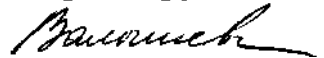


На правах рукописи



Вальшева Ирина Викторовна

Антилактоферриновая активность микроорганизмов

03.00.07 - «Микробиология»

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Оренбург-2005

Диссертация выполнена в Институте клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук,
профессор

Бухарин Олег Валерьевич

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук,
профессор

Габидуллин Зайнулла Гайнулинович

доктор медицинских наук,
профессор

Усвяцов Борис Яковлевич

Ведущая организация -

Челябинская государственная медицинская академия

Защита состоится «25» мая 2005 г. в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д.208.066.03 в Оренбургской государственной медицинской академии по адресу: 460000, г. Оренбург, ул. Советская, 6.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Оренбургской государственной медицинской академии.

Автореферат разослан «09» апреля 2005 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор *Немцева* Н. В. Немцева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Лактоферрин - железосвязывающий гликопротеин из семейства трансферринов, участвующий в ряде гомеостатических функций организма человека. С начальных этапов изучения лактоферрина было известно, что он играет роль в неспецифической защите организма, оказывая как бактериостатическое, так и бактерицидное действие на микроорганизмы (грамположительные и грамотрицательные бактерии, спирохеты, грибы, простейшие, вирусы). Описаны механизмы антимикробного действия лактоферрина: способность конкурировать с микроорганизмами за ионы железа в среде (Masson P. L., Heremans J. F., 1966); взаимодействие с клеточной стенкой микроорганизмов, которое приводит к нарушению транспортной функции мембраны (Visca P. et al., 1990; Ellass-Rochard E. et al., 1995); протеолитическое расщепление факторов вирулентности микроорганизмов (Qiu J. et al., 1998; Plaut A. G. et al., 2000; Hendrixson D. R. et al., 2003); образование активных производных - лактоферрицинов и лактоферрампина (Bellamy W. et al., 1992; van der Kraan M. I. et al., 2004); стимуляция фагоцитоза (Broxmeyer H. E. et al., 1990).

В настоящее время известно, что микроорганизмы способны подавлять многие факторы естественной резистентности организма хозяина, такие как лизоцим, комплемент, гистоноподобные белки, катионный белок тромбоцитов (Бухарин О. В., 1999). Наличие факторов персистенции обеспечивает бактериям длительное нахождение в макроорганизме. Разработка методических приемов микробиологического тестирования персистентного потенциала бактерий позволяет повысить качество диагностики и терапии инфекционных заболеваний.

В то же время, вопрос об адаптации микроорганизмов к антимикробному действию лактоферрина остается в значительной степени не изученным.

Цель и задачи исследования

Целью диссертационного исследования явилось определение способности микроорганизмов к инактивации лактоферрина и оценка биологической роли этого признака. Для реализации этой

цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. Разработать метод определения антилактоферриновой активности (АЛФА) микроорганизмов.
2. Определить распространенность и выраженность антилактоферриновой активности у микроорганизмов различных групп.
3. Оценить биологическую роль антилактоферриновой активности микроорганизмов.

Научная новизна

Разработан метод определения антилактоферриновой активности микроорганизмов, основанный на определении остаточного количества лактоферрина в инкубационной смеси с помощью иммуноферментного анализа (патент РФ на изобретение № 2245923). Данный метод позволяет количественно определять АЛФА у широкого круга микроорганизмов, характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью, сокращает время исследования.

С помощью разработанного метода определена антилактоферриновая активность у стафилококков, стрептококков, энтеробактерий, франциселл, дрожжеподобных грибов, выделенных из различных биотопов организма человека в норме и при инфекционных заболеваниях. Более половины (60-80%) исследуемых культур микроорганизмов обладали способностью инактивировать лактоферрин. Установлено, что выраженность и распространенность АЛФА зависят от источника выделения микроорганизмов и формы инфекционного процесса. Высокие значения АЛФА бактерий были выявлены у культур, изолированных из биотопа с высоким содержанием лактоферрина (репродуктивный тракт женщин), а также при хронических воспалительных заболеваниях и от бактерионосителей.

На модели экспериментальной стафилококковой инфекции определена роль антилактоферринового признака бактерий в феномене их персистенции - длительного переживания возбудителя в организме хозяина. При инфицировании лабораторных животных изогенными клонами *Staphylococcus aureus*, отличающимися по АЛФА, отмечены более длительные сроки бактериовыделения стафилококков, обладающих данной активностью. Отмечено, что клон с АЛФА вызывает деструктивные изменения в почечной ткани

мышей. Определены особенности взаимодействия клонов кишечной палочки, обладающих разным уровнем АЛФА, с клетками организма хозяина. Показано, что микроорганизмы с антилактоферриновой активностью подавляют регенераторные потенции тканей макроорганизма, вызывают деструктивные изменения, что характеризует антилактоферриновый признак как «малый» фактор патогенности.

Выявлено, что система «лактоферрин хозяина - антилактоферриновая активность микроорганизмов» имеет диагностическое значение и может быть использована для прогнозирования бактерионосительства. Высокий уровень АЛФА сальмонелл и сниженная концентрация лактоферрина в кишечнике в разгар заболевания обуславливают развитие реконвалесцентного сальмонеллезного бактерионосительства (патент РФ на изобретение № 2242756).

