁻, что свидетельствует об участии продуцируемой штаммом *E.coli* pHP61(*hapA*⁺) гемагглютинин/протеазы в расщеплении лактоферрина (70-65 против 30-35) и, тем самым - в реализации АЛФА.

Таким образом, было показано, что в реализации механизма антилактоферриновой активности принимают участие, как минимум, две составляющих – лектины холерных вибрионов, осуществляющие рецепцию протеинов или гликопротеинов с углеводной частью гликоконъюгатов лактоферрина, и гемагглютинин/протеаза, расщепляющая лактоферрин на два крупных фрагмента.

4.3 Исследование генов протеаз холерных вибрионов для установления их роли в АЛФА

Несмотря на то, что гемагглютинин/протеазой обусловлено до 90% суммарной протеолитической активности холерных вибрионов [243, 252], в геноме последних содержится как минимум еще 14 генов известных и

предполагаемых протеаз [94], причастность которых к АЛФА никем не изучалась.

Для определения возможности участия в АЛФА других протеаз, помимо *hapA*, ввиду отсутствия соответствующих ферментов, было изучено наличие генов протеаз, с которыми связывают персистенцию микроорганизмов: *tagA*, кодирующий продукцию муциназы, способствующей адгезии холерных вибрионов [244], *VC1649*, кодирующего продукцию сериновой протеазы, участвующей в деструкции ворсин и повреждении слизистой кишечника [243], *VC1650* – коллагеназы, вероятного фактора персистенции в различных экологических нишах, *prtV* – протеазы, способной вызывать гибель питающихся бактериями нематод [252], а так же генов *mshA* (маннозочувствительные пили адгезии), *hapA* (НА/Р) и *hapR* (регуляторного белка). Результаты проведенных исследований представлены в таблице 16.

Таблица 16 - Результаты ПЦР-детекции генов у холерных вибрионов

Штаммы <i>V. cholerae</i>	Группы	Кол-во	Наличие генов в группах штаммов (в %)*						Среднее значение АЛФА в группе нг/мл
			<i>hapR</i>	<i>tagA</i>	<i>prtV</i>	<i>VC 1649</i>	<i>VC 1650</i>	<i>mshA</i>	
<i>El Tor</i>	<i>ctxAB⁺tcpA⁺</i>	19	100	100	90	90	90	84	66,45
	<i>ctxAB⁻tcpA⁺</i>	13	100	100	92	100	100	61	96,5
	<i>ctxAB⁻tcpA⁻</i>	15	100	0	53	40	93	33	72,62
<i>classical</i>	<i>ctxAB⁺tcpA⁺</i>	9	67	100	100	22	67	56	20,1
<i>O139</i>	<i>ctxAB⁺tcpA⁺</i>	4	100	100	100	100	100	100	40,25
	<i>ctxAB⁻tcpA⁻</i>	8	100	100	100	100	100	0	58,5

*видоспецифичный ген *hapA* в таблице не указан, т.к. присутствует у всех штаммов.

Все изученные штаммы, вне зависимости от биовара, серогруппы и эпидемиологической значимости содержали в своем геноме

видоспецифичный ген *hapA*, что свидетельствует о его высокой потенциальной способности вызывать гидролиз белков, в том числе лактоферрина.

Но при этом обращает на себя внимание, что в группе классических холерных вибрионов, обладающих очень низкой антилактоферриновой активностью (20,1 нг/мл) лишь у 67% штаммов обнаружен ген *hapR* – положительный регулятор *hapA*, у остальных вибрионов с высокой и средней АЛФА эти гены присутствовали в 100% случаев.

Возможно, у части классических вибрионов низкий уровень АЛФА связан именно с отсутствием *hapR*, который также необходим и для «запуска» транскрипции гена *prtV*, выявленного у всех штаммов этой группы. Ген *prtV* присутствовал у большинства *ctxAB⁺tcpA⁺* и *ctxAB⁻tcpA⁺* и лишь у половины *ctxAB⁻tcpA⁻* штаммов Эль Тор, что не отразилось на их антилактоферриновой активности обусловленной, вероятно, в основном НА/Р.

Ген *tagA* был выявлен только у штаммов, содержащих *tcpA*, что вполне естественно, поскольку оба входят в состав острова патогенности *VPI*. *TagA* имеет узкий спектр субстратной специфичности, она активна по отношению к муцину, не расщепляет казеин и желатину [247] и судя по тому, что лишенные *VPI* штаммы обладают высокой, а многие содержащие *VPI* – низкой АЛФА, очевидно, не имеет к ней отношения. Корреляция между частотой обнаружения генов *VC1649* и *VC1650* и показателями АЛФА также отсутствовала.

Анализ распространения в группах штаммов генов *mshA*, кодирующих маннозочувствительные пили адгезии, свидетельствует об определенной зависимости частоты их встречаемости от эпидемической значимости штаммов – наиболее часто они обнаруживаются у *ctxAB⁺tcpA⁺* и *ctxAB⁻tcpA⁺* вариантов (56-100%), гораздо реже – у *ctxAB⁻tcpA⁻* (0-33%). Если говорить о зависимости показаний АЛФА от частоты обнаружения генов *mshA*, то на первый взгляд она отсутствует, поскольку корреляции между

ними нет. Можно предположить (учитывая результаты наших опытов по блокированию маннозочувствительных рецепторов [75], что маннозочувствительные пили, не могут нейтрализовать лактоферрин, а участвуют только в его связывании.

Проведенное исследование показало, что основная роль в расщеплении лактоферрина принадлежит гемагглютинин/протеазе. Лектины выполняют роль связующего звена. Вместе с тем, следует иметь в виду, что разные штаммы могут обладать неодинаковой способностью к экспрессии различных генов, в том числе и кодирующих синтез протеолитических ферментов. Поэтому невозможно однозначно ответить на вопрос о том, обладает ли НА/Р абсолютной «монополией» на АЛФА, либо имеет «дублеров» на случай повреждения генов *hapA/hapR*, как это имеет место у генов некоторых токсинов, различающихся по структуре, но сходных функционально [94].

ГЛАВА 5 ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ АНТИЛАКТОФЕРРИНОВОЙ АКТИВНОСТИ В АДГЕЗИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

Как показали проведенные нами исследования, большинство изученных штаммов холерных вибрионов в той или иной степени обладают антилактоферриновой активностью, т.е. могут разрушать белок лактоферрин. Возникает вопрос – какова в этой связи роль АЛФА в патогенезе холеры или в процессе персистенции возбудителя в организме человека? Рассматривая литературу, освещающую все основные свойства лактоферрина, мы обратили внимание на способность этого белка препятствовать процессу микробной адгезии и колонизации [206, 268, 235, 194, 216, 217, 168, 169, 267].

В основе антиадгезивных свойств лактоферрина лежит гидролиз и инактивация секреторных белков *EspA*, *B*, *D* [221, 270], которые при обычных условиях инъецируются в клетку и убивают ее. В случае с *H. influenzae* и *A. actinomycetem comitans* ЛФ разрушает два бактериальных адгезирующих фактора и транспортные белки соответственно [224, 190, 230], что нарушает процесс адгезии. По-видимому, преинкубация ЛФ с клетками, что приводит к связыванию этого белка с мембранными молекулами глюкозамингликана или гепарансульфата, не является обязательным при ингибировании адгезии Грам+ и Грам- бактерий. Многочисленные эксперименты демонстрируют, что наиболее важен контакт ЛФ непосредственно с бактерией и последующей сорбцией на мембране микроорганизма. Некоторые исследователи рассматривают третий путь, когда ЛФ связывается и с клетками хозяина, и с бактерией [253].

Поэтому, если лактоферрин препятствует микробной адгезии, а холерные вибрионы обладают способностью этому препятствовать, т.е. обладают антилактоферриновой активностью, то в этом и заключается роль АЛФА в адгезии холеры, и, следовательно, в патогенезе.

А, как известно, в патогенезе любой инфекции, в том числе и холеры, адгезия играет важнейшую роль, и выяснение факторов и условий реализации этого процесса, в частности, роли в нем антилактоферриновой активности может способствовать совершенствованию наших знаний о патогенном и персистентном потенциале этого возбудителя, поскольку сведений о прямой или опосредованной роли АЛФА в механизме адгезии в литературе практически нет.

С учетом вышеизложенного необходимо было изучить адгезивную активность коллекции штаммов холерных вибрионов на наиболее адекватной клеточной модели, подходящей для этих целей; сравнить уровни адгезивной и антилактоферриновой активностей и определить наличие корреляционных связей между ними. На основании полученных данных сделать вывод о наличии или отсутствии роли АЛФА в адгезии холерных вибрионов.

5.1 Изучение уровня адгезии холерных вибрионов на культурах клеток Нер-2 и NuTu 80

Ранее для определения уровня адгезии исследователи предлагали различные модели. Известен способ определения адгезивной способности вибрионов с использованием эритроцитов [108], метод определения адгезии холерных вибрионов к эпителию кишечника кролика [73]. Предложен «Способ выявления эпидемически значимых холерных вибрионов *Vibrio cholerae El Tor* и *Vibrio cholerae O139* по их адгезивной способности» [116] с использованием эритроцитов человека. Данные способы определения уровня адгезии холерных вибрионов трудоемки, дорогостоящи, не удовлетворяют требованиям биоэтики, методы на основе эритроцитов не являются адекватной моделью, поскольку холера не является инвазивной инфекцией.

Альтернативой вышеперечисленным способам является метод оценки уровня адгезии на модели перевиваемых клеточных культур. Объем информации о преимуществах этого метода как наиболее технологичного,

объективного, точного и удовлетворяющего требованиям биоэтики растёт с каждым годом. Одно из важных преимуществ клеточных моделей заключается в возможности работы с коллекционными перевиваемыми линиями клеток с известными свойствами. За рубежом их применяют для изучения адгезии вибрионов, аэромонад, кишечной палочки [159, 246, 162]. Преимущества клеточных линий связаны, прежде всего, с тем, что они паспортизированы и не теряют своих свойств при криоконсервировании в течение любых по длительности сроков хранения.

Для решения поставленных задач были последовательно изучены культуры клеток Нер-2 (человек, эпидермоидная карцинома гортани; рисунок 11), а затем HuTu 80 (человек, аденокарцинома двенадцатиперстной кишки; рисунок 12). Для определения уровня адгезии у холерных вибрионов, культура клеток HuTu 80 использовалась впервые. На данный способ изучения адгезивной активности оформлен патент на изобретение.

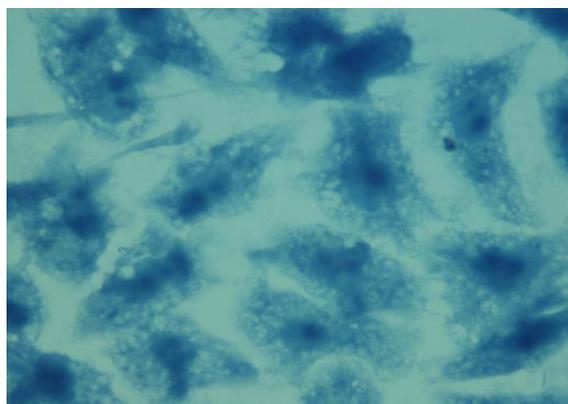


Рисунок 11 - Культура клеток Нер-2 (контроль)

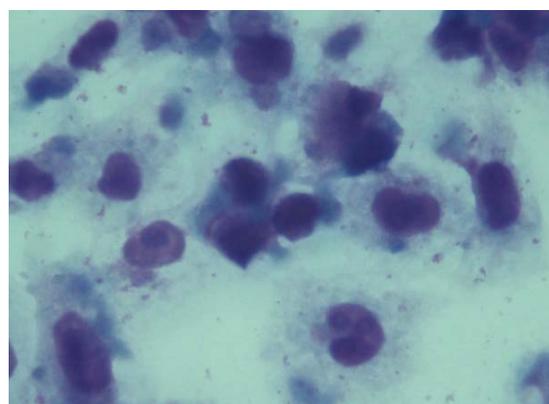


Рисунок 12 - Культура клеток HuTu 80(контроль)

В работе по оценке адгезивной активности использовано 20 штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы классического и Эль Тор биоваров и вибрионы O139 серогруппы. Оценка индекса адгезии: >20 – высокоадгезивный штамм; от 10 до 20 – средне- адгезивный штамм; <10 – низкоадгезивный штамм.

Результаты определения уровня адгезии исследуемых штаммов на культуре клеток Нер-2 представлены в таблице 17. Как видно из

представленных в таблице данных, все изученные штаммы обладали определенным уровнем адгезии. В основном, показатели были средними или низкими, штаммов с высокими показателями адгезии на этой модели не выявлено (рисунки 13,14). Но при этом наиболее высокими (по критериям оценки – средними) показателями характеризовались классические вибрионы.

Таблица 17 - Показатели уровня адгезии у штаммов холерных вибрионов на культуре клеток Нер – 2

Штаммы		Наличие генов	Источник выделения	Показатели адгезии					
<i>V.cholerae</i> <i>classical</i>	437	<i>ctxAB⁺tcpA⁺</i>	Больные	17,94	14,9				
	1077			14,73					
	569 В			12,37					
	792			13,24					
	1601			16,28					
<i>V.cholerae</i> <i>O139</i>	16065	<i>ctxAB⁺tcpA⁺</i>	Больные	4,86	4,9	4,4			
	17258			4,94					
	18772	<i>ctxAB⁻tcpA⁻</i>	Вода открытых водоемов	3,95	3,9				
	18925			3,78					
<i>V.cholerae</i> <i>El Tor</i>	18374	<i>ctxAB⁺tcpA⁺</i>	Больные	5,09	10,2	11,6			
	17471			16,03					
	18775								
	17427	<i>ctxAB⁺tcpA⁺</i>	Носители	13,49	13,01				
	18257			10,69					
	18750			10,14					
	18781			12,92					
	18821			17,78					
	18774			<i>ctxAB⁻tcpA⁻</i>			Вода открытых водоемов	9,1	10,6
	17899							11,01	
18777	11,73								

Показатели составили от 12,37 до 17,94 все штаммы выделены от больных. Показатель среднего значения в группе составил 14,9.

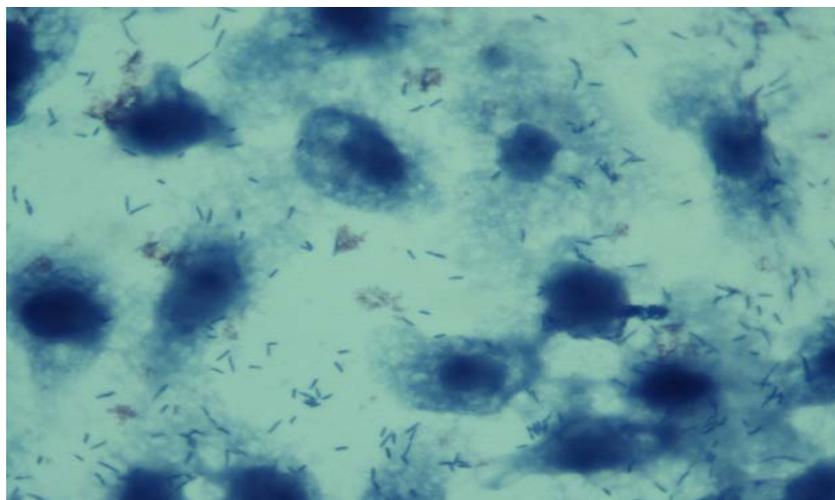


Рисунок 13 - Средний уровень адгезии на культуре клеток Нер-2
V.cholerae classical 1077

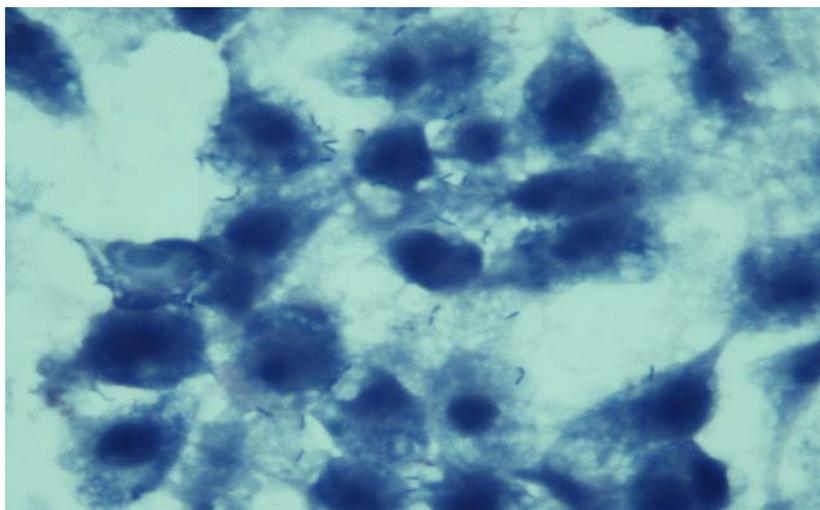


Рисунок 14 - Низкий уровень адгезии на культуре клеток Нер-2
V.cholerae O139 18925

Наиболее низкими показателями обладали штаммы холерных вибрионов O139 серогруппы от 3,78 до 4,94; средний показатель в группе составил 4,4. При этом, показатели уровня адгезии были низкими как у штаммов, выделенных от людей, так и из воды.

