

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-209>



# Методика оценки активности полифункционального белка трансферринового ряда при экспериментальном моделировании кинетики развития *Staphylococcus aureus*

Царев В.Н.<sup>1</sup>, Макеева И.М.<sup>2</sup>, Садчикова Е.Р.<sup>3</sup>, Подпорин М.С.<sup>1</sup>,  
Трефилова Ю.А.<sup>1</sup>, Арзуканян А.В.<sup>2</sup>, Гольдман И.Л.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова, Москва, Россия;

<sup>2</sup>Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия;

<sup>3</sup>Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

### Аннотация

**Введение.** Лактоферрин (ЛФ) представляет собой катионный мономерный гликопротеин, вырабатываемый ацинарными клетками и железами. ЛФ присутствует в разных местах слизистой оболочки в различной концентрации. В связи с разработкой различных вариантов гигиенических и лекарственных средств для лечения воспалительных заболеваний полости рта на основе ЛФ возникла необходимость объективной оценки его антибактериальных и антибиоплёночных свойств с последующим анализом сохранения активности при различных вариантах выделения данного белка из субстрата и хранения.

**Цель исследования** — повышение эффективности оценки антибактериальной активности ЛФ и продолжительности её сохранения в различных биологических субстратах, содержащих действующее вещество, и отдельных опытных партиях изготовленного препарата с помощью автоматического культивирования.

**Материалы и методы.** В рамках эксперимента использовалась техника микробиологической диагностики с использованием системы автоматического культивирования микробных популяций. Заранее подготовленную бактериальную взвесь инокулировали в питательный бульон и добавляли исследуемые образцы ЛФ с последующим культивированием и анализом возможного антибактериального воздействия трансферринового белка. Для определения чувствительности выделенных штаммов применяли собственную модификацию метода серийных разведений, разработанную на кафедре микробиологии, вирусологии, иммунологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова. В работе была использована инфраструктура Уникальной научной установки «Трансгенбанк». Результаты интерпретировали по изменению оптической плотности на длине волны  $\lambda = 850$  нм. Изучение динамики роста микроорганизмов проводили в нескольких параллелях. Рост бактерий приводил к изменению параметров оптической плотности, на основании которых были построены кривые роста.

**Результаты и обсуждение.** По результатам экспериментального исследования кривых роста бактериальных популяций отмечены статистически достоверные различия количества жизнеспособных клеток в разные фазы кривых роста при использовании различных образцов ЛФ. Установлена более высокая активность образцов человеческого рекомбинантного ЛФ. При анализе динамики роста выявлены различия в наступлении максимума размножения и его ингибирования при воздействии различных отягощающих факторов в процессе культивирования. Бактериостатическое действие ЛФ реализуется посредством связывания ионов железа, лишая бактерии этого микроэлемента, вызывает ингибирование их развития. Наряду с этим ЛФ проявляет активность против некоторых факторов вирулентности микроорганизмов, расщепляя их по типу сериновых протеаз, и таким образом препятствует их проникновению в клетки человека.

**Заключение.** Использованная методика автоматического культивирования микроорганизмов в биореакторе позволяет получить воспроизводимые результаты, доступна для широкого использования и может быть рекомендована для получения объективных, сравнимых между собой, достоверных сведений о противомикробных свойствах различных образцов бактерицидного белка ЛФ, выпускаемых отечественной фарминдустрией. Исследуемый субстрат, содержащий рекомбинантный человеческий ЛФ российского производства, характеризуется высокой антибактериальной активностью, сохраняющейся, как минимум, в течение 3 лет.

**Ключевые слова:** рекомбинантный человеческий лактоферрин, биореактор, культивирование, кривая роста, фарминдустрия

**Источник финансирования.** Работа выполнялась при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках проекта «Реализация мероприятий и выполнение работ по дооснащению УНУ «Трансгенбанк», обеспечивающих деятельность, повышения уровня её доступности и роста эффективности её использования» (Соглашение № 075-15-2021-668 от 29.07.2021).

**Конфликт интересов.** В рамках проведения настоящего исследования были использованы инфраструктура уникальной научной установки «Трансгенбанк», предоставленная ФГБУН «Институт биологии гена» РАН, а также субстраты рекомбинантного лактоферрина человека, предоставленные ООО «Лактоферр».