Научно-практическая ценность

Полученные данные расширяют теоретические представления о биологических свойствах патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, способствуют расшифровке патогенеза инфекционных заболеваний, что используется в процессе преподавания раздела «Инфекция и иммунитет» курса медицинской микробиологии в Оренбургской государственной медицинской академии.

Практическое значение исследований определяется разработкой метода изучения одного из факторов персистенции микроорганизмов - антилактоферриновой активности. Исследование у культур микроорганизмов персистентного потенциала позволяет прогнозировать переход болезни в хроническую форму, а также возникновение бактерионосительства.

Разработанный метод также может быть использован для прогнозирования течения инфекционного процесса (в частности, прогнозирования реконвалесцентного сальмонеллезного бактерионосительства), оценки эффективности терапии гнойно-воспалительных заболеваний.

Полученные материалы использованы в методических рекомендациях МЗ РФ «Прогнозирование тяжести течения и местное лечение острых ограниченных гнойно-воспалительных заболеваний легких и плевры» (Оренбург, 2004).

Положения, выносимые на защиту

1. Антилактоферриновая активность микроорганизмов широко распространена среди бактерий и грибов различных групп, определяя их адаптацию к многофакторному антимикробному действию лактоферрина.
2. Антилактоферриновая активность микроорганизмов является фактором персистенции бактерий, способствующим выживанию в организме хозяина.

Апробация работы

Материалы диссертации были доложены и обсуждены на: региональной конференции молодых ученых и специалистов (Оренбург, 2001; 2003; 2005); I Всероссийском Конгрессе по медицинской микологии (Москва, 2003); IV Всероссийской конференции «Персистенция микроорганизмов» (Оренбург, 2003); Всероссийской конференции «Здоровое питание населения России» (Москва, 2003); научной конференции «Фундаментальные и прикладные проблемы гистологии. Гистогенез и регенерация тканей» (Санкт-Петербург, 2004); научно-практической конференции по медицинской микологии (VII Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 2004); VII Всероссийской конференции по патологии клетки (Москва, 2005).

Диссертационное исследование является фрагментом научно-исследовательской работы, проводимой в рамках программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки - медицине» (проект «Разработка новых подходов к диагностике и терапии дисбиозов и ассоциированной с ними инфекционно-воспалительной патологии»), проекта «Антилактоферриновая активность микроорганизмов» (грант РФФИ № 04-04-96162) и темы «Изучение симбиотических взаимоотношений в микробиоценозах тела человека» (№ гос. регистрации 01.2.00 104756).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 3 публикации в рецензируемых научных журналах, 2 патента РФ на изобретение, пособие для врачей МЗ РФ.

Объем и структура диссертационной работы

Диссертация изложена на 135 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, главу по материалам и методам исследования, три главы собственных исследований, заключение, выводы, приложения. Указатель литературы содержит 219 источников литературы, из которых 60 отечественных и 159 зарубежных. Текст иллюстрирован 14 таблицами и 24 рисунками. Диссертация содержит 6 приложений.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В работе использовано 368 штаммов микроорганизмов, из них 105 штаммов *Staphylococcus* spp., 8 штаммов *Streptococcus* spp., 157 штаммов энтеробактерий (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, *Shigella flexneri*), 38 штаммов *F. tularensis*, 60 штаммов дрожжеподобных грибов (*Candida albicans*, *Rhodotorula mucilaginosa*). Выделение и идентификацию штаммов проводили общепринятыми методами по морфологическим, тинкториальным, культуральным свойствам (Биргер М. О. и др., 1982). Биохимические свойства микроорганизмов выявляли с использованием тест-систем «ЭНТЕРОтест 24», «СТАФИтест 16», «СТРЕПТОтест 16» («Lachema», Чехия). Способность к ассимиляции углеводов дрожжеподобными грибами рода *Candida* и *Rhodotorula* исследовали с использованием системы «API 20C AUX» («bioMerieux», Франция).

У выделенных штаммов микроорганизмов изучали биологические свойства: протеолитическую активность (Никитин Н. В., 1986), антилизоцимную и антикомплементарную активности (Бухарин О. В., 1999).

Для определения биологической роли АЛФА микроорганизмов использовали интраорбитальное заражение мышей линии СВА отобранной парой изогенных клонов штамма *Staphylococcus aureus*. Один клон имел высокую антилактоферриновую активность (клон «АЛ ф А +»), значение АЛ ф А второго клона было низким (клон «АЛФА -»). Анализу подвергались: длительность бактериовыделения, массивность обсеменения почечной ткани животных, доля инфицированных стафилококком животных в различные сроки на-

блюдения, распространенность и средние значения АЛФА стафилококков в высеваемых из почечной ткани популяциях; распределение клонов по изучаемому признаку в субпопуляциях. Параллельно с бактериологическим исследованием проведено гистологическое изучение почечной ткани инфицированных животных. Для поиска общих закономерностей участия АЛФА микроорганизмов в формировании инфекционного процесса была воспроизведена экспериментальная инфекция с интратрахеальным заражением крыс изогенными клонами кишечной палочки (*E. coli* A37), отличающимися уровнем экспрессии антилактоферринового признака. Для гистологического исследования брали кусочки трахеи, бронхов, легкого. Материал фиксировали в 12% нейтральном формалине, после стандартной проводки готовили гистопрепараты, окрашивали гематоксилином Майера и эозином, исследовали методами световой и электронной микроскопии, морфометрии.

Статистическая обработка результатов проводилась общепринятыми методиками с использованием критерия Стьюдента, корреляционного анализа (Лакин Г. Ф., 1990).