В группе вибрионов Эль Тор значения колебались от 5,09 до 17,78; средний показатель в группе составил 11,6.

С учетом довольно низких показателей на Нер-2 методику по определению уровня адгезии для сравнения отработали на культуре клеток NuTu 80 (более адекватной для наших экспериментов кишечной модели).

В таблице 18 представлены результаты изучения уровней адгезии у штаммов холерных вибрионов на культуре клеток NuTu 80.

Таблица 18 - Показатели уровня адгезии у штаммов холерных вибрионов на культуре клеток NuTu 80

Штаммы		Наличие генов	Источник выделения	Показатели адгезии	
<i>V.cholerae classical</i>	437	<i>ctxAB⁺ tcpA⁺</i>	Больные	26,42	21,14
	1077			22,61	
	569 В			16,64	
	792			20,15	
	1601			19,86	
<i>V.cholerae 0139</i>	16065	<i>ctxAB⁺ tcpA⁺</i>	Больные	4,12	4,6
	17258			5,11	
	18772	<i>ctxAB⁻ tcpA⁻</i>	Вода открытых водоемов	5,03	4,88
	18925			4,73	
<i>V.cholerae El Tor</i>	18374	<i>ctxAB⁺ tcpA⁺</i>	Больные	16,02	18,34
	17471			15,09	
	18775			23,91	
	17427	<i>ctxAB⁺ tcpA⁺</i>	Носители	17,03	18,61
	18257			20,36	
	18750			10,36	
	18781			24,46	
	18821			20,83	
	18774	<i>ctxAB⁻ tcpA⁻</i>	Вода открытых водоемов	8,03	10,57
	17899			13,51±6,2	
18777	10,17±4,3				

Как видно из таблицы, тенденция, выявленная на культуре клеток Нер-2, сохранялась и на культуре клеток NuTu 80, но показатели адгезии у

классических и Эль Тор вибрионов на этой модели были значительно выше. Поэтому все остальные эксперименты проводили на этой культуре клеток. В группе классических вибрионов показатели варьировали от 16,64 до 26,42, т.е. были практически во всей группе высокими (рисунок 15) (среднее значение 21,14). У вибрионов, относящихся к O139 серогруппе, показатели на культуре клеток HuTu 80, как и на Нер-2, были низкими, от 4,12 до 5,11 (средний показатель 4,7).

При этом показатели были невысокими, независимо от групп штаммов (выделенных от больных и из воды открытых водоемов), примерно одинаковыми и составляли 4,6 и 4,88, соответственно (рисунок 17).

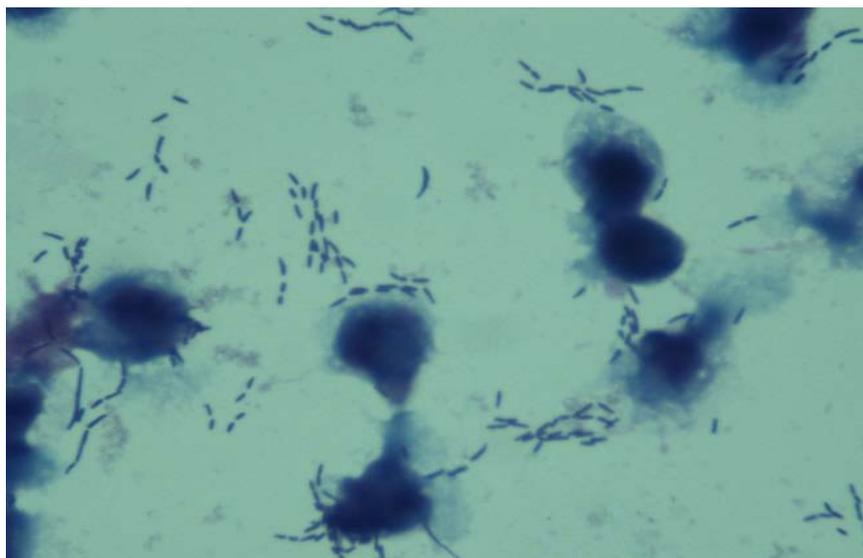


Рисунок 15 - Высокий уровень адгезии на культуре клеток HuTu 80
V.cholerae El Tor 18775

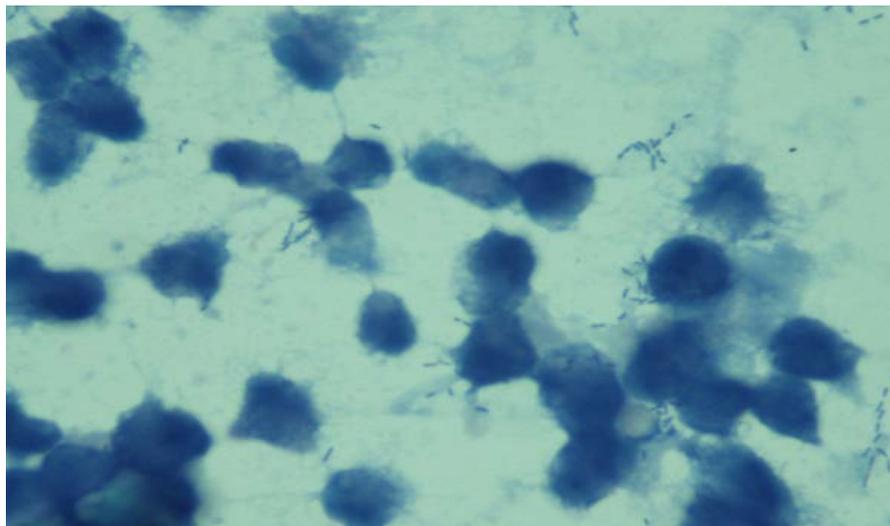


Рисунок 16 - Средний уровень адгезии на культуре клеток HuTu 80
V.cholerae El Tor 18374

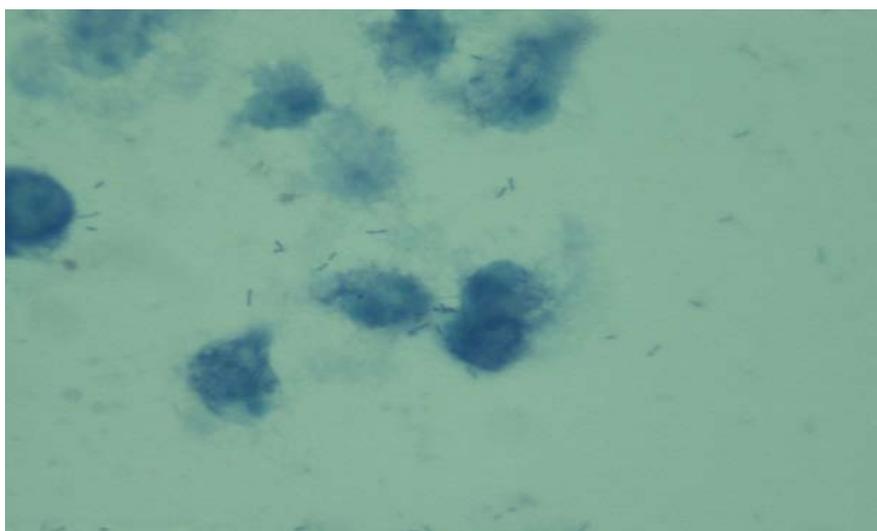


Рисунок 17 - Низкий уровень адгезии на культуре клеток HuTu 80
V.cholerae O139 16065

Причиной столь низкой активности у вибрионов O139 серогруппы может служить мощная капсула, маскирующая адгезивные рецепторы на поверхности клеток.

В группе Эль Тор вибрионов, выделенных из разных источников показатели на клеточной модели HuTu 80 колебались от среднего (рисунок 16) до высокого (10,17- 24,46) (рисунок 15). Уровень адгезии у штаммов,

выделенных от больных и носителей, характеризовался достаточно высокими, одинаковыми показателями (18,34 и 18,61, соответственно), у штаммов, выделенных из воды открытых водоемов, - показатель более низкий (10,57).

При ранжировании штаммов вибрионов Эль Тор по эпидемической значимости результаты выглядели следующим образом (таблица 19). Обращает на себя внимание, что у патогенных ($ctxAB^+ tcpA^+$) и потенциально патогенных ($ctxAB^- tcpA^+$) холерных вибрионов показатели адгезии были практически в 1,5-2 раза выше, чем у авирулентных ($ctxAB^- tcpA^-$) штаммов. Это можно объяснить, в первую очередь, наличием у первых токсинкорегулируемых пилей адгезии, отсутствующих у $ctxAB^- tcpA^-$ *V.cholerae El Tor*. Но между эпидемически опасными и потенциально эпидемически опасными также имеется разница в значениях.

Таблица 19 - Показатели уровня адгезии у штаммов Эль Тор на культуре клеток NuTu 80, ранжированных по эпидемической значимости

Штаммы		Наличие генов	Показатели адгезии	
<i>V.cholerae El Tor</i>	17427	$ctxAB^+ tcp^+$	17,03	16,05
	17471		15,09	
	18374		16,02	
	18775	$ctxAB^- tcp^+$	23,91	22,39
	18821		20,83	
	18781		24,46	
	18257		20,36	
	18750	$ctxAB^- tcp^-$	10,36	10,52
	18774		8,03	
	17899		13,51	
	18777		10,17	

Более высокими показателями обладали штаммы холерных вибрионов с генотипом $ctxAB^- tcpA^+$ (22,39). Такие потенциально эпидемически опасные штаммы (у которых отсутствуют гены $ctxAB$, но имеются гены $tcpA$)

обладают высоким адгезивным потенциалом, вероятно, не только за счет токсинкорегулируемых пилей адгезии, поскольку они есть и у эпидемически значимых холерных вибрионов. Мы предполагаем, что у штаммов с генотипом $ctxAB^-tcpA^+$, имеются дополнительные факторы, способствующие их адгезии к эпителию кишечника, для того чтобы в отсутствие токсинообразования обеспечить персистенцию в организме человека. Возможно, не случайно именно эта группа штаммов коррелирует с высоким удельным весом вибрионосителей.

Средний же показатель адгезии согласовывается с показателями эпидемически значимых штаммов $ctxAB^+tcpA^+$, у которых основной детерминантой патогенности является продукция холерного токсина (16,05).

Как упоминалось ранее, наиболее низким показателем обладали авирулентные штаммы вибрионов Эль Тор с генотипом $ctxAB^-tcpA^-$ (10,52). Но, несмотря на отсутствие у данных штаммов гена $tcpA$, уровень адгезии у них (в соответствии с предложенными для оценки критериями) остается на среднем уровне, что дает основание предполагать участие, как уже сказано выше, в этом процессе других факторов, помимо токсинкорегулируемых пилей.

Как известно, за адгезию и колонизацию холерных вибрионов в кишечнике человека отвечают, в первую очередь, токсинкорегулируемые пили адгезии, кодируемые генами $tcpA$. Кроме них известны и другие пили, в частности, маннозочувствительные пили адгезии ($MSHA$), кодируемые генами $mshA$. В последние годы пили $MSHA$ считаются существенными факторами персистенции [12]. Учитывая вышеизложенное, можно предположить, что $MSHA$, наряду с токсинкорегулируемыми пиллями, могут принимать участие как в связывании лактоферрина [75], так и в адгезии холерных вибрионов.

В пользу этого предположения свидетельствует тот факт, что большинство изученных штаммов с генотипами $ctxAB^+tcpA^+$ и $ctxAB^-tcpA^+$ обладали генами $mshA$, кодирующими маннозочувствительные пили

адгезии (эти эксперименты выполнены с помощью к.м.н. А.С. Водопьянова и д.б.н. Е.В. Монаховой, за что мы приносим им искреннюю благодарность). У штаммов с генотипом $ctxAB^-tcpA^-$ тоже присутствовали гены маннозочувствительных пилей адгезии, наличием которых мы объясняем средний уровень адгезии у данной группы, но их количество в процентном соотношении было намного меньше, чем у $ctxAB^+tcpA^+$ и $ctxAB^-tcpA^+$ (33% по сравнению с 84% и 61% соответственно). Вероятно, у данных штаммов есть другие, пока еще неидентифицированные факторы, которые способствуют как АЛФА, так и адгезии данных штаммов (см. главу 4).

Несомненна и роль гемагглютинин/протеазы, расщепляющей лактоферрин и препятствующей тем самым адгезии этого белка на эпителиоцитах кишечника (гены *hapA* обнаружены у всех взятых в опыт штаммов холерных вибрионов).

Таким образом, можно предположить, что основные факторы, обуславливающие антилактоферриновую активность, одновременно являются и факторами, «участвующими» в адгезии холерных вибрионов. Подтвердить или опровергнуть данное предположение можно с помощью проведения сравнительного корреляционного анализа этих признаков.

5.2 Сравнительный анализ адгезивной и антилактоферриновой активностей

Для подтверждения роли АЛФА в адгезии холерных вибрионов был проведен сравнительный анализ показаний уровней АЛФА и адгезии у исследуемых штаммов с определением коэффициента корреляции между этими показателями (таблица 20). При сравнительном анализе полученных значений обращает на себя внимание отрицательный коэффициент корреляции -0,6 между уровнями АЛФА и адгезии у холерных вибрионов O139 серогруппы. Это может быть обусловлено, как показано выше, очень низким уровнем адгезии в этой группе вибрионов. У классических и Эль Тор вибрионов коэффициенты корреляции были достаточно высокими и составляли, соответственно, 0,76 и 0,82. Далее предстояло выяснить, влияет

ли источник выделения и набор генов патогенности (токсинообразования и пилей адгезии) на показания коэффициента корреляции у вибрионов Эль Тор.