**Для цитирования:** Царёв В.Н., Макеева И.М., Садчикова Е.Р., Подпорин М.С., Трефилова Ю.А., Арзуканян А.В., Гольдман И.Л. Методика оценки антибактериальной активности полифункционального белка трансферринового ряда при экспериментальном моделировании кинетики развития *Staphylococcus aureus*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(6):617–626.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-209>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-209>

## Method for the estimation of antibacterial activity of the polyfunctional protein from transferrin family in the experimental model of the kinetics of *Staphylococcus aureus* development

Victor N. Tsarev<sup>1</sup>✉, Irina M. Makeeva<sup>2</sup>, Elena R. Sadchikova<sup>3</sup>, Mikhail S. Podporin<sup>1</sup>, Yulia A. Trefilova<sup>1</sup>, Alina V. Arzukanyan<sup>2</sup>, Igor L. Goldman<sup>3</sup>

<sup>1</sup>A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia;

<sup>3</sup>Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

**Introduction.** Lactoferrin is a cationic monomeric glycoprotein produced by acinar cells and glands, present in different places of the mucous membrane in different concentrations. In connection with the development of various variants of hygienic and medicinal products for the treatment of inflammatory diseases of the oral cavity based on lactoferrin, there was a need for an objective assessment of its antibacterial and antibiofilms properties, followed by an analysis of the preservation of activity in various variants of the isolation of this protein from the substrate and storage.

**Aim** — to improve the effectiveness of evaluating the antibacterial activity of lactoferrin and the duration of its preservation in various biological substrates containing the active substance and individual experimental batches of the manufactured drug using automatic cultivation.

**Materials and methods.** As part of the experiment, a microbiological diagnostic technique employing a system for the automatic cultivation of microbial populations was used. A pre-prepared bacterial suspension was inoculated into the nutrient broth and the studied lactoferrin samples were added, followed by cultivation and analysis of the possible antibacterial effects of transferrin protein. To determine the sensitivity of the isolated strains, we used our own modification of the serial dilution method developed at the Department of microbiology, virology, immunology of the A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry. The experiment was based on the programmed automatic cultivation using the RTS-1 bioreactor. The interpretation of the results was carried out by changing the optical density at a wavelength of  $\lambda = 850$  nm. The study of the growth dynamics of microorganisms was carried out in several repetitions, which was reflected in the graphs of the development of bacterial populations. The assessment of the growth control of the corresponding bacterial species was reflected in the change in the optical density values, on the basis of which the curve was built.

**Results and discussion.** According to the results of an experimental study of the growth curves of bacterial populations, statistically significant differences in the number of viable cells in different phases of the growth curves were noted, when using different lactoferrin samples. Higher activity of human recombinant lactoferrin samples was established. An analysis of growth dynamics revealed differences in the onset of the maximum reproduction and its inhibition under the influence of various aggravating factors during cultivation. The bacteriostatic effect of lactoferrin is realized through the binding of iron ions, depriving the bacteria of this microelement, causing inhibition of their development. Along with this, lactoferrin is active against certain virulence factors of microorganisms, splitting them like serine proteases, and thus prevents their penetration into human cells.

**Conclusion.** The method used for automatic cultivation of microorganisms in the bioreactor used allows one to obtain reproducible results, is available for wide use, and can be recommended for obtaining objective, comparable, reliable information about the antimicrobial properties of various samples of the bactericidal protein lactoferrin produced by the domestic pharmaceutical industry. The studied substrate containing recombinant human lactoferrin of Russian production is characterized by high antibacterial activity that persists for 3 years as minimum.

**Keywords:** recombinant human lactoferrin, bioreactor, cultivation, growth curve, pharmaceutical industry

**Funding source.** The work was carried out with the financial support of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation within the framework of the project "Implementation of measures and work on the retrofitting of the UNU "Transgenbank", ensuring the activities, increasing the level of its accessibility and increasing the efficiency of its use" (Agreement No. 075-15-2021-668 of 29.07.2021).

**Conflict of interest.** Within the framework of this study, we used the information structure of the unique scientific device "Transgenbank", provided by the Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, as well as substrates of recombinant human lactoferrin, provided by LLC "Lactoferrin".