Разработка метода определения антилактоферриновой активности микроорганизмов

Для определения антилактоферриновой активности микроорганизмов был разработан метод с применением иммуноферментного анализа (рис. 1). При определении АЛФА исследуемые культуры микроорганизмов выращивали на плотной питательной среде при 37°C в течение 18-24 ч. Из выросшей агаровой культуры готовили взвесь микроорганизмов (10 ед. по оптическому стандарту мутности ГИСК им. Л. А. Тарасевича) в жидкой питательной среде. Готовили раствор лактоферрина (200 нг/мл) на забуференном физиологическом растворе.

Взвесь исследуемых культур микроорганизмов объемом 150 мкл вносили в лунки стерильного полистиролового планшета (Lab-systems, Финляндия) и смешивали с 150 мкл приготовленного раствора лактоферрина (конечная концентрация лактоферрина 100 нг/мл). Параллельно с опытной готовили контрольную пробу: в лунки планшета вносили 150 мкл раствора лактоферрина и 150 мкл жидкой питательной среды. Пробы инкубировали при 37°C в течение 24 ч. После инкубации содержимое лунок переносили в пла-

стиковые пробирки, центрифугировали при 3000-8000 об/мин в течение 20 мин на холоде, отбирали 50 мкл супернатанта в опытной и контрольной пробах.

Пробы разводили в 5 раз (до объема 250 мкл) рабочим раствором фосфатно-солевого буфера с твином. Для достоверности получаемых результатов опыт и контроль проводился в трех дубликатах.

Концентрацию лактоферрина в пробах проводили с использованием реагентов ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия). В лунки первого ряда планшета с иммобилизованными антителами к лактоферрину вносили по 100 мкл растворов калибровочных образцов. В остальные лунки планшета вносили по 100 мкл анализируемых образцов. Планшет выдерживали в течение 30 мин при температуре 37°C, после чего содержимое лунок удаляли энергичным встряхиванием в кювету с дезинфицирующим раствором. Лунки планшета промывали 3 раза рабочим буферным раствором и дважды - дистиллированной водой.

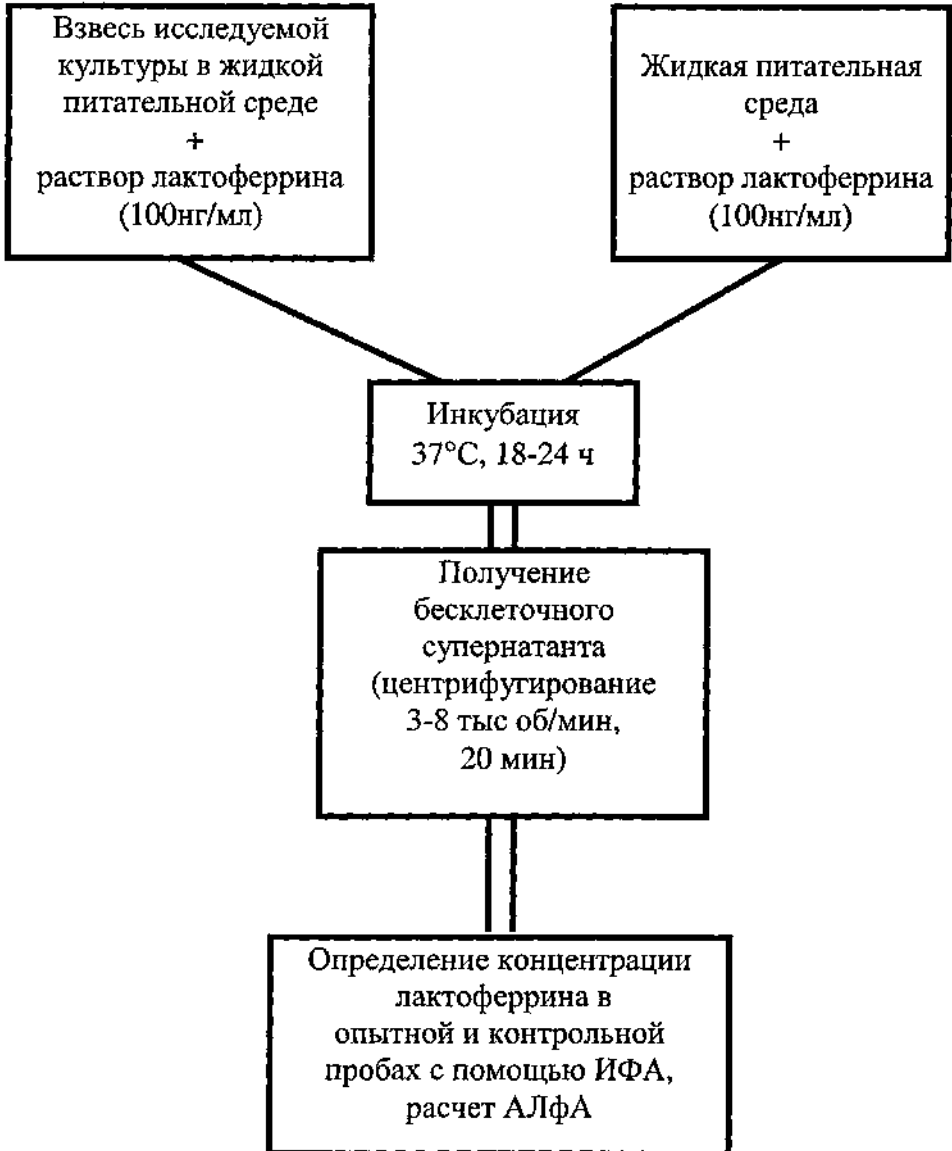
Далее, во все лунки добавляли по 100 мкл раствора конъюгата антител с пероксидазой хрена и выдерживали в течение 30 мин при температуре 37°C, после чего содержимое лунок удаляли встряхиванием, лунки промывали 3 раза рабочим буферным раствором и дважды - дистиллированной водой. Затем во все лунки добавляли по 100 мкл раствора тетраметилбензидина. Стрипы выдерживали в течение 10-20 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте. По истечении указанного времени во все стрипы добавляли 100 мкл стоп-реагента (2 н. серная кислота). Регистрацию результатов в лунках с опытной и контрольной пробами проводили на фотометре ИФА-ОЭП (Россия) при длине волны 450 нм. По результатам измерения строили график в координатах: ось абсцисс - концентрация лактоферрина в калибровочных образцах (нг/мл), ось ординат - соответствующее значение оптической плотности. Концентрацию лактоферрина в опытных и контрольных пробах определяли по калибровочному графику.