Таблица 20 - Определение коэффициентов корреляции между адгезивной и антилактоферриновой активностями у холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп

Штаммы		Наличие генов	Значения уровня адгезии	Значения уровня АЛФА нг/мл	Коэффициент корреляции (КК)
<i>V.cholerae</i> <i>classical</i>	437	<i>ctxAB</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺	26,42	40	0,76
	1077		22,61	10	
	569 В		16,64	0	
	792		20,15	28	
	1601		19,86	0	
<i>V.cholerae</i> <i>O139</i>	16065	<i>ctxAB</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺	4,12	56	-0,6
	17258	<i>ctxAB</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺	5,11	24	
	18772	<i>ctxAB</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁻	5,03	55	
	18925	<i>ctxAB</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁻	4,73	57	
<i>V.cholerae</i> <i>El Tor</i>	18374	<i>ctxAB</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺	17,03	100	0,82
	17471	<i>ctxAB</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺	15,09	75	
	18775	<i>ctxAB</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺	16,02	75	
	17427	<i>ctxAB</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁺	23,91	100	
	18257	<i>ctxAB</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁺	20,83	94	
	18750	<i>ctxAB</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁺	24,46	100	
	18781	<i>ctxAB</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁺	20,36	93	
	18821	<i>ctxAB</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁻	10,36	78	
	18774	<i>ctxAB</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁻	8,03	40	
	17899	<i>ctxAB</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁻	13,51	75	
	18777	<i>ctxAB</i> ⁻ <i>tcpA</i> ⁻	10,17	79	

Группу классических холерных вибрионов не рассматривали, т.к. источник выделения этих штаммов был один (больные холерой) и все они имели генотип *ctxAB*⁺ *tcpA*⁺.

При сравнении показаний АЛФА и адгезивной активности с помощью корреляции, в группах штаммов выделенных из разных источников (таблица 21), определили наличие прямой зависимости.

Таблица 21 - Определение коэффициентов корреляции (КК) между адгезивной и антилактоферриновой активностями у холерных вибрионов Эль Тор, выделенных из разных источников

Штаммы <i>V.cholerae</i> <i>El Tor</i>	Источник выделения	Показатели адгезии	Уровень АЛФА	Коэффициент корреляции (КК)
18374	Больные	16,02	75	0,99
17471		15,09	75	
18775		23,91	100	
17427	Носители	17,03	100	0,8
18257		20,36	93	
18750		10,36	78	
18781		24,46	100	
18821		20,83	94	
18774	Вода открытых водоемов	8,03	40	0,74
17899		13,51	75	
18777		10,17	79	

Так, у штаммов, изолированных от больных, КК был наиболее высок и равнялся 0,99, высоким был КК у штаммов, выделенных от вибрионосителей (0,8), более низкие значения имели место у штаммов, выделенных из воды открытых водоемов (0,74).

При анализе полученных результатов по эпидемической значимости также была выявлена прямая корреляционная связь между рассматриваемыми показателями (таблица 22). Максимально высокие значения АЛФА и адгезивной активности в группе потенциально патогенных штаммов (*ctxABtcpA*⁺) обусловили и максимально высокий коэффициент корреляции (0,99).

Таблица 22 - Определение коэффициентов корреляции между адгезивной и антилактоферриновой активностями у холерных вибрионов Эль Тор, ранжированных по эпидемической значимости

Штаммы <i>V.cholerae</i> <i>El Tor</i>	Наличие генов	Значения уровня адгезии	Значения уровня АЛФА нг/мл	Коэффициент корреляции (КК)
17427	<i>ctxAB⁺tcpA⁺</i>	17,03	100	0,88
17471		15,09	75	
18374		16,02	75	
18775	<i>ctxAB⁻tcpA⁺</i>	23,91	100	0,99
18821		20,83	94	
18781		24,46	100	
18257		20,36	93	
18750	<i>ctxAB⁻tcpA⁻</i>	10,36	78	0,67
18774		8,03	40	
17899		13,51	75	
18777		10,17	79	

Приближающиеся к нему показания КК (0,88) зарегистрированы в группе патогенных штаммов (*ctxAB⁺tcpA⁺*).

В группе непатогенных штаммов (*ctxAB⁻tcpA⁻*), показатель корреляции был существенно ниже, чем у патогенных и потенциально эпидемически опасных холерных вибрионов, но, тем не менее, достигал средних показателей (0,67).

Полученные результаты свидетельствуют, что имеется выраженная прямая корреляционная связь между этими показателями – высокие значения адгезивной активности соответствовали высоким значениям АЛФА и наоборот. Все вышесказанное свидетельствует, что антилактоферриновая активность, в основе которой лежит связывание и инактивация лактоферрина, способствует процессу адгезии холерных вибрионов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АиГА - антииммуноглобулиновая активность
АИА – антиинтерфероновая активность
АКА – антикомплементарная активность
АЛА – антилизоцимная активность
АЛфА – антилактоферриновая активность
кЛФ – коровий Лактоферрин
кЛФц – коровий Лактоферрицин
Лф – лактоферрин
Лф-цин - Лактоферрицин
РНК-аза – РНК-азная активность
рчЛф – рекомбинантный человеческий Лф
УПМ – условно - патогенные микроорганизмы
УрО РАН – Уральское отделение Российской Академии Наук
чЛФ – человеческий Лактоферрин
чЛФц – человеческий Лактоферрицин
Нер2 – человек, эпидермоидная карцинома гортани
HuTu80 – человек, аденокарцинома двенадцатиперстной кишки
 α -ЛА – α -лактальбумин
DMEM – среда Игла в модификации Дульбекко

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С учетом продолжающейся эволюции *V.cholerae*, приведшей, с одной стороны, к формированию гибридных высокопатогенных вариантов, с другой – появлению потенциально эпидемически опасных вибрионов с характерными биологическими особенностями (в том числе, высоким удельным весом вибрионосителей), изучение персистентного потенциала и механизмов, определяющих этот процесс, позволяет получить новые данные о генетических и фенотипических особенностях этого возбудителя и экологических аспектах его персистенции. Исследования в этом направлении начаты в Ростовском противочумном институте сравнительно недавно, но уже была доказана роль ряда факторов, способствующих адаптации холерных вибрионов в различных биотопах [125,123,126,124, 10,101, 74 ,110].

Появились работы, что антилактоферриновая активность может быть причислена к составу маркеров персистенции [40,38]. Однако, до настоящего момента вопросом изучения роли АЛФА в реализации персистентного потенциала возбудителя холеры никто не занимался.

В связи с этим нами была проведена работа, направленная на изучение вопросов, касающихся роли антилактоферриновой активности, как в патогенезе холеры, так и в выяснении значимости данного признака для *V.cholerae*, персистирующих в различных экологических нишах (организме человека и объектах окружающей среды), установления наличия или отсутствия корреляции АЛФА с другими признаками патогенности и персистенции, выяснения природы и генетической детерминированности АЛФА у холерных вибрионов.

Было установлено, что все холерные вибрионы в разной степени обладают антилактоферриновой активностью. При этом были выявлены достоверные различия в уровнях АЛФА у *Vibrio cholerae El Tor*, *Vibrio*

cholerae O139 и *Vibrio cholerae classical*. Наиболее высокий показатель был зарегистрирован в группе Эль Тор вибрионов, несколько ниже – у вибрионов O139 серогруппы, холерные вибрионы классического биовара практически не обладали АЛФА. Это свидетельствует о роли данного признака для возбудителей холеры, сформировавшихся до и в период седьмой пандемии холеры и характеризующихся высоким персистентным потенциалом.

Полученные результаты позволили сравнить активность данного фактора в группах штаммов *V.cholerae El Tor*, различающихся по источнику выделения и по эпидемической значимости.

Было установлено, что у вибрионов Эль Тор, выделенных от больных, вибрионосителей и сточной воды, средние показатели АЛФА были высокими, штаммы, выделенные из воды открытых водоемов, характеризовалась средней активностью. Это указывает на бóльшую роль АЛФА в персистенции холерных вибрионов в организме человека, чем в объектах окружающей среды.

Особый интерес в этих опытах представляли штаммы, выделенные от больных и вибрионосителей в 2005 году в Каменском районе Ростовской области, которые характеризовались очень высокой антилактоферриновой активностью (81-100 нг/мл). Поскольку в этой группе штаммов 94% составляли культуры, выделенные от вибрионосителей, можно высказать предположение, что высокая антилактоферриновая активность у холерных вибрионов способствует формированию вибриононосительства (являющегося одним из основных «показателей» персистенции) особенно у штаммов, лишенных генов токсинопродукции, но сохранивших (или приобретших) гены токсинкорегулируемых пилей адгезии (*ctxAB*⁻*tcpA*⁺). Это предположение нашло дополнительное подтверждение при анализе АЛФА у штаммов холерных вибрионов, ранжированных по эпидемической значимости. Максимально высокие показатели АЛФА были зарегистрированы именно в группе потенциально эпидемически опасных

(*ctxAB⁻tcpA⁺*) вибрионов.

Показатели в группах эпидемически значимых вибрионов (*ctxAB⁺tcpA⁺*) и атоксигенных вибрионов (*ctxAB⁻tcpA⁻*) отличались незначительно. В этой связи можно предположить, что антилактоферриновая активность является фактором, способствующим развитию патогенеза или персистенции в зависимости от задач, которые «ставит перед собой» холерный вибрион (либо «закрепиться» в кишечнике человека и осуществить выброс токсина, вызвав холеру (*ctxAB⁺tcpA⁺* варианты)), либо способствовать длительной (вибриононосительство) или краткосрочной персистенции (*ctxAB⁻tcpA⁺* и *ctxAB⁻tcpA⁻*).

У вибрионов O139 серогруппы ни один из изученных штаммов не обладал высокой АЛФА. Максимальные показатели были у штаммов, изолированных из сточной воды. У больных эти показатели были средними. Холерные вибрионы, выделенные из воды открытых водоемов, также обладали средним показателем АЛФА, лишь немного превышающим показатели антилактоферриновой активности у штаммов, выделенных от больных. Вероятно, причина сравнительно низкой АЛФА у данной группы штаммов, заключается в капсуле, которая создает препятствие для связи лактоферрина с поверхностными структурами вибрионов и предохраняет тем самым возбудитель холеры от его воздействия.

Уровень АЛФА у классических холерных вибрионов, выделенных от больных или умерших от холеры, либо отсутствовал совсем, либо имел низкие значения. По-видимому, особенности патогенеза классической холеры, вызванной высокотоксичными штаммами, не привели к необходимости использования этого фактора для инициации заболевания.

О роли антилактоферриновой активности в патогенезе и персистенции холерных вибрионов служат данные по сравнению АЛФА у представителей II группы патогенности и условно-патогенной микрофлоры. У последних показатели были ниже, чем у холерных вибрионов O1 и O139 серогруппы в среднем на 40-47%. Вероятно, особенности и тяжесть клинического течения

при холере, обуславливают выраженную индукцию так называемых «малых факторов» патогенности, играющих важную роль в персистенции холерных вибрионов в организме человека и объектах окружающей среды, в том числе и АЛФА. Так, по сравнению с другими энтеробактериями, у возбудителя холеры Эль Тор наблюдается также более высокая антилизоцимная и супероксиддисмутазная активности [125, 110, 111].

При оценке уровней корреляционных связей между АЛФА и другими свойствами, обуславливающими персистенцию, установлено, что антилактоферриновая активность обладает прямой корреляционной связью с признаками, характерными для холерных вибрионов Эль Тор, выделенных от людей (антикомплементарной активностью и билирезистентностью). С признаками персистенции, характерными для вибрионов, изолированных из объектов окружающей среды (антилизоцимной и РНК-азной активностями), практически отсутствовала или была слабой. Это подтверждает, что антилактоферриновая активность может рассматриваться как новый признак в составе «персистентного потенциала» холерных вибрионов, активность которого зависит от источника выделения и эпидемической значимости.

В ходе определения уровней лактоферрина и АЛФА у холерных вибрионов Эль Тор при инфекционном процессе *in vivo* на модели кроликов-сосунков было установлено, что показатели лактоферрина и антилактоферриновой активности, в зависимости от клинических проявлений в макроорганизме, адаптивно менялись. Развитие холерогенного синдрома при заражении кроликов токсигенными холерными вибрионами сопровождалось адаптивным повышением уровня лактоферрина и снижением уровня АЛФА; энтеропатогенный синдром (при заражении потенциально-патогенным штаммом) сопровождался повышением уровня лактоферрина при сохранении исходных предельно высоких значений АЛФА. Нетоксигенный штамм не вызывал изменений значений лактоферрина, но у него также повышалась АЛФА.

Было изучено влияние на АЛФА кислотного (имитация кислого содержимого желудка) и комбинированного (кислота, щелочное содержимое кишечника, желчи и микроаэрофильных условий) стрессов. Проведенные исследования показали, что кислотный стресс оказывает влияние на антилактоферриновую активность – у *V.cholerae O139* ее уровень снизился в среднем на 53%, у штаммов *V.cholerae El Tor*, выделенных от больных, АЛФА снижалась на 36%, от носителей - на 47% и из воды открытых водоемов - на 57%. У классических холерных вибрионов изменений в уровнях АЛФА при кислотном стрессе не наблюдалось. При определении уровня антилактоферриновой активности после действия комбинированного стресса наблюдалось адаптивное увеличение уровня АЛФА практически у всех изученных штаммов вибрионов Эль Тор и O139 серогруппы в среднем на 36% от исходных показателей. В то время, как при действии кислотного стресса у классических холерных вибрионов, изменений в уровнях АЛФА не наблюдалось.

Из этого можно сделать заключение, что при попадании вибрионов в желудок, где на них бактериостатически воздействует соляная кислота, популяции клеток при выраженном стрессовом воздействии и в отсутствие лактоферрина не нужна АЛФА, они стремятся просто выжить. Условия в тонком кишечнике, где реализуется комплекс всех свойств, участвующих в патогенезе холеры или персистенции вибрионов, приводит, в том числе, к активации антилактоферриновой активности, что свидетельствует о значимости данного признака.

В результате было показано, что продукция лактоферрина и антилактоферриновая активность являются индуцибельными признаками, поскольку в зависимости от клинических проявлений в макроорганизме их показатели меняются. Сохранение высоких значений АЛФА у потенциально патогенных и апатогенных штаммов свидетельствует о роли этого признака в персистенции возбудителя холеры в макроорганизме и, возможно, формировании вибриононосительства.

Важным этапом в выполнении работы было изучение природы антилактоферриновой активности. Прежде всего, предстояло выяснить, участвуют ли в этом процессе в качестве специфических лигандов лактоферрина лектины, которые в качестве биосенсоров детектируют определенные углеводные последовательности. На изучение роли лектинов в детекции лактоферрина нас побудили сведения P.Rouge, C.Chatelain, D. Pere [231] о белок-углеводной связи маннозоспецифичного растительного лектина конканавалина А с трансферрином (сывороточным белком плазмы крови, который, так же как и лактоферрин, осуществляет транспорт ионов железа). Как известно, лактоферрин особенно богат маннозой [63]. Для уточнения роли лектинов холерных вибрионов в процессе связывании лактоферрина были проведены опыты по изучению возможности их рецепции с различными углеводами из группы гексоз (маннозой, глюкозой и галактозой), аминсахаров (Д-глюкозамином и Д-галактозамином) и определения на этом фоне уровня антилактоферриновой активности. У всех изученных штаммов наблюдалось снижение уровня АЛФА после инкубации с различными углеводами, но максимально выраженное - в опытах с маннозой, что свидетельствует о потенциальной возможности связи маннозоспецифичных лектинов холерных вибрионов с лактоферрином.

Следующим этапом было определение роли гемагглютенин/протеазы в реализации антилактоферриновой активности. При постановке электрофореза с препаратами нативного лактоферрина и лактоферрина после контакта с гемагглютенин/протеазой было показано, что фермент, (как ранее показали R.A.Finkelsteinetal. [174]), вызывает расщепление белка на два фрагмента. Кроме того, для доказательства участия этого фермента в АЛФА, был определен уровень ее активности у штамма кишечной палочки, несущего в своем геноме клонированный ген гемагглютенин/протеазы *hapA*⁺ (*E.colipHP61*) и параллельно у штамма, не несущего его (*E.colipQE30*). Было установлено, что уровень АЛФА у штамма *hapA*⁺ почти в два раза выше, чем у *hapA*⁻, что свидетельствует об участие

гемагглютинин/протеазы в расщеплении лактоферрина и, тем самым - в реализации АЛФА. Таким образом, было показано, что в реализации механизма антилактоферриновой активности могут принимать участие, как минимум, две составляющих – лектины холерных вибрионов, осуществляющие рецепцию протеинов или гликопротеинов с углеводной частью гликоконъюгатов лактоферрина, и расщепляющая лактоферрин гемагглютинин/протеаза.