**For citation:** Tsarev V.N., Makeeva I.M., Sadchikova E.R., Podporin M.S., Trefilova Yu.A., Arzukanyan A.V., Goldman I.L. Method for the estimation of antibacterial activity of the polyfunctional protein from transferrin family in the experimental model of the kinetics of *Staphylococcus aureus* development. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(6):617–626.  
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-209>

## Введение

Факторы врождённого иммунитета — универсальный механизм защиты макроорганизма, который способен действовать независимо от природы возбудителя. Многочисленные антимикробные пептиды (АМП), которые выступают как компоненты врождённой иммунной системы, были выделены из живых организмов и имеют различные механизмы действия, которые реализуются в организме, в том числе на уровне полости рта [1]. Среди белков иммунной системы организма, способных связывать железо (семейство трансферринов), следует выделить лактоферрин (ЛФ), который представляет собой катионный мономерный гликопротеин. Этот белок, вырабатываемый ацинарными клетками и железами, присутствует в разных местах слизистой оболочки в различной концентрации [2, 3]. Например, молозиво содержит 100 мкм ЛФ, слезы — 25 мкм, тогда как слюна, спинномозговая жидкость и сыворотка — менее 0,11 мкм. Кроме того, ЛФ высвобождается вторичными гранулами нейтрофилов, присутствующими в очагах воспаления. Его функция на этих участках заключается в секвестрации железа — важнейшего элемента для роста и распространения патогенных микроорганизмов [4].

Благодаря своей структуре и способности конкурентно связывать железо, ЛФ оказывает два важных воздействия на бактерии: бактериостатическое и бактерицидное. Выделяя железо из окружающей среды, т.е. действуя как хелатор, он проявляет выраженный бактериостатический противомикробный эффект [5]. Бактерицидный эффект главным образом связан с его катионным зарядом, который также сохраняется в пептидах, являющихся производными ЛФ (лактоферрицины). Катионный заряд позволяет ЛФ взаимодействовать с отрицательно заряженной клеточной мембраной, в частности, с липополисахаридами в грамотрицательных бактериях или липотейхоевыми кислотами в грамположительных бактериях, что приводит к дестабилизации мембраны и потере селективной проницаемости, вызывая бактериальный лизис [6].

Как известно, микробная биоплёнка зубов и слизистой оболочки рта представляет собой сложный многовидовой консорциум, который взаимо-

действует с факторами местного иммунитета и играет важную роль при развитии патологии пародонта и системных осложнений [7–9]. Учитывая, что микробные биоплёнки обладают высокой устойчивостью к чистке зубов, профессиональным гигиеническим процедурам, применению антисептиков и антибиотиков, безусловно, необходимы новые стратегии как оценки процессов адгезии и колонизации микробиоты на поверхности слизистой оболочки полости рта, коронок и протезов с учётом видового разнообразия [9–12], так и поиска новых терапевтических средств, в качестве которых могут рассматриваться АМП, в частности ЛФ [4, 6].

Немаловажной является способность ЛФ ингибировать развитие антибиотикоустойчивых форм патогенной микрофлоры. Отличительным преимуществом является тот факт, что, в отличие от химиотерапевтических препаратов, к ЛФ не отмечено формирования резистентности у культуры. Более того, при совместном использовании с антибактериальными препаратами данный белок в несколько раз усиливает и пролонгирует эффект их действия [4]. Установлено, что ЛФ способен к дозозависимому пролонгированию фаз роста бактериальных популяций и разрушению микробных биоплёнок или создаёт условия, препятствующие их формированию. В настоящее время охарактеризовано более 2000 АМП, происходящих из природных источников, что подчёркивает важность расширения исследований в данном направлении [6].

В связи с предшествующей разработкой различных вариантов гигиенических и лекарственных средств на основе ЛФ появилась необходимость объективной оценки его антибактериальных свойств с последующим анализом сохранения активности при различных вариантах выделения данного белка из субстрата и хранения.

**Цель исследования** — повышение эффективности оценки антибактериальной активности ЛФ и продолжительности её сохранения в различных биологических субстратах, содержащих действующее вещество, и отдельных опытных партиях изготовленного препарата с помощью автоматического культивирования.