Найденные по графику значения концентрации лактоферрина умножали на коэффициент разведения проб, т.е. на 5 и выражали результат в нг/мл.

Способ определения антилактоферриновой активности
микроорганизмов

ОПЫТ

КОНТРОЛЬ



Рассчитывали антилактоферриновую активность по формуле:

$$C = C_k - C_o, \text{ где}$$

C - антилактоферриновая активность микроорганизмов, нг инактивированного лактоферрина/мл супернатанта;

C_k - концентрация лактоферрина в контроле, нг/мл;

C_o - концентрация лактоферрина в опыте, нг/мл.

В отличие от ранее разработанного способа определения АЛФА (патент РФ на изобретение № 2156807), новый метод позволяет не только качественно выявлять данный признак, но и количественно выражать уровень антилактоферриновой активности микроорганизмов. Кроме того, инкубация живых культур микроорганизмов, а не их супернатантов, с лактоферрином значительно повышает частоту выявления АЛФА бактерий, поскольку в первом случае могут быть обнаружены как конститутивные, так и индуцибельные ингибиторы лактоферрина. Отказ от использования живой тест-культуры *Micrococcus luteus* позволяет определять АЛФА у штаммов микроорганизмов, продуцирующих лизоцим, гистоноподобные белки, перекись водорода и другие антагонистически активные вещества многих микроорганизмов (бифидобактерий, лактобацилл, стрептококков, синегнойной палочки и др.). Применение иммуноферментного анализа приводит к повышению чувствительности и специфичности метода (Егоров А. М., 1991).

Таким образом, разработанный метод позволяет в короткие сроки, с высокой точностью, количественно определять АЛФА у широкого круга микроорганизмов.

Характеристика антилактоферриновой активности микроорганизмов

Распространенность и выраженность АЛФА микроорганизмов определяли у 368 штаммов бактерий и грибов. Установлено, что 60-80% штаммов микроорганизмов различных видов способны инактивировать лактоферрин. Выраженность АЛФА микроорганизмов составила от 4 до 13 нг/мл в зависимости от видовой принадлежности.

При изучении особенностей распространенности и выражен-

ности АЛФА у бактерий, выделенных из различных биотопов организма человека и при разных формах инфекционного процесса было отмечено, что распространенность АЛФА у штаммов *E. coli*, *K. pneumoniae* и *S. aureus*, выделенных из влагалища, составила $90,0 \pm 9,5$, 100 и $85,7 \pm 13,2\%$ соответственно. Частота встречаемости признака у фекальных штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae* была ниже по сравнению с вагинальными штаммами - $43,5 \pm 10,3$ и $60,0 \pm 12,6\%$ соответственно ($p < 0,01$). Штаммы *S. aureus*, выделенные со слизистой оболочки носовой полости, инактивировали лактоферрин в $65,2 \pm 9,9\%$ случаев.

Уровень АЛФА энтеробактерий, выделенных из влагалища, был в 3-4 раза выше, чем у тех же видов микроорганизмов, выделенных из кишечника ($p < 0,01$), составив у *E. coli* соответственно $17,0 \pm 3,8$ и $4,5 \pm 1,7$ нг/мл; у *K. pneumoniae* соответственно $15,7 \pm 1,2$ и $5,9 \pm 1,3$ нг/мл (рис. 2). Дрожжеподобные грибы, выделенные из кишечника, инактивировали $7,1 \pm 1,1$ нг/мл лактоферрина, в то время как выделенные из влагалища - $11,3 \pm 2,8$ нг/мл. Штаммы золотистого стафилококка, выделенные со слизистой носовой полости, обладали АЛФА $8,4 \pm 1,0$ нг/мл, что было ниже, чем АЛФА влагалищных штаммов ($10,0 \pm 1,0$ нг/мл).