Для определения возможности участия в АЛФА других протеаз, помимо *hapA*, ввиду отсутствия соответствующих ферментов, было изучено наличие генов протеаз, с которыми связывают персистенцию микроорганизмов: *tagA*, кодирующий продукцию муциназы, способствующей адгезии холерных вибрионов, *VC1649*, кодирующего продукцию сериновой протеазы, участвующей в деструкции ворсин и повреждении слизистой кишечника, *VC1650* – коллагеназы, вероятного фактора персистенции в различных экологических нишах, *prtV* – протеазы, способной вызывать гибель питающихся бактериями нематод, а так же генов *mshA* (маннозочувствительные пили адгезии), *hapA* (НА/Р) и *hapR* (регуляторного белка).

Все изученные штаммы содержали в своем геноме видоспецифичный ген *hapA*, но при этом обращает на себя внимание, что в группе классических холерных вибрионов, обладающих очень низкой антилактоферриновой активностью лишь у 67% штаммов обнаружен ген *hapR* – положительный регулятор НА/Р, у остальных вибрионов с высокой и средней АЛФА эти гены присутствовали в 100% случаев. Возможно, у классических вибрионов низкий уровень или отсутствие АЛФА связаны именно с отсутствием *hapR*, который также необходим и для «запуска» транскрипции гена *prtV*, выявленного у всех штаммов этой группы. Ген *prtV* присутствовал у большинства *ctxAB⁺tcpA⁺* и *ctxAB⁻tcpA⁺* и лишь у половины *ctxAB⁻tcpA⁻* штаммов Эль Тор, что не отразилось на их антилактоферриновой активности, обусловленной, в основном, НА/Р. Ген *tagA* был выявлен только

у штаммов, содержащих *tcpA*, что вполне естественно, поскольку оба входят в состав острова патогенности *VPI*. Судя по тому, что лишенные *VPI* штаммы обладают высокой, а многие содержащие *VPI* – низкой АЛФА, этот ген, очевидно, не имеет к ней отношения. Корреляция между частотой обнаружения генов *VC1649* и *VC1650* и показателями АЛФА также отсутствовала.

Анализ распространения в группах штаммов генов *mshA*, кодирующих маннозочувствительные пили адгезии, свидетельствует об определенной зависимости частоты их встречаемости от эпидемической значимости штаммов – наиболее часто они обнаруживаются у *ctxAB⁺tcpA⁺* и *ctxAB⁻tcpA⁺* вариантов, гораздо реже – у *ctxAB⁻tcpA⁻*. Если говорить о зависимости показаний АЛФА от частоты обнаружения генов *mshA*, то на первый взгляд она отсутствует, поскольку корреляции между ними нет. Можно предположить (учитывая результаты наших опытов по блокированию маннозочувствительных рецепторов) [75], что маннозочувствительные пили не могут нейтрализовать лактоферрин, а участвуют только в его связывании.

Проведенное исследование показало, что основная роль в расщеплении лактоферрина все же принадлежит гемагглютинин/протеазе. Лектины выполняют роль связующего звена. Вместе с тем, следует иметь в виду, что разные штаммы могут обладать неодинаковой способностью к экспрессии различных генов, в том числе и кодирующих синтез протеолитических ферментов. Поэтому невозможно однозначно ответить на вопрос о том, обладает ли *HA/P* абсолютной «монополией» на АЛФА, либо имеет «дублеров» на случай повреждения генов *hapA/hapR*, как это имеет место у генов некоторых токсинов, различающихся по структуре, но сходных функционально [94].

В связи со способностью лактоферрина препятствовать микробной адгезии и колонизации была изучена адгезивная активность холерных вибрионов на модели культуры клеток HuTu 80 с целью определения наличия или отсутствия корреляционных связей между этим важным

признаком и АЛФА для решения вопроса о ее роли в адгезии холерных вибрионов. Наиболее высокие показатели адгезии наблюдались у классических холерных вибрионов, средние - у вибрионов Эль Тор. Значения у вибрионов O139 серогруппы были невысокими (причиной может служить капсула, маскирующая адгезивные рецепторы на поверхности вибрионов этой серогруппы).

У патогенных вибрионов Эль Тор ($ctxAB^+tcpA^+$) и потенциально патогенных ($ctxAB^-tcpA^+$) холерных вибрионов показатели адгезии были практически в 1,5-2 раза выше, чем у авирулентных ($ctxAB^-tcpA^-$) штаммов. Это можно объяснить, в первую очередь, наличием у первых токсинкорегулируемых пилей адгезии, отсутствующих у $ctxAB^-tcpA^-$ *V.choleraeElTor*. Наиболее высокими показателями обладали штаммы холерных вибрионов с генотипом $ctxAB^-tcpA^+$. Потенциально эпидемически опасные штаммы обладают высоким адгезивным потенциалом, вероятно, не только за счет токсинкорегулируемых пилей адгезии, поскольку они есть и у эпидемически значимых холерных вибрионов. Можно предположить, что маннозочувствительные пили адгезии (*MSHA*), наряду с токсинкорегулируемыми пиллями, также могут принимать участие как в связывании лактоферрина так и в адгезии холерных вибрионов.

В пользу этого предположения свидетельствует тот факт, что большинство изученных штаммов с генотипами $ctxAB^+tcpA^+$ и $ctxAB^-tcpA^+$ обладали генами *mshA*, кодирующими маннозочувствительные пили адгезии. У штаммов с генотипом $ctxAB^-tcpA^-$ тоже присутствовали гены маннозочувствительных пилей адгезии, наличием которых мы объясняем средний уровень адгезии у данной группы, но их количество в процентном соотношении было намного меньше, чем у $ctxAB^+tcpA^+$ и $ctxAB^-tcpA^+$. Вероятно, у данных штаммов есть другие, пока еще неидентифицированные факторы, которые способствуют как АЛФА, так и адгезии данных штаммов.

При сравнении показаний АЛФА и адгезивной активности была выявлена прямая корреляционная связь между рассматриваемыми

показателями. Максимально высокие значения АЛФА и адгезивной активности в группе потенциально патогенных штаммов (*ctxAB⁻tcpA⁺*) обусловили и максимально высокий коэффициент корреляции. Приближающиеся к нему показания зарегистрированы в группе патогенных штаммов (*ctxAB⁺tcpA⁺*). В группе непатогенных штаммов (*ctxAB⁻tcpA⁻*), показатель корреляции был существенно ниже, чем у патогенных и потенциально эпидемически опасных холерных вибрионов, но, тем не менее, достигал средних показателей. Все вышесказанное свидетельствует, что антилактоферриновая активность, в основе которой лежит связывание и инактивация лактоферрина, способствует процессу адгезии холерных вибрионов.

Вышеизложенное дает основание говорить о роли антилактоферриновой активности как в патогенезе холеры, так и в персистенции холерных вибрионов (в качестве фактора, расщепляющего и инактивирующего лактоферрин и способствующего адгезии холерных вибрионов на поверхности тонкого кишечника). Высокие показатели АЛФА у потенциально эпидемически опасных вибрионов позволяют предположительно рассматривать ее как фактор, способствующий формированию вибриононосительства.

Полученные результаты являются вкладом в изучение биологии возбудителя холеры, а именно - в расшифровку особенностей и механизма персистенции *V.cholerae* в различных экологических нишах, что, несомненно, будет способствовать совершенствованию эпиднадзора за этой актуальной для здравоохранения инфекцией. Результаты исследования, патент, депонированный штамм, методические рекомендации, могут быть использованы специалистами-микробиологами, изучающими вопросы особенностей персистирования возбудителей инфекционных заболеваний в организме млекопитающих и в объектах окружающей среды.

ВЫВОДЫ

1. Холерные вибрионы в разной степени обладают антилактоферриновой активностью. Выявлены достоверные различия в уровнях АЛФА у *V.cholerae*, относящихся к разным биоварам и серогруппам. Наиболее высокий показатель зарегистрирован в группе Эль Тор вибрионов, несколько ниже – у вибрионов O139 серогруппы, у холерных вибрионов классического биовара АЛФА практически отсутствует.

2. Значения АЛФА у *V.cholerae El Tor* зависят от источника выделения и эпидемической значимости штаммов. У вибрионов, выделенных от больных, вибрионосителей и сточной воды, показатели АЛФА высокие и составляют 75,4 - 87,1 нг/мл. Штаммы, выделенные из воды открытых водоемов, характеризуются средней активностью (67,3 нг/мл). Максимально выраженной способностью к продукции антилактоферринового фактора обладают потенциально эпидемически опасные вибрионы Эль Тор с генотипом $ctxAB^-tcpA^+$. У эпидемически значимых штаммов ($ctxAB^+tcpA^+$) вибрионов Эль Тор и эпидемически не опасных штаммов с генотипом ($ctxAB^-tcpA^-$) наблюдаются высокие, приблизительно одинаковые показатели.

3. Установлено, что продукция лактоферрина и антилактоферриновая активность являются индуцибельными признаками, поскольку в зависимости от клинических проявлений в макроорганизме их значения адаптивно меняются.

4. Установлено наличие прямой корреляционной связи АЛФА с признаками персистенции, характерными для холерных вибрионов Эль Тор, выделенных от людей (антикомплементарной активностью и билирезистентностью). С признаками персистенции, характерными для вибрионов, изолированных из объектов окружающей среды

(антилизотимная и РНК-азная активности), корреляция практически отсутствовала или была слабой.

5. У всех изученных штаммов в различной степени имеет место снижение уровня АЛФА после инкубации с углеводами и аminosахарами. Наибольшая активность наблюдается в отношении маннозы, что свидетельствует о потенциальной возможности участия маннозоспецифичных лектинов холерных вибрионов рецепторной связи с лактоферрином, богатым маннозой.

6. Показано наличие прямой корреляционной связи между уровнем адгезии и АЛФА. Это свидетельствует о том, что антилактоферриновая активность, в основе которой лежит связывание и инактивация лактоферрина, способствует процессу адгезии холерных вибрионов и тем самым играет роль в патогенезе холеры.

7. Проведенный анализ на наличие у исследуемых штаммов холерных вибрионов генов протеаз и роли кодируемых ими белков в АЛФА показал, что основная роль в расщеплении лактоферрина принадлежит гемагглютинин/протезе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Азаматова, Э.К. Роль персистентных свойств микроорганизмов при хроническом тонзиллите у детей / Э.К. Азаматова, З.Ф. Хараева, Г.С. Мальцева // Российская оториноларингология.- 2011.- № 3.- С. 3.
2. Алексеева, Н.В. Разработка средств борьбы с биопленками: влияние препарата «Лапрот» (на основе человеческого лактоферрина) и антибиотика ципрофлоксацина на рост и процесс образования биопленок бактериями *Pseudomonas aeruginosa* in vitro / Н.В. Алексеева, Т.В. Степанова, Э.Р. Толордава, Ю.М. Романова // Медицинский алфавит. Лаборатория.- №3. - 2010.- С.6-11.
3. Алешин, В.Н. Лектины: свойства, сферы применения и перспективы исследования / В.Н. Алешин, В.Г. Лобанов, А.Д. Минакова // Известия вузов.- 2005.-№1.- С. 5- 7.
4. Анганова, Е.В. Антилизозимная активность бактерий водных экосистем / Е.В. Анганова, А.В. Духанина, Н.В. Ермолаева, Н.Н. Чемезова // Сибирский медицинский журнал.- Иркутск, 2010.- Т. 97, № 6.- С. 214-215.
5. Архангельская, И.В. ПЦР-детекция генов дополнительных факторов патогенности в геномах клинических штаммов холерных вибрионов не O1 /не O139 серогрупп, выделенных в Ростовской области / И.В. Архангельская, Н.Б. Непомнящая, Е.В. Монахова и др. // Холера и патоген. для человека вибрионы: Матер.пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2014. – Вып.27. – С.66-70.
6. Базарный, В.В. Клинико-диагностическое значение определения лактоферрина в ротовой жидкости / В.В. Базарный, Н.С. Береснева, О.Л. Ломова, Н.Е. Санникова // Клин.лаб. диагностика.-2011.- № 10.- С.36.
7. Базарный, В.В. Лактоферрин в ротовой жидкости пациентов с герпесвирусной инфекцией / В.В. Базарный, В.П. Журавлев, Ю.В. Мандра

и др. // Вестник уральской медицинской академической науки.- 2014.- №1.- С.48-49.

8. Бакшеева, С.С. Влияние неблагоприятных факторов окружающей среды на антибиотикорезистентность стафилококков, выделенных от резидентных бактерионосителей / С.С. Бакшеева // Вестник КрасГАУ.- 2013.- №10.- С.106-108.

9. Балахнова, В.В. К вопросу о природе антикомплементарной активности холерных вибрионов / В.В. Балахнова, Р.В. Писанов, И.Я. Черепахина и др. // Здоровье населения и среда обитания.- 2010.- №6.- С.14-16.

10. Балахнова, В.В. Роль антикомплементарной активности в реализации персистентных свойств холерных вибрионов / В.В. Балахнова, И.Я. Черепахина, Р.В. Писанов и др. // Здоровье населения и среда обитания.-2010.- №7.- С.11-14.

11. Балахонов, С.В. Эпидемиологический надзор за холерой в Сибири и на Дальнем Востоке на текущем этапе VII пандемии / С.В. Балахонов, Л.Я. Урбанович, Л.В. Миронова и др. // Холера и патоген. для человека вибрионы: Матер.пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2012.- Вып. 25.- С. 55-63.

12. Балахонов, С.В. Эпидемиологический надзор за холерой в Сибири и на Дальнем Востоке: результаты и направления совершенствования / С.В. Балахонов, Л.В. Миронова, Е.С. Куликалова и др. // Холера и патоген. для человека вибрионы: Матер.пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2014.- Вып.27.- С.28-35.

13. Баснакьян, И.А. Общие стрессорные белки у бактерий / И.А. Баснакьян // Журн. микробиол., эпидемиол. иммунол. - 2002.- № 5.- С. 92-97.

14. Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности): Санитарно-эпидемиологические правила СП

1.3.3118-13.- М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2014. – 150 с.

15. Боровик, Т.Э. Возможности использования лактоферрина человека в педиатрической практике / Т.Э. Боровик, Г.В. Яцык, Л.С. Намазова-Баранова и др. // Вопросы современной педиатрии.- Т.13.- №4.- 2014.-С.12-19.

16. Бродский, И.Б. Антимикробные, иммуномодулирующие и пребиотические свойства лактоферрина / И.Б. Бродский, В.М. Бондаренко, Н.Н. Томашевская и др. // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал).- 2013.-№4.- С.1-12.

17. Брудастов, Ю.А. Антикомплементарная активность бактерий: автореф. дис...канд. мед.наук : 03.00.07 / Брудастов Юрий Авенирович. - Челябинск, 1992. - 20 с.

18. Брудастов, Ю.А. Биологическое значение антикомплементарной активности бактерий / Ю.А. Брудастов, Д.Г. Дерябин // Журн. микробиол., эпидемиол. иммунол.- 1994, приложение (август-сентябрь).- С.28-31.

19. Бухарин, О.В. Биомедицинские аспекты персистенции бактерий / О.В. Бухарин // Журн. микробиол., эпидемиол. иммунол.- 1994, приложение (август-сентябрь).- С.4-14.

20. Бухарин, О.В. Персистенция бактериальных патогенов как результат отношений в системе паразит-хозяин / О.В. Бухарин // Журн. микробиол., эпидемиол. иммунол.- 1997.- №4.- С.3-9.

21. Бухарин, О.В. Персистенция патогенных бактерий / О.В. Бухарин // Екатеринбург, 1999.- 336 с.

