

## ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ЛАКТОФЕРРИНА НА ХАРАКТЕРИСТИКИ КРИВЫХ РОСТА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

<sup>1</sup>Афанасьева Я.И., <sup>1</sup>Максимова А.А., <sup>1</sup>Подпорин М.С., <sup>1</sup>Архипова А.М.

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова МЗ РФ,  
кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии  
г. Москва

**Ключевые слова:** лактоферрин, кривая роста, бактериальные популяции, биореактор, фарминдустрия

**Резюме:** На основании анализа кривых роста различных штаммов микроорганизмов, произведена оценка бактерицидной, бактериостатической и фунгицидной активности различных образцов белка лактоферрин. По результатам проведенного исследования, обоснована возможность применения лактоферрина в качестве фактора преодоления некоторых механизмов резистентности бактерий к антибактериальным препаратам и использования его в качестве их альтернативы. Использованный метод культивирования позволяет получить воспроизводимые результаты, доступен для широкого использования и может быть рекомендован для получения объективных, сравнимых между собой результатов.

**Resume:** Based on the analysis of the growth curves of various strains of microorganisms, the bactericidal, bacteriostatic and fungicidal activity of various lactoferrin protein samples was evaluated. According to the results of the study, the possibility of using lactoferrin as a factor in overcoming some of the mechanisms of bacterial resistance to antibacterial drugs and using it as their alternative has been substantiated. The cultivation method used allows to obtain reproducible results, is available for wide use and can be recommended for obtaining objective, comparable results.

**Актуальность.** В настоящее время частота случаев развития гнойно-воспалительных процессов в полости рта значительно возросла ввиду неэффективной антибиотикотерапии. Одной из причин этого явления послужила приобретенная резистентность патогенных микроорганизмов, многие из которых играют важную роль в формировании биопленки, дальнейшем развитии кариеса зубов и воспалительных заболеваний тканей пародонта [3]. В связи с этим врачи стали искать наиболее эффективные средства антиадгезивной, противобиоплёночной и микробоцидной направленности действия, которые могут быть использованы в лечебных и профилактических целях. Ранее было описано высокоэффективное бактерицидное и бактериостатическое действие белка лактоферрина. Данный белок относится к железосвязывающим гликопротеинам из семейства трансферринов, по своему строению сходен с другими белками данного семейства. Это мономерный  $\beta$ -глобулин в состав которого входит более 690 аминокислотных остатков [2]. Присутствуя в молоке и на слизистых оболочках в результате экзокринной секреции, он является одним из факторов неспецифической защиты организма, что позволяет его использовать в борьбе с резистентной микрофлорой полости рта. Бактериостатическое действие лактоферрина реализуется посредством связывания ионов железа, что лишает бактерий этого микроэлемента, вызывая ингибирование их роста. Наряду с этим проявляет активность против некоторых факторов вирулентности микроорганизмов, расщепляя их по типу сериновых протеаз, препятствуя, таким образом, их проникновению в клетки человека [4]. В результате

кислотного гидролиза лактоферрина крупного рогатого скота, группой японских исследователей был получен продукт с антибактериальной активностью – лактоферрицин В, в то время как лактоферрин человеческий гидролизует желудочным пепсином до лактоферрицина Н. Еще одно производное лактоферрина коров – лактоферрампин – оказывает фунгицидное действие на *Candida albicans* (почти в 3,5 раза более выраженное по сравнению с нативным лактоферрином коров). При совместном использовании с антибиотиками, лактоферрин во много раз увеличивает эффект их действия, однако при этом привыкания микроорганизмов к лактоферрину не происходит [1].

**Цель:** Оценить бактерицидную и бактериостатическую эффективность различных видов лактоферрина путем двухступенчатого контроля в отношении резистентных форм патогенных микроорганизмов полости рта.

**Задачи:** 1. Оценить эффективности применения лактоферрина в отношении представителей резидентной и пародонтопатогенной микрофлоры полости рта; 2. Выявить спектр противомикробного действия каждого из исследуемых видов лактоферрина; 3. Определить возможность применения лактоферрина как альтернативу антибиотикам для преодоления резистентности бактерий к антибактериальным препаратам; 4. Обосновать возможность использования биореактора «Реверс-Спиннер RTS-1» для получения достоверных и сравнимых между собой данных о характере противомикробного действия лактоферрина.