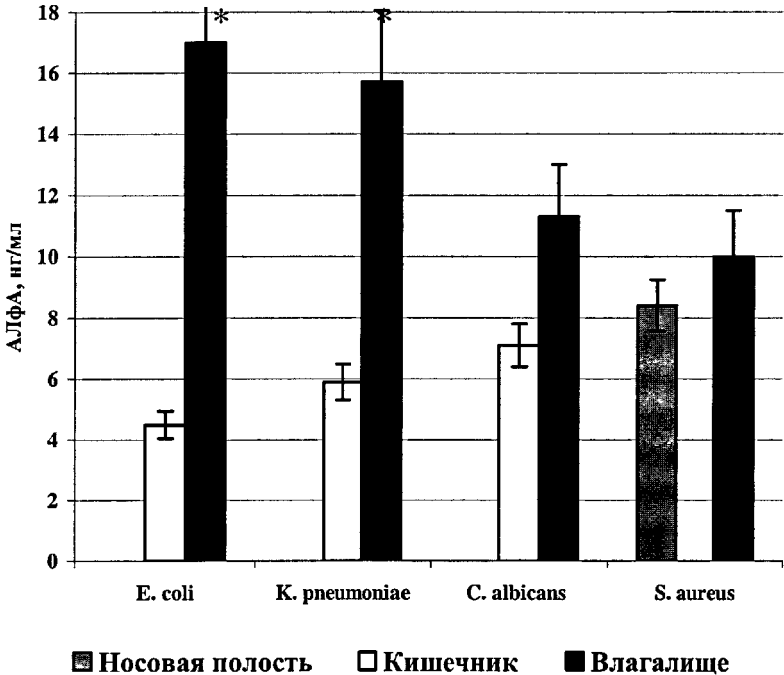
Таким образом, исследование АЛФА микроорганизмов, выделенных из кишечника, влагалища и со слизистой оболочки носовой полости, показало, что данный признак широко распространен, зависит от видовой принадлежности, биотопа. В нижних отделах репродуктивного тракта женщин значения АЛФА достигают более высоких значений по сравнению с кишечником и носовой полостью. Не исключено, что выявленная закономерность объясняется тем, что во влагалище концентрация лактоферрина примерно в 10 раз выше, чем в носовой полости и в несколько раз выше, чем в кишечнике.

Распространенность изучаемого признака у штаммов микроорганизмов - возбудителей острых гнойно-воспалительных заболеваний (ГВЗ) - находилась на низком уровне (16-25%), составив $33,3 \pm 19,2\%$ у *E. coli*, $31,3 \pm 11,6\%$ у *S. aureus*, $33,3 \pm 19,2\%$ у *S. epidermidis*. При хронических ГВЗ $66,7 \pm 19,2\%$ штаммов кишечной палочки, $66,7 \pm 15,7\%$ штаммов золотистого и $75,0 \pm 15,3\%$ штаммов эпидермального стафилококков инактивировали лактоферрин.

Штаммы *S. aureus*, выделенные от бактерионосителей, обладали АЛФА в $65,2 \pm 9,9\%$ случаев.

Рисунок 2.

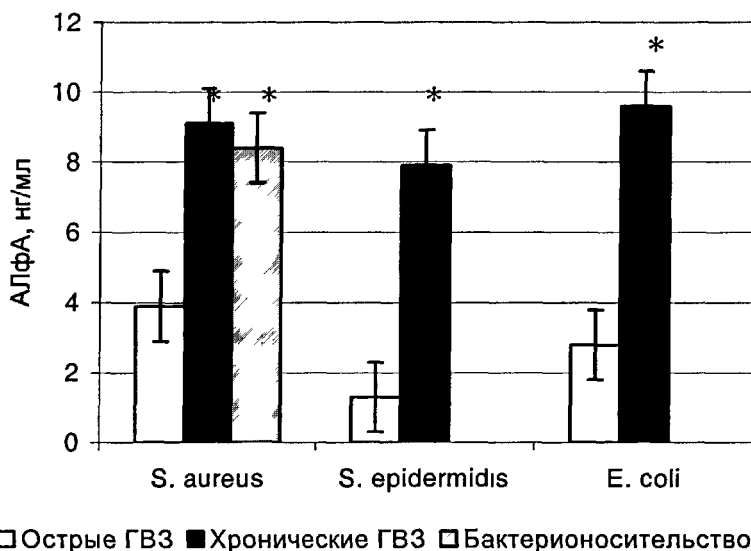
Выраженность АЛФА микроорганизмов, выделенных из различных источников



Примечание: * - $p < 0,01$ для сравниваемых групп

Уровень антилактоферриновой активности всех исследуемых микроорганизмов, выделенных при острой форме гнойно-воспалительных заболеваний, был низким (рис. 3). АЛФА штаммов кишечной палочки составила $2,8 \pm 2,2$ нг/мл, золотистого стафилококка - $3,9 \pm 1,0$ нг/мл, эпидермального стафилококка - $1,3 \pm 0,8$ нг/мл. При хронической форме инфекционного процесса выраженность АЛФА у всех трех видов исследуемых микроорганизмов была выше ($p < 0,05$): $9,6 \pm 0,5$; $9,1 \pm 1,5$ и $7,9 \pm 1,4$ нг/мл соответственно у *E. coli*, *S. aureus* и *S. epidermidis*. Штаммы золотистого стафилококка, выделенные от бактерионосителей, обладали АЛФА $8,4 \pm 1,0$ нг/мл, что также превышало уровень АЛФА штаммов, выделенных при острой форме заболеваний ($p < 0,05$).

Выраженность АЛФА микроорганизмов, выделенных при различных формах инфекционного процесса



Примечание: * - $p < 0,05$ для сравниваемых групп

Таким образом, при хроническом течении гнойно-воспалительных заболеваний и бактерионосительстве антилактоферриновая активность микроорганизмов достигает наиболее высоких значений, по сравнению с острым течением. Данный факт свидетельствует, что АЛФА микроорганизмов способствует длительному нахождению возбудителя в организме хозяина.