22. Бухарин, О.В. Значение персистенции бактериальных патогенов для клинической практики / О.В. Бухарин // Российские медицинские вести.- 2000.- №3.- С.18-25.

23. Бухарин, О.В. Персистенция патогенных бактерий: теория и практика / О.В. Бухарин // Журн. микробиол., эпидемиол. иммунол.-2000.- №4.-С.4-7

24. Бухарин, О.В. Персистенция бактериальных патогенов как физиологический феномен / О.В. Бухарин // Вестн. Моск.ун-та. Сер.16. Биология.-2008.-№1.-С.6-13.
25. Бухарин, О.В. Факторы персистенции и (или) патогенности вибрионов и аэромонад различной экотопической принадлежности / О.В. Бухарин, А.В. Бойко, Л.А. Журавлева // Журн. микробиол., эпидемиол. иммунол.- 1998.- №5.- С.30-33.
26. Бухарин, О.В. Антилизосимная активность менингококков / О.В. Бухарин, С.Д. Борисов, Ю.В. Езепчук и др. // Журн. микробиол., эпидемиол. иммунол.- 1991.- №7.- С.17-20.
27. Бухарин, О.В. Изучение антикомплементарной активности стафилококков / О.В. Бухарин, Ю.А. Брудастов, Д.Г. Дерябин // Журн. Клин. лаб. диагност.-1992.-№3.-С.43-46.
28. Бухарин, О.В. Механизмы выживания бактерий / О.В. Бухарин, А.Л. Гинцбург, Ю.М. Романова и др. - М.: Медицина, 2005. – 367 с.
29. Бухарин, О.В. Экологическая детерминированность маркеров персистенции стафилококков / О.В. Бухарин, Д.Г. Дерябин // Журн. микробиол., эпидемиол. иммунол.- 1997.- №4.- С.60-63.
30. Бухарин, О.В. Антилактоферриновая активность микроорганизмов / О.В. Бухарин, О.Л. Карташова, С.Б. Киргизова, И.В. Вальшева // Журн. микробиол., эпидемиол. иммунол.- 2005.-№6. -С.7-10.
31. Бухарин, О.В. Коррекция микробиоциноза урогенетального тракта мужчин на фоне гормональной терапии / О.В. Бухарин, М.Д. Кузьмин, Ю.Б. Иванов // Журн. микробиол., эпидемиол. иммунол.- 2000.- №4 (приложение).- С.88-92.
32. Бухарин, О.В. Пат. 2203956 РФ. Способ определения антигистоновой активности микроорганизмов / О.В. Бухарин, А.О. Плотников, Н.В. Немцева, А.В. Сгибнев; № 2203956; заявл. 6.12.2001; опубл. 10.05.2003.

33. Бухарин, О.В. Биологическое значение антикарнозиновой активности бактерий / О.В. Бухарин, А.А. Стадников, О.Л. Чернова и др. // Журн. микробиол., эпидемиол. иммунол.- 2000.- №4.- С. 56-59.

34. Бухарин, О.В. Метод определения антилизоцимной активности микроорганизмов / О.В. Бухарин, Б.Я. Усвяцов, А.П. Малышкин, Н.В. Немцева // Журн. микробиол., эпидемиол. иммунол.- 1984.- №2.- С. 27-28.

35. Бухарин, О.В. Пат. 2236465 РФ. Способ определения антииммуноглобулиновой активности микроорганизмов / О.В. Бухарин, И.Н. Чайникова, А.В. Валышев и др.; № 2236465; заявл. 24.09.2002; опубл. 20.09.2004.

36. Бухарин, О.В. Пат. 2242756 РФ. Способ прогнозирования реконвалесцентного сальмонеллезного бактерионосительства / О.В. Бухарин, И.Н. Чайникова, А.В. Валышев и др.; № 2242756; заявл. 12.03.2003; опубл. 20.12.2004.

37. Бухарин, О.В. Пат. 2132879 РФ. Способ определения антикарнозиновой активности микроорганизмов / О.В. Бухарин, О.Л. Чернова, С.Б. Матюшина; заявл. 27.04.1998; опубл. 10.07.1999.

38. Валышев, А.В. Роль антилактоферриновой активности бактерий в их персистенции / А.В. Валышев, И.В. Валышева // Журн. микробиол., эпидемиол. иммунол.-2006.-№4.-С.23-25.

39. Валышева, И.В. Антилактоферриновая активность микроорганизмов из различных биотопов тела человека / И.В. Валышева // Региональная научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Оренбургской области (сборник материалов). – Ч. I. – Оренбург: РИК ГОУ ОГУ.- 2003. – С. 177-178.

40. Валышева, И.В. Антилактоферриновая активность микроорганизмов: автореф. дис... канд. биол. наук : 03.00.07 / Валышева Ирина Викторовна. - Оренбург, 2005.- 21 с.

41. Валышева, И.В. Новый метод определения антилактоферриновой активности микроорганизмов / И.В. Валышева, А.В. Валышев, О.Л.

Карташова и др. // Журн. микробиол., эпидемиол. иммунол. – 2003. - № 4. – С. 64-67.

42. Вальшева, И.В. Антилактоферриновая активность *Candida* species / И.В. Вальшева, А.В. Вальшев, О.Л. Карташова, О.В. Бухарин // Проблемы медицинской микологии. – 2004. – Т.6.- №2. – С.65.

43. Вахитов, Э.М. Характеристика бронхоассоциированной лимфоидной ткани легких крыс при их инфицировании бактериями с антилактоферриновой активностью / Э.М. Вахитов, Р.В. Безносик, И.В. Лабутин, А.Н. Козлова // Вестник Уральской Медицинской академической науки.-2012.-№4.-С.21.

44. Воробьева, А.А. Клинико-патогенетическое значение лактоферрина, ферритина и церулоплазмينا при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки / А.А. Воробьева // Автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Астрахань.- 2006.- 20 с.

45. Герман, Г.П. Иммунохимическое определение лактоферрина человека / Г.П. Герман, Н.В. Лаврова, Л.А. Шерер // Журн. микробиол., эпидемиол. иммунол.- 1983.-№9.- С.17-20.

46. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц; под ред. Н. Е. Бузикашвили и Д. В. Самойлова.- М.: Практика, 1999.- 463 с.

47. Гришин, А.В. Лектины *Pseudomonas aeruginosa* как мишени для новых антибактериальных соединений / А.В. Гришин, М. С. Кривоzubов, А. С. Карягина, А. Л. Гинцбург // Actanaturae (русскоязычная версия).- 2015.- Том 7.- № 2 (25).- С.32-45.

48. Гульнева, М.Ю. Факторы персистенции условно-патогенных микроорганизмов, выделенных у больных ревматическими заболеваниями / М.Ю. Гульнева, А.Ю. Кулибин, Э.В. Малафеева // Фундаментальные исследования. - 2011.- №9.- С.45-47.

49. Дворецкий, Л.И. Изучение содержания лактоферрина в бронхиальном содержимом у больных хроническим бронхитом / Л.И.

Дворецкий, Н.А. Дидковский, Г.Чарлыев // Здравоохр. Туркменистана.- 1985.-№10.- С.15-18.

50. Дегтярев, О.В. Лактоферрин в прогнозировании заболеваний с деструктивными изменениями костной ткани / О.В. Дегтярев, У.А. Сазыкина // Современные наукоемкие технологии.- №11.- 2010.- С.97.

51. Дерябин, Д.Г. Вирулентность и персистенция стафилококков: фенотипические проявления и механизмы генетического контроля / Д.Г. Дерябин, И.А. Шагинян // Журн. микробиол., эпидемиол. иммунол.- 2000.- №4 приложение.- С.36-43.

52. Ерошенко, Г.А. Генетические особенности авирулентных штаммов холерных вибрионов O139 серогруппы, выделенных на территории России / Г.А. Ерошенко, А.В. Осин, Н.Б. Челдышова, Н.И. Смирнова // Пробл. особо опас. инф. – 2001. – Вып.1 (81). – С.69-75.

53. Ерошенко, Г.А. Генетическая характеристика некоторых штаммов *Vibrio cholerae* не O1/ не O139 серогруппы, выделенных от людей / Г.А. Ерошенко, Е.Ю. Щелканова //Холера и патоген. для человека вибрионы: Матер.пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2005.- Вып.18.- С.77-78.

54. Ерошенко, Г.А. *V.cholerae* O139: генетика и молекулярные механизмы образования возбудителя холеры не O1 серогруппы / Г.А. Ерошенко // Пробл. особо опас. инф.- 2006.-Вып.92.- С. 15-18.

55. Железникова, Г.Ф. Возбудитель инфекции и иммунная система «хозяина»: стратегии взаимоотношений / Г.Ф. Железникова // Медлайн Экспресс.-2006.- №2-3.-С.186.

56. Заднова, С.П. Измененные свойства штаммов холерного вибриона классического биовара под действием факторов внешней среды и мобильных генетических элементов / С.П. Заднова, Н.Д. Исаев, Ю.В. Лозовский, Н.И. Смирнова // Холера и патоген. для человека вибрионы: Матер.пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2007. – Вып.20. – С. 102-105.

57. Заднова, С.П. Выявление в природных популяциях холерных

вибрионов клонов с различной экспрессией факторов вирулентности и персистенции и их фенотипический анализ / С.П. Заднова, Л.Ф. Ливанова, Ю.В. Лозовский, Н.И. Смирнова // Пробл. особо опас. инф. - 2009.-Вып 95.- С.39-42.

58. Зобкова, З.С. Антимикробные свойства олигопептидов лактоферрина / З.С. Зобкова, Д.В. Зенина // Молочная промышленность.- №7.- 2011.- С. 72.

59. Зобкова, З.С. Перспективные технологические решения: увеличение сроков годности творога / З.С. Зобкова, Д.В. Зенина // Молочная промышленность.- 2012.- №9.- С. 40-41.

60. Иванова, О.В. Клиническое значение лактоферрина слюны в индивидуальном прогнозировании осложнений при санации полости рта больных с местно-распространенным раком слизистой полости рта / О.В. Иванова, В.М. Иванов, М.В. Шейкин // Вестник новых медицинских технологий.- Т.21.- №3.- 2014.- С.82-85.

61. Игнатов, В.В. Углеводузнающие белки-лектины / В.В. Игнатов // Соросовский образовательный журнал.- 1997.- №2.- С.14-20.

62. Ильина, Н.А. Антиинтерфероновая активность *Blastocystishominis*/ Н.А. Ильина, Н.М. Касаткина // Фундаментальные исследования.- 2011.- № 2.- С. 169-172.

63. Канышкова, Т.Г. Лактоферрин и его биологические функции / Т.Г. Канышкова, В.Н. Бунева, Г.А. Невинский // Биохимия.-2001.-Т.66.- №1.- С.5-13.

64. Капустина, О.А. Регуляция факторов персистенции условно-патогенных микроорганизмов пробиотическими штаммами бактерий рода *Lactobacilluspp.* / О.А. Капустина, А.Ю. Гаранкина // Вестник ветеринарии.-2012.-Т.63.-№4.- С.47-49.

65. Карташова, О.Л. Диагностическое значение персистентных характеристик стафилококков при бактерионосительстве / О.Л. Карташова,

С.Б. Киргизова, Л.П. Потехина, О.В. Бухарин // Журн. микробиол., эпидемиол. иммунол. - 2007.- №5. С.13-16.

66. Карташова, О.Л. Антикарнозиновая активность стафилококков как критерий оценки их персистентного потенциала/ О.Л. Карташова, С.Б. Киргизова, А.А. Стадников и др. // Журн. микробиол., эпидемиол. иммунол.- 2006. - № 4.- С. 13-16.

67. Карташова, О.Л. Регуляция персистентных свойств микроорганизмов факторами различной природы (обзор) / О.Л. Карташова, Т.М. Уткина // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН.- 2013.- № 1.- С. 4.

68. Климентова, Е.Г. Влияние δ -эндотоксинов *Bacillusthuringiensis* на изменение антиинтерфероновой активности ряда условно-патогенных бактерий / Е.Г. Климентова, Д.А. Васильев, Н.А.Феоктистова // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии.- 2013.- № 1 (21).- С. 76-79.

69. Кобляков, В.А. Тормозящее действие лактоферрина человека (неолактоферрина) на рост перевиваемой опухоли шейки матки мышей / В.А. Кобляков, Е.Е. Антошина, Т.Г. Горькова и др. // Вопросы онкологии.- 2012.- Том 58.- №5.- С.668-673.

70. Козлова, А.Н. Морфофункциональная реорганизация эпителия воздухоносных путей крыс при их интратрахеальном инфицировании бактериями с антилактоферриновой активностью / А.Н. Козлова, Э.М. Вахитов, Р.В. Безносик и др. // Вестник ОГУ.- 2012.-№1.- С. 185-188.

71. Колякина, А.В. Лектиновые рецепторы холерных вибрионов: автореф. дис...канд. мед.наук: 03.00.07 / Колякина Анастасия Владимировна. – Ростов-на-Дону, 2009.- 18 с.

72. Комолова, Г.С. Лактоферрин коровьего молока / Г.С. Комолова, Н.А. Тихомирова, И.И. Ионова, С.А. Комолов // Молочная промышленность.-2011.- №7.- С. 70-71.

73. Королёва, Г.В. Адгезивные свойства вибрионов разных видов и

адгезивных препаратов / Г.В. Королёва, В.В. Король, Л.М. Смоликова и др. // Холера. Вопр. эпидемиол., микробиол. и лаб. Диагност: - Матер. Рос.науч. конф. — Ростов-на-Дону, 1992.- С. 88 - 89.

74. Коршенко, В.А. Анализ свойств, характеризующих способность к персистенции холерных вибрионов, выделенных от больных и вибрионосителей / В.А. Коршенко, В.В. Балахнова, И.Я. Черепахина // Холера и патоген. для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2012.– С. 98-101.

75. Коршенко, В.А. Роль лектинов в механизме реализации антилактоферриновой активности холерных вибрионов / В.А. Коршенко, И.Я. Черепахина // Рос.журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. - 2014.- Т. XXIV, №5.- Прилож. 34. - С. 100 (№).

76. Костюкова, Н.Н. Микробиологические факторы, определяющие носительство при капельных инфекциях / Н.Н. Костюкова // Журн. микробиол., эпидемиол. иммунол.- 1997.- №4.- С.10-15.

77. Кузнецов, И.А. Железосодержащие белки – лактоферрин и ферритин – в биологических средах больных туберкулезом легких / И.А. Кузнецов, М.М. Расулов, Ж.Т. Искакова // Бюлл. эксперим. биологии и медицины.-2012.-Т.154, № 11.- С. 572-576.

78. Кульшань, Т.А. Изучение связи между структурой генома *Vibrio cholerae* и его персистентными свойствами / Т.А. Кульшань, Н.Б. Челдышева // Фундаментальная и клиническая медицина: Матер. X Всерос. медико-биологич. конфер. молодых исслед. М., -2007.-С.231-232.

79. Кутырев, В.В. Основные направления молекулярно-биологических изменений геновариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор в современный период седьмой пандемии холеры / В.В. Кутырев, Н.И. Смирнова // Холера и патоген. для человека вибрионы: Матер.пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2013. – Вып.26. – С.108-110.

80. Кэбот, Е. Экспериментальная иммунохимия / Е. Кэбот, М. Мейер. – М.: Медицина, 1968. – 684 с.