## Материалы и методы

Экспериментальная методика оценки антибактериальной активности исследуемых образцов заключалась в применении автоматической компьютерной системы одновременного культивирования микробных популяций с разными исследуемыми субстратами «RTS-1» («BioSan»). В ней реализована инновационная технология культивирования микроорганизмов за счёт реверсивного вращения пробирки, в основе которой лежит новый способ вихревого перемешивания питательной среды с последующей регистрацией данных процесса клеточного развития в разных пробах в виде кривых роста, проходящих классические фазы: лаг-фазу, фазы экспоненциального (геометрического) роста, стационарную и отмирания [6].

Для процесса культивирования микроорганизмов в биореакторе использовали тип пробирок TubeSpin<sup>®</sup>, SW объёмом 50 мл с мембранным фильтром для регулирования газообмена, а также жидкую питательную среду («Himedia Laboratories Pvt. Limited»).

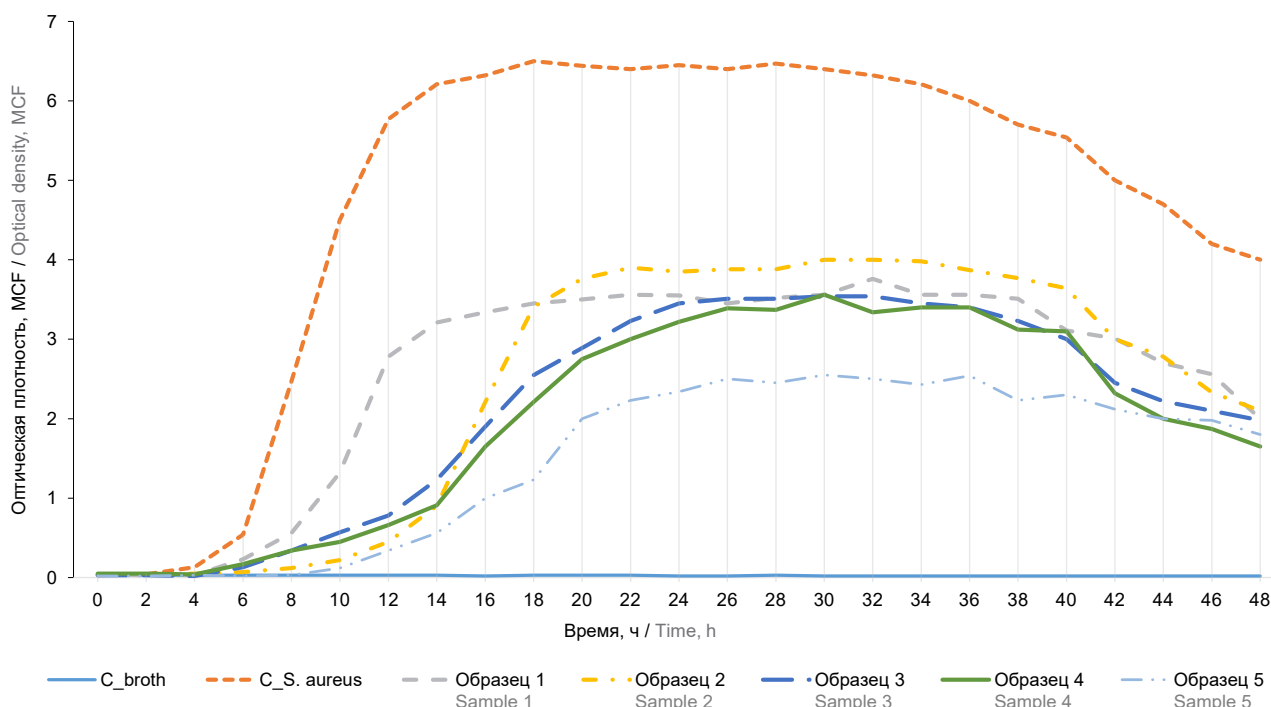
Экспериментальное исследование было выполнено на модели культивирования референтного штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 25993. Перед проведением эксперимента использовали среду обогащения с целью подрачивания культур для приготовления бактериальной взвеси в общем количестве 10 мл. Оптическую плотность (ОП) полу-

ченной взвеси измеряли с помощью денситометра «DEN-1B» («BioSan») по стандарту МакФарланда (в McF). Использовали субстраты, предоставленные российским производителем рекомбинантного ЛФ человека (РЛЧ) компании ООО «Лактоферр». В исследовании и производстве образцов использована уникальная научная установка «Трансгенбанк» на базе ФГБУН «Институт биологии гена» РАН.