Изучена связь антилактоферринового признака микроорганизмов с некоторыми их биологическими характеристиками. Обнаружена корреляционная связь между продукцией бактериями протеаз и АЛФА. В эксперименте на штаммах *S. aureus* и *S. enteritidis* показано, что добавление к взвеси исследуемой культуры бактерий ингибиторов сериновых протеаз (EDTA, PMSF) снижало АЛФА микроорганизмов в несколько раз.

Ингибиторы протеаз оказывали влияние на АЛФА и сальмонелл, и стафилококков. В опыте среднее значение антилактоферриновой активности сальмонелл составило $5,0 \pm 1,3$ нг/мл, АЛФА ста-

филококков - $5,8 \pm 1,3$ нг/мл. При добавлении в опытную пробу ЭД-ТА антилактоферриновая активность сальмонелл снизилась до $1,3 \pm 0,5$ нг/мл ($p < 0,05$), у стафилококков - до $1,8 \pm 0,7$ нг/мл. Добавление PMSF также снижало АЛФА сальмонелл и золотистого стафилококка. Эти данные могут объяснить один из вероятных механизмов инактивации бактериями лактоферрина - протеолиз. Связь между антилактоферриновой активностью и такими факторами персистенции, как антилизоцимная и антикомплементарная активность, не установлена.

Биологическая роль антилактоферриновой активности микроорганизмов

Для определения биологической роли антилактоферриновой активности микроорганизмов использовали модели экспериментальной инфекции и клинико-бактериологическое исследование.

При проведении стафилококковой инфекции установлено, что течение экспериментального инфекционного процесса зависит от начального уровня АЛ ф А клона *S. aureus*. Была изучена длительность бактериовыделения *S. aureus* из почечной ткани мышей. От животных, инфицированных клоном «АЛФА -», бактерии высевались до 35 дня, в среднем $16,5 \pm 2,0$ дней; тогда как при заражении клоном «АЛФА +», микроорганизмы высевались до 49 дня, а средний срок бактериовыделения составил $25,1 \pm 2,7$ дней ($p < 0,05$). Таким образом, длительность выделения микроорганизмов из почечной ткани животных зависела от начального уровня антилактоферриновой активности клонов золотистого стафилококка.

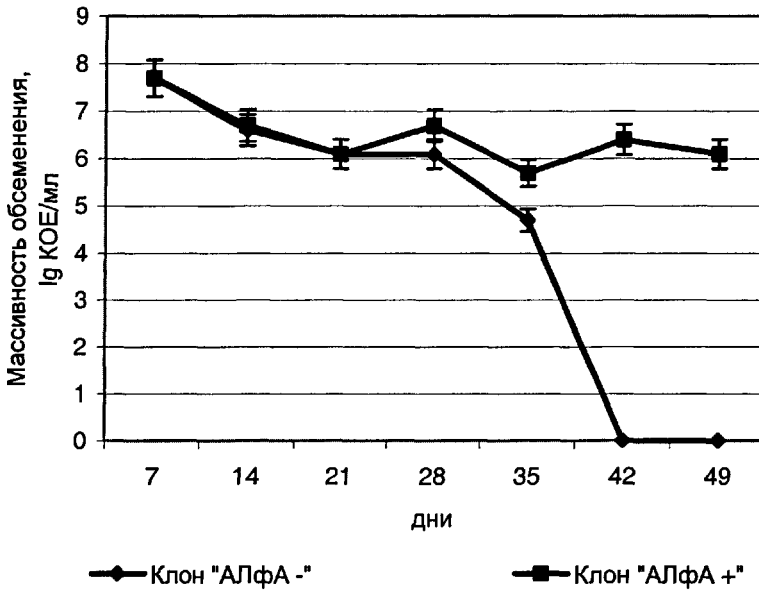
При изучении динамики массивности обсеменения почечной ткани животных, инфицированных клонами *S. aureus*, отличающимися по антилактоферриновому признаку, была обнаружена зависимость между массивностью обсеменения почек и сроками бактериовыделения (рис. 4). Массивность обсеменения почечной ткани мышей, зараженных клоном «АЛФА -», снижалась: если на 7 день она составляла $7,7 \pm 1,5$ lg КОЕ/г, перед прекращением бактериовыделения, на 35 день, данный показатель снизился до $4,7$ lg КОЕ/г. Анализ полученных данных выявил статистически значимую обратную корреляцию между сроками исследования и массивностью обсеменения почек лабораторных животных ($r = -0,92$).

При инфицировании мышей клоном «АЛФА +» исходная мас-

сивность обсеменения почек (на 7 сутки) составила $7,7 \pm 1,5$ Ig КОЕ/г. В течение инфекционного процесса происходили колебания массивности обсеменения. К 49 суткам массивность обсеменения почечной ткани мышей составила $6,1 \pm 0,6$ Ig КОЕ/г.

Рисунок 4.

**Динамика микробной обсемененности почек
в зависимости от исходного уровня АЛФА *S. aureus***



При инфицировании клоном «АЛФА -» с течением времени снижалась массивность обсеменения стафилококками почек животных, что приводило к полному освобождению организма от возбудителей к 42 суткам. Распространенность и выраженность антилактоферриновой активности клона «АЛФА -» характеризовалась низкими значениями; в период, предшествующий окончанию бактериовыделения, признак не регистрировался. Данное течение инфекционного процесса подобно краткосрочному бактерионосительству и заканчивается элиминацией возбудителя из макроорганизма (Бондаренко В. М. и др., 1991).