81. Лабинская, А.С. Микробиология с техникой микробиологических методов исследования / А.С. Лабинская. – М.: Медицина, 1968.- 468 с.
82. Лабораторная диагностика холеры: Методические указания МУК 4.2.2218-07.- М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007.- 87 с.
83. Лахтин, М.В. Лектин-конъюгативные системы в организме человека / М.В. Лахтин, А.В. Караулов, В.М. Лахтин и др. // Иммунология, аллергология, инфектология.- 2012.- №1.-С. 27-36.
84. Лихолобов, В.А. Провоспалительные цитокины и лактоферрин в крови крыс при остром отравлении дельтаметрином и энтеросорбции / В.А. Лихолобов, Ю.Н. Федоров, Л.Г. Пьянова и др. // Сельскохозяйственная биология.- №6.- 2013.- С. 100-104.
85. Ломов, Ю.М. Специфичность лектиновых рецепторов холерных вибрионов / Ю.М. Ломов, Н.Р. Телесманич, А.К. Колякина // Журн. микробиол., эпидемиол. иммунол. – 2007. - № 6. – С. 68-72.
86. Ломова, А.С. Состояние антимикробной активности слюны и кариеса у беременных женщин в течение гестационного периода / А.С. Ломова, П.В. Мороз, В.А. Проходная // Фундаментальные исследования.- 2013.- № 7.- С.115-118.
87. Лукьянов, П.А. Современная гликобиология и медицина / П.А. Лукьянов, Н.В. Журавлева // Вестник ДВО РАН.- 2004.- № 3.- С.24-34.
88. Луцик, М.Д. Лектины / М.Д. Луцик, Е.Н. Панасюк, А.Д. Луцик. - Львов: Вища школа, 1981. – 156 с.
89. Мамбетова, Э.Ф. Антилизозимная и антиинтерфероновая активности и вирулентность моно- и ассоциированных культур бактерий рода *Serratia spp.* и *Staphylococcus aureus* / Э.Ф. Мамбетова, А.А. Ахтариева, Ю.З. Габидуллин и др. //Вестник Российского государственного медицинского университета.- 2006.- № 2.- С. 396.
90. Маниатис, Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э.

Фрич, Дж. Сэмбрук.- М.: Мир, 1984.- 479 с.

91. Марков, А. Лектины заменяют растениям иммунную систему / А. Марков Internet: <http://elt-preview.host3.elementy.ru>

92. Методические рекомендации по изучению свойств обуславливающих персистенцию холерных вибрионов. – Ростов-на-Дону, 2009. – 18 с.

93. Михайлова, Е.А. Антииммуноглобулиновая активность бактерий и ее диагностическая ценность / Е.А. Михайлова, А.П. Луда, М.И. Бигеев // Персистенция бактерий: Сб. науч. тр. Под ред. О.В. Бухарина. - Куйбышев, 1990.- С. 107-111.

94. Монахова, Е.В. Факторы патогенности нехолерогенных штаммов *Vibrio cholerae*: автореф. дис...д-ра биол. наук: 03.02.03 / Монахова Елена Владимировна. – Ростов-на-Дону, 2012. – 48 с.

95. Мотавкина, Н.С. Биоценозусловно-патогенных бактерий и возбудителей урогенитальных инфекций, передающихся половым путем, в генезе гуморальных иммунодефицитов / Н.С. Мотавкина, Е.Н. Бушуева // Тихоокеанский медицинский журнал. -2006.- № 3.- С. 40-42.

96. Мустафаев, М.Ш. Факторы персистенции микроорганизмов, выделенных при гнойно-воспалительных осложнениях переломов челюстных костей / М.Ш. Мустафаев, Ш.С. Кудаев, З.Ф. Хараева // Фундаментальные исследования.-2005.-№5.-С.78-79.

97. Науменко, З.С. Динамика изменения содержания лактоферрина в сыворотке крови больных с диспластическим коксартрозом и дисплазией тазобедренного сустава / З.С. Науменко, И.В. Шипицына, М.П. Тепленький // Вестник Уральской Медицинской Академической Науки.- 2012.- №4.- С.139-140.

98. Нефедов, К.С. Сравнительный анализ фенотипических и молекулярно-генетических свойств холерных вибрионов эльтор, выделенных до начала и в период седьмой пандемии: автореф. дис...канд. мед. наук: 03.00.07 / Нефедов Константин Сергеевич . – Саратов, 2009. - 24 с.

99. Николаева, А.А. Иммунологический статус у пациентов с поражением вегетативных парасимпатических узлов головы вирусного происхождения / А.А. Николаева, В.В. Базарный, В.П. Журавлев // Уральский Медицинский журнал.- 2012. -№12.-С.104.

100. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот / Л.А. Остерман. - М.: Наука, 1981.- 288 с.

101. Подройкина, В.А. Роль антилактоферриновой активности в персистенции холерных вибрионов / В.А. Подройкина, В.В. Балахнова, Н.Р. Телесманич, И.Я. Черепахина // Здоровье населения и среда обитания.- 2011.- №6.- С. 46-48.

102. Плотников, А.О. Персистентные свойства бактерий-ассоциантов простейших / А.О. Плотников, Н.В. Немцева, О.В. Бухарин // Журн. микробиол., эпидемиол. иммунол.- 2002.- №4. С.60-62.

103. Потехина, Л.П. Антикарнозиновая активность стафилококков: автореф. дис...канд. мед.наук: 03.02.03 / Потехина Лидия Петровна. – Оренбург, 2010. – 21с.

104. Потехина, Л.П. Способ санации бактерионосительства *S.aureus* / Л.П. Потехина, Т.М. Уткина, О.Л. Карташова, А.Ф. Зверев // Современные проблемы науки и образования. – 2012.- №5.- С.75.

105. Рогожина, Т.Н. Полифункциональная биологически активная добавка для полочной продукции / Т.Н. Рогожина, В.И. Ганина, Г.С. Комолова, Е.А. Гущина // Техника и технология пищевых производств.- 2012.-Т. 2.- № 25.- С. 135-138.

106. Савельев, В.Н. Биологические свойства возбудителя и клинико-эпидемиологические особенности современной холеры эльтор / В.Н. Савельев, И.В. Савельева, Б.В. Бабынышев и др. // Холера и патоген. для человека вибрионы: Матер.пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2012. – Вып.25. – С. 63-72.

107. Самохина, Л.С. Противодисбактериозное действие композиции гидролизатов α -лактальбумина и лактоферрина / Л.С. Самохина, Г.С.

Комолова, В.И. Ганина и др. // Известия вузов. Пищевая технология.-2012.- №5-6.- С. 17-20.

108. Саппо, С.Г. Использование эритроцитов для выявления адгезивной способности вибрионов / С.Г. Саппо, Л.Я. Урбанович, В.С. Колесник // Современные аспекты профилактики зоонозных инфекций. - Иркутск, 1984.- ч.3.- С 126 -127.

109. Смирнова, Н.И. Эволюция генома *Vibrio cholerae*: пути формирования атипичных штаммов / Н.И. Смирнова, Н.Б. Челдышова, А.А. Горяева и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – Саратов, 2008. – Вып.97, №3.- С. 5- 11.

110. Сизова, Е.В. Супероксиддисмутазная активность холерных вибрионов 01 и 0139 серогрупп / Е.В. Сизова, Ю.В. Сизова, В.В. Балахнова, О.С. Бурлакова, И.Я. Черепахина // Холера и патоген. для человека вибрионы: Матер.пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2011.–Вып.24. - С.77-81.

111. Сизова, Ю.В. Роль температуры в реализации антилизацимной активности холерных вибрионов / Ю.В. Сизова, И.Я. Черепахина, Е.В. Сизова, В.В. Балахнова // Здоровье населения и среда обитания.- №5.-2013.- С.30-32.

112. Соколов, А.В. Исследование рекомбенантного лактоферрина человека, секретируемого в молоко трансгенных мышей / А.В. Соколов, М.О. Пулина, А.В. Кристьян и др. // Доклады Академии Наук.- 2006.- Т. 411.-№ 2.- С. 267–270.

113. Сухарев, А.Е. Иммунохимические исследования лактоферрина в слюне / А.Е. Сухарев, Т.Н. Ермолаева, Н.А. Беда, Г.Ф. Крылов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2009. –№ 4. – С. 38–39.

114. Сычева, И.В. Способность микроорганизмов к инаktivации лактоферрина / И.В. Сычева, А.В. Вальшев // Региональная научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов: Сборник материалов. – Оренбург, 2001. - Ч. 3. – С.162-163.

115. Телесманич, Н.Р. Механизмы гемолитической активности холерных вибрионов: автореф. дис... д-ра биол. наук: 03.00.07 / Телесманич Наталья Робертовна.- Ростов-на-Дону, 2005.- 38 с.

116. Телесманич, Н.Р. Пат. 2332460 РФ. Способ выявления эпидемически значимых холерных вибрионов *Vibrio cholerae* *ElTor* и *Vibrio cholerae* *O139* по их адгезивной способности / Н.Р. Телесманич, Ю.М. Ломов, А.В. Колякина; № 2332460; заявл. 26.12.2006; опубл. 27.08.2008.

117. Телесманич, Н.Р. Роль галактозоспецифичного рецептора – лектина в бактерицидной активности гемолизина *Vibrio cholerae* *ne O1/O139* / Н.Р. Телесманич, Е.А. Меньшикова, Е.М. Курбатова, Е.В. Гончаренко // Журн. микробиол., эпидемиол. иммунол.- 2010.-№1.-С.10-14.

118. Терпинская, Т.И. Влияние лактоферрина человека, полученного из молока трансгенных коз, на рост перевиваемых опухолей у мышей / Т.И. Терпинская, Л.В. Павловец // Здравоохранение.-2013.-№2.- С.33-37.

119. Топорков, А.В. Генетическая неоднородность популяции холерных вибрионов Эль Тор, выделенных на территории Астраханской области (1970-2002 годы) / А.В. Топорков, Т.А. Кульшань, Ю.В. Лозовский, Н.И. Смирнова // Пробл. комиссия «Холера и патогенные для человека вибрионы». – Ростов-на-Дону.- 2005.- Вып.18.- С.79-81.

120. Уразбаева, Д.Ч. Антилизозимная активность микроорганизмов, вызывающих острый и хронический пиелонефрит / Д.Ч. Уразбаева, Б.А. Рамазанова, Б.У. Шалекенов // Урология.- 2006.- № 6.- С. 63-65.

121. Федюкович, Н. И. Анатомия и физиология человека: учебное пособие / Н. И. Федюкович.- Ростов-на-Дону, 2003.- 416 с.

122. Фецайлова, О.П. Билирезистентность холерных вибрионов и ее роль в персистенции возбудителя холеры / О.П. Фецайлова, О.И. Помухина, Е.В. Сизова // Рос.журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. - 2009.- Т.ХІХ, №5.- Прилож. 34. - С. 180 (№679).

123. Черепяхина, И.Я. Экологическая детерминированность некоторых факторов персистенции холерных вибрионов / И.Я. Черепяхина,

В.В. Балахнова, О.С. Бурлакова и др. // Холера и патоген. для человека вибрионы: Матер.пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2008. – Вып. 21. - С. 82-86.

124. Черепахина, И.Я. Фенотипический анализ персистентного потенциала холерных вибрионов / И.Я. Черепахина, В.В. Балахнова, О.С. Бурлакова и др // Холера и патоген. для человека вибрионы: Матер.пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2012.– Вып. 25. - С.132-135.

125. Черепахина, И.Я. Антилизозимная активность холерных вибрионов и сальмонелл / И.Я. Черепахина, В.В. Балахнова, Л.Н. Терновская и др. // Холера и патоген. для человека вибрионы: Матер.пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2007. - Вып.20.– С.70-75.

126. Черепахина, И.Я. К вопросу об изучении устойчивости холерных вибрионов к дезинфектантам как к одному из факторов персистенции / И.Я. Черепахина, О.П. Фецайлова, В.В. Балахнова и др. // Холера и патоген. для человека вибрионы: Матер.пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2009. Вып.22.– С.100-104.

127. Черноусов, А.Д. Неолактоферрин как стимулятор врожденного и адаптивного иммунитета / А.Д. Черноусов, М.Ф. Никонова, Н.И. Шарова и др. // Acta Naturae (русскаяязычная версия).- 2013.- Т.5.- №4(19).- С.78-84.

128. Чуенко, Э.А. Характеристика антикарнозиновой активности разных видов стафилококков / Э.А. Чуенко, Б.Я. Усвяцов // Вестник Оренбургского государственного университета.- 2005.- № 12.- С. 63-65.

129. Шаркова, В.А. Генетически обусловленная патогенность и антибиотикорезистентность штаммов *Staphylococcuspp.* / В.А. Шаркова, Е.Ф. Лайман, М.Е. Мазур // Тихоокеанский медицинский журнал.- 2014.- № 3.-С.46-49.

130. Штиль, О.О. Способность *N.gonorrhoeae* к инаktivации факторов иммунитета при гонококковой инфекции у мужчин / О.О. Штиль // Вестник ОГУ.-2011.-№16.- С.372-379.

131. Щелканова, Е.Ю. Вариабельность участка хромосомы, содержащего гены биосинтеза O139 антигена, у различных штаммов *Vibrio cholerae*O139 / Е.Ю. Щелканова, Г.А. Ерошенко, Н.И. Смирнова //Холера и патоген. для человека вибрионы: Матер.пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2005.- Вып.18.- С.75-76.

132. Юркина, Э.А. Мониторинг уровня сывороточного лактоферрина при соматической и инфекционной патологии / Э.А. Юркина, Н.Г. Жевачевский, Л.В. Гребенщиков // Пробл. инф. патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера. – Тез.докл. научн. конф.- Новосибирск.-1998.- С.210-211.

133. Actor, J. Lactoferrin as a natural immune modulator / J. Actor, S. Hwang, M. Kruzel et al // Curr Pharm Des. - 2009. - Vol. 15, No.17. - P. 1956–1973.

134. Albert, M.J. Phagocytosis of *Vibrio cholerae* 0139 Bengal Human polymorphonuclear leukocytes / M.J. Albert, F. Qadri, N.A. Bhuiyan et al. // Clin. Diagn. Lab. Immunol.-1999. - Vol.6. - P.276-278.

135. Andersen, J.H. Technology evaluation: rh lactoferrin, Agennix / J.H. Andersen // Curr. Opin. Mol. Ther. - 2004. - Vol. 6. - P.344–349.

136. Andrews, S.C. Bacterial iron homeostasis / S.C. Andrews, A. K. Robinson, F. Rodriguez-Quinones // FEMS Microbiol. Rev. - 2003. - Vol. 27, No. 2-3. - P.215–237.

137. Antonini, G. Antiinvasive activity of bovine lactoferrin against *Listeria monocytogenes* / G. Antonini, M. R. Catania, R. Greco et al. // J. Food Protect. - 1997.- Vol. 60, No. 3. - P.267-271.

138. Appelmelk, B.J. Lactoferrin is a lipid A-binding protein / B. J. Appelmelk, Y. Q. An, M. Geerts et al. // Infect. Immun. -1994.- Vol. 62, No. 6. - P.2628–2632.

139. Arnold, R.R. Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms / R.R. Arnold, M. Brewer, J.J. Gauthier // Infect.Immune.-1980. - Vol.28, No.3.- P.893-898.

140. Arnold, R.R. A bactericidal effect for human lactoferrin / R.R. Arnold, M. F. Cole, J. R. McGhee // *Science*. - 1977. - Vol. 197, No. 4300. - P.263-265.

141. Arnold, D. Antiadenovirus activity of milk proteins: lactoferrin prevents viral infection / D. Arnold, A.M. Di Biase, M. Marchetti et al. // *Antiviral Res.*- 2002.- Vol.53.- P. 153-158.

142. Azzam, H.S. Natural products and chronic hepatitis C virus / H. S. Azzam, C. Goertz, M. Fritts, W. B. Jonas // *Liver Int.* Feb.- 2007.- Vol.27. - P.17-25.

143. Baggiolini, M. Association of lactoferrin with specific granules in rabbit heterophil leukocytes / M. Baggiolini, D. de Duve, P.L. Masson, J. F. Heremans // *J. Exp. Med.*- 1970.- Vol. 131. - P.559-570.