**Материал и методы.** В клинической части работы было отобрано 30 пациентов в возрасте 19-50 лет с хроническим гингивитом. Забор исследуемого материала проводили из десневой борозды с помощью бумажных штифтов, с их последующим помещением в транспортную среду для транспортировки в лабораторию. В экспериментальной части проводили первичный посев исследуемого материала на плотные питательные среды с целью получения чистой культуры. После идентификации были отобраны следующие штаммы микроорганизмов: *S. aureus*, *S. constellatus*, *C. glabrata*, *F. nucleatum*. Для каждого эксперимента отдельно в стерильных пробирках объемом 5 мл готовили бактериальную взвесь в общем количестве 5 мл. Оптическая плотность полученной взвеси была измерена с помощью Денситометра DEN-1В (Biosan), для каждого эксперимента она составила  $2,00 \pm 0,3$  Mcf. Для определения чувствительности выделенных штаммов к образцам лактоферрина применяли собственную модификацию способов серийных разведений, разработанную на кафедре микробиологии, иммунологии, вирусологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова. Культивирование микроорганизмов и оценку их роста в режиме реального времени проводили в биореакторе RTS-1 (Biosan) с использованием жидких питательных сред производства Himedia Labs. PvtLimited. Интерпретацию результатов проводили по изменению оптической плотности (OD) при длине волны 850 нм.

**Результаты и их обсуждение:** Исследование динамики роста микроорганизмов проводили в 6 параллелях, что отражалось на графиках кривых роста бактериальных популяций контрольного образца, а также в присутствии ЛФ разной концентрации, выделенного из коровьего молока и рекомбинантного человеческого. Оценка контроля роста бактерий отражалась в изменении параметров

оптической плотности, на основании которых была построена кривая роста. На основании анализа кривых роста бактериальных популяций установлено, что лактоферрин выделенный из коровьего молока и рекомбинантный человеческий вызывали существенное снижение роста бактериальных популяций и грибов *Candida*. Причем бактериостатический эффект препаратов сохранялся на протяжении всего периода исследования (до 96 часов). Установлен более выраженный эффект рекомбинантного человеческого лактоферрина в отношении *S. aureus*, *S. constellatus*, *F. nucleatum* по сравнению с лактоферрином выделенным из коровьего молока, который, в свою очередь, был более эффективен в отношении грибов рода *Candida*. Используемый метод оценки кривых роста популяций позволяет получить воспроизводимые результаты, доступные для широкого использования, и также может быть рекомендован для получения объективных, сравнимых между собой, достоверных сведений о противомикробных свойствах различных перпаратов, выпускаемых отечественной фарминдустрией.

**Выводы:** Антимикробный спектр лактоферрина широк и охватывает бактерии, грибы, простейшие, вирусы. Механизмы антимикробного действия лактоферрина многообразны, включают конкуренцию с микроорганизмами за ионы железа в среде, нарушение транспортной функции цитоплазматической мембраны бактерий, протеолитическое расщепление ряда факторов вирулентности микроорганизмов, образование активных производных (лактоферрицинов), стимуляцию фагоцитоза и роста нормальной микрофлоры. Полученные данные позволяют рассматривать лактоферрин как хорошую альтернативу антибиотикам или как фактор, способствующий преодолению некоторых механизмов резистентности бактерий к антибактериальным препаратам.

### Литература

1. Бухарин О.В., Вальшев А.В., Вальшева И.В. Роль лактоферрина в противoinфекционной защите // Успехи современной биологии, 2011. Т. 131. №2. с. 135-144.
2. Царев В.Н., Гольдман И.Л., Садчикова Е.Р., Ипполитов Е.В., Подпорин М.С. Оценка влияния рекомбинантного лактоферрина человека на характеристики бактериальных популяций патогенов // Dental Forum, 2016. №4. с. 74.
3. Царев В.Н., Лабазанов А.А., Ипполитов Е.В., Шулаков В.В., Пашков Е.П. Проблема устойчивости возбудителей одонтогенной инфекции к антибиотикам и разработка экспресс-метода выявления резистентных штаммов // Клиническая стоматология, 2016. №4 (80). с. 46-51.
4. Goldman I.L., S.G. Georgieva, Y.G. Gurskiy, A.N. Krasnov, A.V. Deykin, A.N. Popov, T.G. Ermolkevich, A.I. Budzevich, A.D. Chernousov, E.R. Sadchikova. Production of human lactoferrin in animal // Biochem. Cell Biol. 2012. V. 90. P. 512–519.