Экспериментальный инфекционный процесс, вызванный клоном *S. aureus* с антилактоферриновой активностью («АЛ ф А +»), носил затяжной характер. Клон длительно высевался из почечной ткани мышей, микробная обсемененность почек мышей постоянно находилась на высоком уровне. Распространенность АЛФА в популяциях данного клона в течение экспериментальной инфекции составляла 90 - 100%. Клон изначально характеризовался гетерогенностью популяций по антилактоферриновому признаку. Гетерогенность популяций возрастала в ходе инфекционного процесса, в субпопуляциях преобладали клоны с уровнем признака более 20 нг/мл. Неоднородность популяционного состава клона золотистого стафилококка по АЛФА, вероятно, представляет своеобразный резерв для изменчивости под влиянием факторов естественной резистентности организма, что согласуется с данными по антилизоцимной активности шигелл (Герасимов В. Е., 1987), стафилококков (Шеенков Н. В., 1993). Наличие высокого уровня антилактоферриновой активности у возбудителя позволяет ему длительно находиться в макроорганизме. Таким образом, вероятно, АЛФА микроорганизмов вносит свой вклад в персистентный потенциал бактерий.

Поскольку при интраорбитальном заражении животных *S. aureus* наблюдается преимущественное поражение почечной ткани (Анатолий С. А. и др., 1971; Аникина Т. А. и др., 1975), на 7 сутки после инфицирования было проведено гистологическое исследование паренхиматозных и стромальных элементов почек экспериментальных животных двух сравниваемых групп (инфицированных клоном *S. aureus* «АЛФА -» и клоном «АЛФА +»). Оказалось, что введение в организм экспериментальных животных клона *S. aureus*, обладающего антилактоферриновой активностью, приводило к формированию множественных очагов деструктивных изменений паренхиматозных и стромальных элементов почки на фоне выраженного геморрагического отека, определяя течение воспалительного процесса.

На базе лаборатории функциональной морфологии клетки ИКиВС УрО РАН была поставлена экспериментальная инфекция с интратрахеальным заражением крыс изогенными клонами кишечной палочки, отличающимися по уровню антилактоферриновой активности. Морфо-функциональные изменения тканевых элементов

слизистой оболочки трахеи экспериментальных животных в основном носили сходные черты: обнаружены альтеративно-экссудативные процессы в бронхо-сосудистом и альвеоло-сосудистом барьерах. Однако, введение микроорганизмов «АЛФА +» приводило к более выраженным ультраструктурным изменениям во всех сериях опытов и стадиях наблюдений, что проявлялось в существенном нарушении межклеточных контактов эпителиоцитов, в более значительной вазодилатации сосудов микроциркуляторного русла, экстравазации форменных элементов крови, включая эритроциты. При введении клона «АЛФА +» отмечали изменения ультраструктуры реснитчатого аппарата эпителия: деструкция цитолеммы, микротрубочек, дисконкомплексация динеиновых и нексининовых нитей. Усиление секреции бокаловидных клеток приводило к усугублению нарушений мукоцилиарного барьера. Это, в свою очередь, усиливало десквамацию эпителия, что способствовало глубокому проникновению возбудителей в стенку трахеи. В собственной пластинке слизистой оболочки, просвете микрососудов, макрофагах были обнаружены жизнеспособные реактивно измененные бактерии.

При введении бактерий без АЛФА отмечались процессы усиления внутриклеточной регенерации эпителиальных и соединительнотканых клеток, что проявлялось в увеличении численности свободных рибосом (полисом) в условной единице площади цитоплазмы, в том числе в участках ее секвестрации.

При введении клона «АЛФА +» деструкция не сопровождалась адекватными репаративными процессами, что свидетельствует об угнетении адаптивных и компенсаторных свойств тканей в этих условиях.

Из данных литературы известно, что наличие факторов персистенции у возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний обуславливает утяжеление течения заболевания (Первушина Л. А., 1990; Швецов С. А., 1994). Не исключено, что тяжесть течения заболевания обусловлена деструктивными изменениями клеток макроорганизма под воздействием возбудителя, обладающего персистентным потенциалом, что, по-видимому, позволяет оценивать АЛФА микроорганизмов в качестве «малого» фактора патогенности.

Учитывая, что антилактоферриновый признак микроорганиз-

мов может быть отнесен к факторам персистенции, данные знания представляется возможным использовать в клинико-лабораторной практике.

В условиях клиники обнаружение у исследуемых культур микроорганизмов факторов персистенции (в том числе АЛФА) позволяет прогнозировать возникновение бактерионосительства.

Система «лактоферрин хозяина - антилактоферриновая активность микроорганизмов» имеет диагностическое значение и может быть использована для прогнозирования сальмонеллезного реконвалесцентного бактерионосительства. Известно, что в разгар заболевания (сальмонеллез) концентрация лактоферрина в копрофильтратах увеличивается по сравнению со здоровыми людьми в 12 раз, постепенно снижаясь к периоду реконвалесценции. При нарушениях в системе неспецифической защиты организма от инфекции концентрация лактоферрина в кишечнике снижается.

Анализ данных показал, что при значениях антилактоферриновой активности возбудителя 7,8-13,0 нг/мл и содержании лактоферрина в копрофильтрате больного сальмонеллезом в количестве 460-1400 нг/мл развивается сальмонеллезное бактерионосительство.