144. Baker, E.N. Lactoferrin and transferrin: functional variations on a common structural framework / E.N. Baker, H.M. Baker, R.D. Kidd // *Biochem. Cell Biol.* - 2002. - Vol.80. - P. 27–34.

145. Beker, E.N. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin / E.N. Beker, H.M. Baker // *Cell. Mol.Life Sci.*-2005. - Vol. 62. - P.2531-2539.

146. Baker, H. M. Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme / H. M. Baker, B. F. Anderson, E. N. Baker // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 2003.-Vol.100.- P.3579–3583.

147. Balan, U. Symptomatic changes of oral mucosa during normal hormonal turnover in healthy young menstruating women / U. Balan, N. Gonsalves, M. Jose , K.L. Girish // *Contemp Dent Pract*. - 2012. - Vol.13, No.2.- P.178-181.

148. Baveye, S. Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process / S. Baveye, E. Ellass, J. Mazurier, G. Spik, D. Legrand // *Clin. Chem. Lab. Med.* - 1999. - Vol. 37, No. 3. - P. 281–286.

149. Beddek, A.J. The lactoferrin complex in gram negative bacteria / A.J. Beddek, A.B. Schryvers // *Biometals*.-2010. - Vol.23. - P.377-386.

150. Bellamy, W. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin / W. Bellamy, M. Takase, K. Yamauchi, H. Wakabayashi, K. Kawase, M. Tomita // *Biochim. Biophys. Acta.* - 1992. - Vol. 1121, No. 1-2. - P.130-136.

151. Berliner, N. Granulocyte colony-stimulating factor induction of normal human bone marrow progenitors results in neutrophil-specific gene expression / N. Berliner, A. Hsing, T. Graubert et al. // *Blood.*-1995.- Vol. 85, No. 3. - P. 799–803.

152. Booth, B.A. *Vibrio cholerae* soluble hemagglutinin/protease is a metalloenzyme / B.A. Booth, M. Boesman-Finkelstein, R.A. Finkelstein // *Infect. Immun.* – 1983. – Vol.42, No.2 – P. 639-644.

153. Braun, V. Active transport of iron and siderophore antibiotics / V. Braun, M. Braun // *Curr. Opin. Microbiol.* - 2002.-No.5.- P. 194–201.

154. Britigan, B.E. Transferrin and lactoferrin undergo proteolytic cleavage in the *Pseudomonas aeruginosa*-infected lungs of patients with cystic fibrosis / B.E. Britigan, M.B. Hayek, B.N. Doebbeling, R.B. Fick // *Infect. Immun.* - 1993. - Vol. 62. - P.5049–5055.

155. Brock, J. H. The physiology of lactoferrin / J. H. Brock // *Biochem. Cell Biol.* - 2002. – Vol.80. – P.1-6.

156. Brock, J.H. Lactoferrin–50 years on / J.H. Brock // *Biochem. Cell Biol.* – 2012. - Vol.90, No 3. – P. 245–251.

157. Bullen, J. J. Role of iron in bacterial infection / J. J. Bullen, H. J. Rogers, E. Griffiths // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* - 1978. - Vol. 80. - P.1-35.

158. Bullen, J.J. Iron-binding proteins in milk and resistance to *Escherichia coli* infections in infants / J. J. Bullen, H. J. Rogers, L. Leigh // *Brit. Med. J.* - 1972.- Vol. 1, No. 5792. - P. 69–75.

159. Carrello, A. Adhesion of clinical and environmental *Aeromonas* isolates to HEp-2 cells / A. Carrello, K. A. Silburn, J. R. Budden // *J. Med. Microbiol.*- 1988 - Vol. 26, No. 1. - P.19-27.

160. Chentoufi, A.A. The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript inhibits phenotypic and functional maturation of dendritic cells / A.A.

Chentoufi, X. Dervillez, G. Dasgupta, C. Nguyen et al. // *Viral Immunol.* – 2012. – Vol. 25, No.3. - P.204-215.

161. Clarke, S.R. A protects *Staphylococcus aureus* against the bactericidal protease activity of apolactoferrin / S. R. Clarke, S. J. Foster // *Inf. Immun.* - 2008. - Vol. 76, No. 4. - P.1518—1526.

162. Cleary, J. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin / J. Cleary, L.C. Lai, R. K. Shaw // *Microbiology.*- 2004. - Vol.150.- P.527–538.

163. Conesa, C. Recombinant human lactoferrin: A valuable protein for pharmaceutical products and functional foods / C. Conesa, M. Calvo, L. Sánchez // *Biotechnol. Adv.* - 2010. - Vol.28. - P.831–838.

164. Cornish, J. Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation in vivo / J. Cornish, K. E. Callon, D. Naot et al. // *Endocrinology.*- 2004.- Vol. 145, No.9. - P. 4366–4374.

165. Cornish, J. Lactoferrin as an effector molecule in the skeleton / J. Cornish, D. Naot // *Biometals.* - 2010. - Vol.23. – P.425-430.

166. Davidson, L.A. Persistence of human milk proteins in the breastfed infant / L.A. Davidson, B. Lonnerdal // *Acta Paediatr. Scand.* - 1987. - Vol.76, No.5. - P. 733-740.

167. Davidson, L.A. Specific binding of lactoferrin to brush-border membrane: ontogeny and effect of glycan chain/ L.A. Davidson, B. Lonnerdal // *Am. J. Physiol.* - 1988. – Vol.254. - P.580-585.

168. Dial, E.J. Effect of lactoferrin on *Helicobacter felis* induced gastritis / E.J. Dial, L.M. Lichtenberger // *Biochem.Cell.Biol.*-2002.- Vol.80.- P.113-117

169. Di Biase, A.M. Effect of bovine lactoferricin on enteropathogenic *Yersinia* adhesion and invasion in HEp-2 cells / A.M. Di Biase, A. Tinari, A. Pietrantonio et al. // *J. Med. Microbiol.*- 2004.- Vol.53, No.5.- P. 407–412.

170. Ekins, A. Lactoferrin receptors in Gram-negative bacteria: insights into the iron acquisition process / A. Ekins, A. G. Khan, S.R. Shouldice, A. B. Schryvers // *Biometals*.- 2004.- Vol.17. - P. 235–243.

171. Ellass-Rochard, E. Lactoferrin-lipopolysaccharide interaction: involvement of the 28-34 loop region of human lactoferrin in the high-affinity binding to *Escherichia coli* O55B5 lipopolysaccharide / E. Ellass-Rochard, A. Roseanu, D. Legrand et al. // *Biochem.J.*-1995. - Vol.312, No.3. - P.839-845.

172. Esmat, A. Structure and functions of lactoferrin as ingredient in infant formulas / A. Esmat, G. Ros, C. Frontela // *J. of Food Research*. - 2013. - Vol. 2, No.4. - P.25-36.

173. Farnaud, S. Lactoferrin – a multifunctional protein with antimicrobial properties / S. Farnaud, R.W. Evans // *Mol.Immunol.*-2003.- Vol.40, No.7. - P.3395-3405.

174. Finkelstein, R.A. *Vibrio cholerae* hemagglutinin/lectin/protease hydrolyses fibronectin and ovomucin: F.M. Burnet revisited / R.A. Finkelstein, M. Boesman-Finkelstein, P. Holt // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*-1983.-Vol.80, No.4. - P.1092-1095.

175. Finkelstein, R.A. Purification and characterization of the soluble hemagglutinin (cholera lectin) produced by *Vibrio cholerae* / R.A. Finkelstein, L.F. Hanne // *Infect.Immun.*-1982.-Vol.36, No.3. – P.1199-1208.

176. Firth, M.A. Passive and active components of neonatal innate immune defenses / M.A. Firth, P.E. Shewen, D.C. Hodgins // *Anim. Health Res. Rev.*- 2005.- Vol.6.- P.143-158.

177. Flores-Villasenor, H. Bactericidal effect of bovine lactoferrin, LFCin, LFampin and LFchimera on antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* / H. Flores-Villasenor, A. Canizalez-Roman, M. Reyes-Lopez et al. // *Biometals*.- 2010.- Vol. 23, No.3.- P.569–578.

178. Fujihara, T. Lactoferrin inhibits herpes simplex virus type-1 (HSV-1) infection to mouse cornea / T. Fujihara, K. Hayashi // *Arch.Virol.*-1995.-Vol. 140, Issue 8. - P. 1469-1472.

179. Furlong, S.J. Bovine lactoferricin induces caspase-independent apoptosis in human B-lymphoma cells and extends the survival of immune-deficient mice bearing B-lymphoma xenografts / S.J. Furlong, J.S. Mader, D.W. Hoskin // *Exp. Mol. Pathol.*-2010. - Vol. 88, No.3. - P. 371–375.

180. Gado, I. Correlation between human lactoferrin binding and colicin susceptibility in *Escherichia coli* / I. Gado, J. Erdei, V.G. Laszlo et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.*- 1991.- Vol. 35, No. 12. - P. 2538–2543.

181. Gahr, M. Influence of lactoferrin on the function of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes / M. Gahr, C.P. Speer, B. Damerau, G. Sawatzki // *J. Leukoc. Biol.*-1991.-Vol.49.-P. 427-433.

182. Garcia-Montoya, I. A. Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview / I. A. Garcia-Montoya, T. S. Cendon, S.Arevalo-Gallegos, Q. Rascon-Cruz // *Biochemica et Biophys. Acta.* - 2012. - Vol.1820, No.3. P.226-236.

183. Giangaspero, A. Amphipathic alpha helical antimicrobial peptides / A. Giangaspero, L. Sandri, A. Tossi // *Eur. J. Biochem.*- 2001.-Vol.268, No.21.- P.5589-5600.

184. Gibbons, J.A. Lactoferrin and cancer in different cancer models / J.A. Gibbons, R.K. Kanwar, J.R. Kanwar // *Front Biosci (Schol Ed).* - 2011. - Vol.3. - P. 1080-1088.

185. Goldman, I.L. Production of human lactoferrin in animal milk / I.L. Goldman, S.G. Georgieva, Y.G. Gurskiy et al. // *Biochem. Cell Biol.* - 2012. - Vol. 90, No.3. P. 513–519.

186. Gray-Owen, S. D. Bacterial transferring and lactoferrin receptors / S. D. Gray-Owen, A. B. Schryvers // *Trends Microbiol.* - 1996. - Vol. 4, No. 5. - P. 185–191.

187. Green, I. Lactoferrin-specific localization in the nuclei of human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes / I. Green, C. H. Kirkpatrick, D. C. Dale // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*- 1971.- Vol. 137, No. 4. - P. 1311-1317.

188. Hakansson, A. Apoptosis induced by a human milk protein / A. Hakansson, B. Zhivotovsky, S. Orrentius et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 1995.- Vol. 92, No. 17. - P.8064-8068.

189. Harbitz, O. Lysozyme and lactoferrin in sputum from patients with chronic obstructive lung disease / O. Harbitz, A.O. Jenssen, O. Smidsrod // Eur. J. Respir Dis. - 1984.- Vol. 65, No. 7. - P. 512–520.

190. Hendrixson, D. R. Human milk lactoferrin is a serine protease that cleaves *Haemophilus surface* proteins at arginine-rich sites / D. R. Hendrixson, J. Qiu, S. C. Shewry et al. // Mol. Microbiol. - 2003. - Vol. 47, No. 3. - P. 607–617.

191. Iyer, S. Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism / S. Iyer, B. Lonnerdal // Eur. J. Clin. Nutr. - 1993.- Vol. 47, No. 4. - P. 232–241.

192. Jenssen, H. Antimicrobial properties of lactoferrin / H. Jenssen, R.E. Hancock // Biochem. - 2009. - Vol. 91, No. 1. - P.19-29.

193. Jiang, R. Apo- and holo-lactoferrin are both internalized by lactoferrin receptor via clathrin-mediated endocytosis but differentially affect ERK-signaling and cell proliferation in Caco-2 cells / R. Jiang, V. Lopez, S. L. Kelleher, B. Lönnerdal //J. of Cell. Physiol. - 2011. - Vol. 226. - P.3022-3031.

194. Kawasaki, Y. Inhibitory effects of bovine lactoferrin on the adherence of enterotoxigenic *Escherichia coli* to host cells / Y. Kawasaki, S. Tazume, K. Shimizu et al. // Biosc. Biotechnol. Biochem. - 2000. - Vol. 64, No. 2. - P. 348–354.

195. Kijlstra, A. Lactoferrin levels in normal human tears / A. Kijlstra, S.H. Jeurissen, K.M. Koning // Br. J. Ophthalmol. - 1983.- Vol. 67, No. 3. - P. 199–202.

196. Killary, A.M. Definition of a tumor suppressor locus within human chromosome 3p21-p22 / A.M. Killary, M.E. Wolf, T.A. Giambenardi, S.L. Naylor // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 1992.- Vol. 92, No. 22. - P. 10877-10881.

197. Kolsto - Otnaess, A.B. Plasma lactoferrin measured by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Measurements on adult and infant plasma /

A.B. Kolsto-Otnaess, A. Meberg, H.A. Sande // Scand J Haematol. - 1983. - Vol. 31, No. 3. - P. 235–240.

198. Leffell, M.S. Association of lactoferrin with lysozyme in granules of human polymorphonuclear leukocytes / M.S. Leffell, J. K. Spitznagel // Infect. Immun.-1972. - Vol. 6, No. 5. - P.761-765.

199. Legrand, D. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses / D. Legrand, E. Ellass, M. Carpenter, J. Mazurer // Cell. Mol. LifeSci. - 2005. - Vol. 62, No. 22. - P. 2549-2559.

200. Legrand, D. Lactoferrin structure and functions / D. Legrand, A. Pierce, E. Ellass et al. // AdvExp. Med. Biol. - 2008. - Vol. 606. -P.163-194.

201. Legrand, D. The N-terminal Arg2, Arg3 and Arg4 of human lactoferrin interact with sulphated molecules but not with the receptor present on Jurkat human lymphoblastic T-cells / D. Legrand, P.H. Van Berkel, V. Salmon et al. // Biochem. J.-1997. - Vol. 327, No. 1. - P.841–846.

202. Leitch, E. C. Synergic antistaphylococcal properties of lactoferrin and lysozyme / E. C. Leitch, M. D. Willcox // J. Med. Microbiol.- 1998.- Vol. 47, No. 9. - P. 837–842.

203. Levay, P.F. Lactoferrin: a general review / P.F. Levay, M. Viljoen // Haematologica. - 1995. - Vol. 80, No. 3. - P.252–267.

204. Lewis, L.A. Identification and molecular analysis of lbpBA, which encodes the two-component meningococcal lactoferrin receptor / L.A. Lewis, K. Rohde, M. Gipson et al. // Infect. Immun. - 1998.- Vol. 66, No. 6.- P. 3017–3023.

205. Ligo, M. Inhibitory effects of bovine lactoferrin on colon carcinoma 26 lung metastasis in mice / M. Ligo, T. Kuhara, Y. Ushida et al. // Clin. Exp. Met.-1999.- Vol.17.- P. 35-40.

206. Longhi, C. Influence of lactoferrin on the entry process of *Escherichia coli* HB101 (pRI203) in HeLa cells / C. Longhi, M. P. Conte, L. Seganti et al. // Med. Microbiol. Immunol. - 1993. - Vol. 182, No. 1. -P. 25–35.

207. Lönnerdal, B. Expression of human milk proteins in plants / B. Lönnerdal // *J. Am. Coll. Nutr.* - 2002. - Vol. 21. - P. 218–221.
208. Mann, D.M. Delineation of the glycosaminoglycan-binding site in the human inflammatory response protein lactoferrin / D.M. Mann, E. Romm, M. Migliorini // *J. Biol. Chem.* - 1994. - Vol. 269. - P.23661–23667.
209. Manzoni, P. Lactoferrin and prevention of late-onset sepsis in the pre-term neonates / P. Manzoni, L. Decembrino, I. Stolfi et al. // *Early Human Development*.-2010.- Vol. 86.- P. 59-61.
210. Masson, P.L. An iron binding protein common to many external secretions / P.L. Masson, J. F. Heremans, C. Dive // *Clin. Chim. Acta.* - 1966. - Vol. 14, No. 6. - P.735-739.
211. Masson, P.L. Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes / P.L. Masson, J. F. Heremans, E. Schonke // *J. Exp. Med.*- 1969.- Vol. 130, No. 3. - P. 643–658.
212. Massucci, M.T. Proteolytic activity of bovine lactoferrin / M.T. Massucci, F. Giansanti, G. Di Nino et al. // *Biometals*.- 2004.- Vol. 17, No. 3. - P.249–255.
213. Metz-Boutigue, M.H. Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins / M.H. Metz-Boutigue, J. Jolles, J. Mazurier et al. // *Eur. J. Biochem.*- 1984.- Vol. 145, No. 3. - P. 659–676.
214. Mizutani, K. X-ray structures of transferrins and related proteins / K. Mizutani, M. Toyoda, B. Mikami // *Biochem. Biophys. Acta.*- 2012.- Vol. 1820, No. 3. - P. 203-211.
215. Montreuil, J. Preparation et propriétés de la lactosiderophiline (lactotransferrine) du lait de femme / J. Montreuil, J. Tonnelat, S. Mullet // *Biochim. Biophys. Acta.* - 1960. - Vol.45. -P. 413-421.
216. Nascimento de Araujo, A. Human milk fractions inhibit the adherence of diffusely adherent *E.coli* (DAEC) and enteroaggregative *E. coli* (EAEC) to HeLa cells / A. Nascimento de Araujo, L.G. Giugliano // *FEMS Microbiol. Lett.*- 2000.- Vol. 184, No. 1. P. 91–94.

217. Nascimento de Araujo, A. Lactoferrin and free secretory component of human milk inhibit the adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells / A. Nascimento de Araujo, L.G. Giugliano // BMC Microbiol. - 2001.- Vol. 1, Issue 1. – P. 25–31.

218. Netter, E. Bacterial hemagglutination and hemolysis / E. Netter // Bacteriol. Rev.-1956. - Vol.20. - P.166-188.

219. Nozaki, A. Identification of a lactoferrin-derived peptide possessing binding activity to hepatitis C virus E2 envelope protein / A. Nozaki, M. Ikeda, A. Naganuma et al. // J. Biol. Chem.-2003.-Vol.278.-P. 10162-10173.

220. Odell, E.W. Antibacterial activity of peptides homologous to a loop region in human lactoferrin / E.W. Odell, R. Sarra, M. Foxworthy, D.S. Chapple, R.W. Evans // FEBS Lett. - 1996.- Vol. 382, No. 1-2. -P. 175-178.

221. Ochoa, T. J. Lactoferrin impairs type III secretory system function in enteropathogenic *Escherichia coli* / T. J. Ochoa, M. Noguera-Obenza, F. Ebel // Infect. Immun.- 2003.-Vol.71.- P. 5149–5155.

222. Pettersson, A. Molecular characterization of LbpB, the second lactoferrin binding protein of *Neisseria meningitides* / A. Pettersson, T. Prinz, A. Umar et al. // Mol. Microbiol.- 1998.- Vol. 27, No. 3. - P. 599–610.

223. Pietrantoni, A. Bovine lactoferrin: involvement of metal saturation and carbohydrates in the inhibition of influenza virus infection / A. Pietrantoni, M.G. Ammendolia, F. Superti // Biochem. Cell Biol. - 2012. - Vol. 90, No.3. - P.442–448.

224. Plaut, A. G. Human lactoferrin proteolytic activity: analysis of the cleaved region in the IgA protease of *Haemophilus influenza* / A.G. Plaut, J. Qiu, J. W. St. Geme III // Vaccine. - 2000. - Vol. 19, Suppl 1. - P.148–152.

225. Puddu, P. Antiviral effect of bovine lactoferrin saturated with metal ions on early steps of human immunodeficiency virus type 1 infection / P. Puddu, P. Borghi, S. Gessani et al. // Int. J. Biochem. Cell. Biol.- 1998.- Vol.30, No. 9. - P.1055-1062.

226. Qiu, J. Human milk lactoferrin inactivates two putative colonization factors expressed by *Haemophilus influenza* / J. Qiu, D. R. Hendrixson, E.N. Baker et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*- 1998. - Vol. 95, No. 21. - P.12641–12646.

227. Rado, T.A. Lactoferrin biosynthesis during granulocytopoiesis / T.A. Rado, J. Bollekens, G. St. Laurent et al. // *Blood.* - 1984. - Vol. 64, No. 5. - P.1103–1109.

228. Rainard, P. Bacteriostatic activity of bovine milk lactoferrin against mastitic bacteria / P. Rainard // *Vet. Microbiol.* – 1986. - Vol.11. - Issue 4. - P.387-392.

229. Ratledge, C. Iron metabolism in pathogenic bacteria / C. Ratledge, L.G. Dover // *Annu. Rev. Microbiol.*- 2000. Vol.54, No.1. - P. 881–941.

230. Rose, J.E. Aae, an autotransporter involved in adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells / J.E. Rose, D.H. Meyer, P.M. Fives-Taylor // *Infect. Immun.* - 2003. - Vol.71, No.5. - P. 2384-2393.

231. Rouge, P. Comparation des reaction de precipitation entre les hemagglutinines de trios especes du genre *Vicia* et les glycoproteines de serum humain normale / P. Rouge, C. Chatelain, D. Pere // *Planta med.* - 1977. - Vol.31. - P.141-145.

232. Singh, P.K. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development / P.K. Singh, M.R. Parsek, E.P. Greenberg, M.J. Welsh // *Nature.* - 2002. - Vol. 417. - P.552–555.

233. Sinha, M. Antimicrobial lactoferrin peptides: the hidden players in the protective function of a multifunctional protein / M. Sinha, S. Kaushik, P. Kaur et al. // *Int. J. of Pept.* - 2013. – Vol.3. – P.1-12.

234. Sharma, S. C-lobe of lactoferrin: The whole story of a half molecule / S. Sharma, M. Sinha, S. Kaushik et al. // *Biochem. Res. Int.* – 2013. - Vol.2013. - P.1-8.

235. Shimazaki, K. Properties of a heparin-binding peptide derived from bovine lactoferrin / K. Shimazaki, T. Tazume, K. Uji et al. // J. Dairy Sci. – 1998. –Vol.81. - P.2841-2849.
236. Shimamura, M. Bovine lactoferrin inhibits tumor-induced angiogenesis / M. Shimamura, Y. Yamamoto, H. Ashino et al. // Int. J. Cancer. — 2004. — Vol. 111. — C. 111-116.
237. Shinoda, S. Proteases produced by *Vibrio cholerae* and other pathogenic vibrios: pathogenic roles and expression / S. Shinoda // Epidemiological and molecular aspects on cholera / T. Ramamurthy, S.K. Bhattacharya (eds.). –2011. - P.245-258.
238. Skaar, E.P. Iron-source preference of *Staphylococcus aureus* infections / E. P. Skaar, M. Humayun, T. Bae, K. L. DeBord, O. Schneewind // Science.- 2004.- Vol. 305. - P.1626–1628.
239. Spitznagel, J.K. Character of azurophil and specific granulespurified from human polymorphonuclear leukocytes / J.K. Spitznagel, F.G. Dalldorf, M. S. Leffell et al. // Lab. Invest. - 1974. - Vol. 30, No. 6. -P.774-785.
240. Steijns, J.M. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin / J.M. Steijns, A.C.M. van Hooijdonk // Br. J. Nutr. - 2000. – Vol.84, Suppl 1. – P.11-17.
241. Suzuki, Y.A. Characterization of mammalian receptors for lactoferrin / Y.A. Suzuki, B. Lonnerdal // Biochem. Cell Biol.- 2002.- Vol. 80, No. 1. - P.75–80.
242. Suzuki, Y.A. Molecular cloning and functional expression of a human intestinal lactoferrin receptor / Y.A. Suzuki, K. Shin, B. Lonnerdal // Biochemistry. – 2001. – Vol. 40, No. 51. - P.15771–15779.
243. Syngkon, A. Studies on a novel serine protease of a *ΔhapAΔprtV* *Vibrio cholerae* O1 strain and its role in hemorrhagic response in the rabbit ileal loop model / A. Syngkon, S. Elluri, H. Koley et al. // PLoS ONE. – 2010. - Vol. 5, No.9. - P.13122.

244. Szabady, R.L. TagA is a secreted protease of *Vibrio cholerae* that specifically cleaves mucin glycoproteins / R.L. Szabady, J.H. Yanta, D.K. Halladin et al. // *Microbiology*. – 2011. - Vol. 157, Pt.2. - P. 516–525.
245. Teng, C.T. Lactoferrin gene expression and regulation: an overview / C.T. Teng // *Biochem. Cell. Biol.* - 2002. - Vol.80. - No.1. - P.7–16.
246. Tholrniley, J.P. Adherence of *Aeromonas caviae* to human cell lines Hep-2 and Caco-2 / J.P. Tholrniley, J.G. Shaw, I.A. Gryllos, A. Eley // *J. Med. Microbiol.* - 1996. - Vol.45, No.6. - P.445-451.
247. Toma, C. Effect of *Vibrio cholerae non-01* protease on lysozyme, lactoferrin and secretory immunoglobulin A / C. Toma, Y. Honma, M. Iwanaga // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1996. - Vol.135, No.1. - P.143-147.
248. Tomita, M. Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications / M. Tomita, H. Wakabayashi, K. Yamauchi et al. // *Biochem. Cell Biol.*-2002.-Vol.80. - P.109–112.
249. Troost, F.J. Gastric digestion of bovine lactoferrin in vivo in adults / F.J. Troost, J. Steijns, W.H. Saris, R.J. Brummer // *J. Nutr.* – 2001. – Vol.131, No.8. –P.2101-2104.
250. Tsuda, H. Cancer prevention by bovine lactoferrin: from animal studies to human trial / H. Tsuda, T. Kozu, G. Iinuma et al. // *Biometals*. - 2010. – Vol.23, No.3. – P.399-409.
251. Tsuda, H. Prevention of colon carcinogenesis and carcinoma metastasis by orally administered bovin lactoferrin in animals / H. Tsuda, K. Sekine, N. Takasuka et al. // *Biofactors*. - 2000. - Vol.12, No.1-4. - P.83-88.
252. Vaitkevicius, K. A *Vibrio cholerae* protease needed for killing of *Caenorhabditis elegans* has a role in protection from natural predator grazing / K. Vaitkevicius, B. Lindmark, G. Ou et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2006. – Vol.103, No.24. – P.9280–9285.
253. Valenti, P. Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack / P. Valenti, G. Antonini// *Cell. Mol. Life. Sci.* – 2005. –Vol.62, No.22. – P. 2576-2587.

254. Van Berkel, P.M. Glycosylated and unglycosylated human lactoferrins can both bind iron and have identical affinities towards human lysozyme and bacterial lipopolysaccharide, but differ in their susceptibility towards tryptic proteolysis / P.M. Van Berkel, M.E. Geerts, H.A. van Veen et al. // *Biochem. J.* - 1995. – Vol.312, Pt.1. – P.107-114.

255. Van Berkel, P.H. Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows /P.H. Van Berkel, M.M. Welling,M. Geerts et al. // *Nat. Biotechnol.* - 2002. - Vol. 20, No.5. - P.484–487.

256. Van der Kraan, M.I.A. Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine / M.I.A. Van der Kraan, J. Groenink, K. Nazmi et al. // *Peptides.* - 2004. – Vol.25, No.2. – P.177-183.

257. Van der Strate, B.W. Antiviral activities of lactoferrin / B.W. Van der Strate, L. Beljaars, G. Molema et al. // *Antiviral. Res.* – 2001. – Vol.52, No.3. – P. 225-239.

258. Viejo-Diaz, M. Modulation of in vitro fungicidal activity of human lactoferrin against *Candida albicans* by extracellular cation concentration and target cell metabolic activity / M. Viejo-Diaz, M.T. Andres, J.F. Fierro // *Antimicrob. Ag. Chemother.* – 2004. – Vol.48, No.4. – P.1242-1248.

259. Wakabayashi, H. N-acylated and D-enantiomer derivatives of a nonamer core peptide of lactoferricin B showing improved antimicrobial activity / H. Wakabayashi, H. Matsumoto, K. Hashimoto et al. // *Antimicrob. Ag. Chemother.* – 1999. – Vol.43, No.5. – P.1267–1269.

260. Wakabayashi, H. Takase, M. Tomita M. Lactoferricin derived from milk protein lactoferrin / H. Wakabayashi, M. Takase, M. Tomita // *Curr. Pharm. Des.* – 2003. – Vol.9, No.16. – P.1277–1287.

261. Wang, X.Y. Effect of iron saturation level of lactoferrin on osteogenic activity in vitro and in vivo / X. Y. Wang, H. Y. Guo, W. Zhang et al. // *J. of Dairy Science.* - 2013. - Vol.96. – No.1. - P.33-39.

262. Ward, P. P. Lactoferrin: role in iron homeostasis and host defense against microbial infection / P. P. Ward, O.M. Conneely // *Biometals*. - 2004. - Vol.17, No.3. - P.203–208.
263. Ward, P. P. Lactoferrin and host defense / P. P. Ward, S. Uribe-Luna, O. M. Conneely // *Biochem. Cell Biol.* - 2002. Vol.80, No.1. - P.95–102.
264. Weinberg, E. D. Iron and infection / E. D. Weinberg // *Microbiol. Rev.* - 1978. - Vol. 42, No. 1. - P.45-66.
265. Weinberg, E. D. Antibiotic properties and applications of lactoferrin / E. D. Weinberg // *Curr. Pharm. Des.* - 2007. - Vol.13, No.8. - P.801-811.
266. Wessolowski, A. Antimicrobial activity of arginine- and tryptophan-rich hexapeptides: the effects of aromatic clusters, D-amino acid substitution and cyclization / A. Wessolowski, M. Bienert, M. Dathe // *J.Pept.Res.*-2004.-Vol.64, No.4.- P.159-169.
267. Willer Eda, M. In vitro adhesion and invasion inhibition of *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* clinical strains by human milk proteins / M. Willer Eda, Rde L. Lima, L. G. Giugliano // *BMC Microbiol.* - 2004. - Vol.4. - P.18–25.
268. Wu, H.F. Characterization of the glycosaminoglycan-binding region of lactoferrin / H.F. Wu, D.M. Monroe, F.C. Church // *Arch. Biochem. Biophys.* - 1995. - Vol.317, No.1. - P.85-92.
269. Wyckoff, E.E. Iron acquisition in *Vibrio cholerae* / E.E. Wyckoff, A.R. Mey, S.M. Payne // *Biometals*. - 2007. - Vol.20, No.3-4. - P.405-416.
270. Yekta, M.A. Lactoferrin inhibits *E. coli* O157:H7 growth and attachment to intestinal epithelial cells / M. Atef Yekta, F. Verdonck, W. Van Den Broeck et al. // *Veter. Medic.* - 2010. - Vol.55, No.8. - P. 359–368.
271. Xanthou, M. Immune protection of human milk / M. Xanthou // *Biol. Neonate*. - 1998. - Vol.74, No.2. - P.121-133.
272. Xiao, Y. Lactoferrin down regulates G1 cyclin-dependent kinases during growth arrest of head and neck cancer cells / Y. Xiao, C.L. Monitto, K.M.

Minhas, D. Sidransky // Clin. Cancer Res. – 2004. – Vol.10, No.24. – P.8683-8686.

273. Zhang, J. Expression of active recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic goats / J. Zhang, L. Li, Y. Cai et al. // Protein. Expr. Purif. - 2008. - Vol.57, No.2. - P.127–135.