Оценивая материал в целом, следует выделить основные моменты: во-первых, антилактоферриновая активность микроорганизмов широко распространена среди бактерий и грибов, определяя их адаптацию к многофакторному антимикробному действию лактоферрина. Во-вторых, антилактоферриновая активность микроорганизмов является одним из факторов персистенции бактерий, способствующим выживанию в организме хозяина. Изучение механизмов инактивации бактериями лактоферрина перспективно как с теоретической, так и с практической точек зрения.

ВЫВОДЫ

1. Разработан иммуноферментный метод определения антилактоферриновой активности микроорганизмов, основанный на определении остаточного количества лактоферрина в инкубационной смеси, который позволяет в короткие сроки, с высокой точностью, количественно определять АЛФА у микроорганизмов различных групп.

2. Установлена высокая частота встречаемости антилактоферринового признака у бактерий, выделенных из биотопов организма человека в норме и при инфекционных процессах. Высокие значения АЛФА характерны для культур, выделенных из биотопа с высокой концентрацией лактоферрина (репродуктивный тракт женщин), по сравнению со штаммами, выделенными из кишечника и со слизистой носовой полости.
3. Обнаружена антилактоферриновая активность грибов видов *Candida albicans* и *Rhodotorula mucilaginosa*. Представители обоих таксонов характеризовались высокими показателями пентрантности и экспрессии АЛФА.
4. Распространенность и выраженность АЛФА у микроорганизмов, выделенных при хронической форме инфекционного процесса и от бактерионосителей, характеризуются более высокими значениями признака по сравнению с культурами, изолированными при острых формах заболевания.
5. На модели экспериментальной инфекции установлено, что клон золотистого стафилококка, обладающий высоким уровнем АЛФА, более длительно выделяется из организма мышей, по сравнению с клоном с низкой АЛФА.
6. Обнаружена корреляционная связь между продукцией протеаз и АЛФА *S. aureus*. Установлено, что ингибиторы протеаз подавляют АЛФА бактерий.
7. Бактерии с антилактоферриновой активностью снижают адаптивные и репаративные потенции клеток хозяина, приводя к деструктивным изменениям тканей и определяя течение воспалительного процесса.
8. Выявлено, что система «лактоферрин хозяина - антилактоферриновая активность микроорганизмов» имеет диагностическое значение и может быть использована для прогнозирования бактерионосительства. Высокий уровень АЛФА сальмонелл и сниженная концентрация лактоферрина в кишечнике в разгар заболевания обуславливают развитие реконвалесцентного сальмонеллезного бактерионосительства.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Сычева И. В. Способность микроорганизмов к инактивации лактоферрина / И. В. Сычева, А. В. Вальшев // Региональная научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов (сборник материалов). - Ч. 3. - Оренбург: ИПК ОГУ, 2001. - С. 162-163.
2. Вальшев А. В. Инактивация факторов естественной резистентности грибами *Rhodotorula mucilaginosa* / А. В. Вальшев, Н. Б. Перунова, И. В. Вальшева // Успехи медицинской микологии: материалы Первого Всероссийского конгресса по медицинской микологии (Москва, 20-21 февраля 2003 г.). - Т. 1. - М: Национальная академия микологии, 2003. С. 54-55.
3. Вальшева И. В. Антилактоферриновая активность микроорганизмов из различных биотопов тела человека / И. В. Вальшева // Региональная научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Оренбургской области (сборник материалов). - Ч. 1. - Оренбург: РИК ГОУ ОГУ, 2003. - С. 177-178.
4. Острый пиоторакс, вызванный *Providencia rettgeri* / О. М. Абрамзон, А. В. Вальшев, О. Л. Карташова и др. // Грудная и серд.-сосуд. хир. - 2003. - № 3. - С. 80.
5. Новый метод определения антилактоферриновой активности микроорганизмов / И. В. Вальшева, А. В. Вальшев, О. Л. Карташова и др. // Журн. микробиол. - 2003. - № 4. - С. 64-67.
6. 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.
7. Способ прогнозирования реконвалесцентного сальмонеллезного бактерионосительства / О. В. Бухарин, И. Н. Чайникова, А. В. Вальшев и др. // Патент РФ на изобретение № 2242756, Бюл. № 35, 2004 г.
8. Способ определения антилактоферриновой активности микроорганизмов / О. В. Бухарин, А. В. Вальшев, И. Н. Чайникова и др. // Патент РФ на изобретение № 2245923, Бюл. № 4, 2005 г.
9. Прогнозирование тяжести течения и местное лечение острых ограниченных гнойно-воспалительных заболеваний легких и плевры / О. М. Абрамзон, О. В. Бухарин, П. П. Курлаев и др. // Пособие для врачей МЗ РФ.- Оренбург. - 2003.- 24 с.

Для заметок

Вальшева Ирина Викторовна

Антилактоферриновая активность микроорганизмов

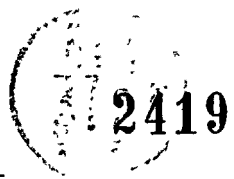
Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Оригинал - макет изготовлен с помощью текстового редактора
Microsoft Word 2000 for Windows. Подписано в печать 15.03.2005.

Гарнитура Таймс. Печать оперативная. Усл. печ. л. - 1,0.

Тираж 100 экз.



19 МАЙ 2005