Исследуемые образцы содержали РЛЧ, лиофильно высушенные в форме хлопьев:

- образец 1 — суммарный наработанный РЛЧ, 3 года хранения (−32°C);
- образец 2 — РЛЧ, выделенный из замороженного молока (−18–20°C);
- образец 3 — РЛЧ, выделенный из свежего молока;
- образец 4 — РЛЧ, выделенный из свежего молока, с мальтодекстрином;
- образец 5 — наработанный РЛЧ, 1 год хранения (−32°C).

Для проведения экспериментов исследуемые образцы разводили в 10 мл питательной среды, которая в дальнейшем использовалась для культивирования микроорганизмов. Относительная концентрация ЛФ в изготовленных партиях составляла 100 мг/мл. В питательный бульон добавляли бактериальную взвесь в концентрации  $1,5 \times 10^8$  КОЕ и получали рабочую концентрацию  $1,5 \times 10^7$  КОЕ/мл.



**Рис. 1.** Автоматическое культивирование *S. aureus* ATCC 25993.

Общий вид фаз развития бактериальной популяции в течение 48 ч.

**Fig. 1.** Automatic cultivation of *S. aureus* ATCC 25993.

General view of the phases of development of the bacterial population within 48 hours.

Настройки и программа культивирования микробных популяций были индивидуальными для каждого образца. Время культивирования — 48 ч, процесс культивирования — полупериодический.

Статистическую обработку результатов проводили с вычислением средних величин и достоверности различий  $p$  по критерию Манна–Уитни с применением компьютерной программы «Biostat 9,0». За достоверную разницу принимали значения  $p < 0,05$ .

## Результаты

Исследование динамики роста микроорганизмов проводили в 6 параллелях, что отражалось на графиках кривых роста бактериальных популяций каждого вида в присутствии различных образцов. Оценка контроля роста тесто-штамма бактерий отражалась в изменении параметров ОП, на основании которых была построена кривая роста микробной популяции.

На кривой роста выделяют несколько участков (фаз развития), каждый из которых характеризуется индивидуальными условиями существования культуры. В различных фазах имеется периодовое дробление, в каждой из них клеткам присущи свои скорость размножения, размеры, биохимическая активность. Все основные фазы роста микроорганизмов были индивидуальны для каждого вида образцов.

По результатам культивирования референтного штамма *S. aureus* ATCC 25993 в контрольных пробах (рис. 1) выявлено, что адаптивная фаза

продолжалась до 4-го часа эксперимента. На промежутке 3–4 ч отмечалось небольшое начальное изменение ОП, связанное с периодом первичного роста популяции. Интервал с 4-го по 14-й час (продолжительность 10 ч) — фаза экспоненциального развития, на протяжении которого отмечались следующие периоды развития: период ускоренной генерации (4–6 ч); период логарифмического развития (6–12 ч); период отрицательного ускорения (12–14 ч). В логарифмическом периоде развития преобладала относительно высокая скорость генерации новых популяций, и максимальный показатель ОП в окончании данного отрезка составил  $5,77 \pm 0,3$  МсФ. В результате снижения скорости деления клеток (период отрицательного ускорения) кривая изменения ОП приближалась к линейному вектору развития, и к 16-му часу культивирования была достигнута М-концентрация (показатель ОП —  $6,32 \pm 0,3$  МсФ). Стационарная фаза отмечалась продолжительностью на промежутке 16–32 ч. Прироста бактериальных клеток и, следовательно, изменения ОП не отмечалось. Средний показатель ОП —  $6,41 \pm 0,3$  МсФ. С 32-го часа эксперимента отмечается фаза гибели микробной популяции, по тенденции логарифмического спада.

В отрицательном контроле стерильности (C\_broth) роста тест-штамма *S. aureus* ATCC 25993 не наблюдалось.

Для разных исследуемых образцов получены определённые особенности, которые отражены на графиках кривых роста (рис. 1 и 2), а также скорости прироста бактериальных популяций (рис. 3).

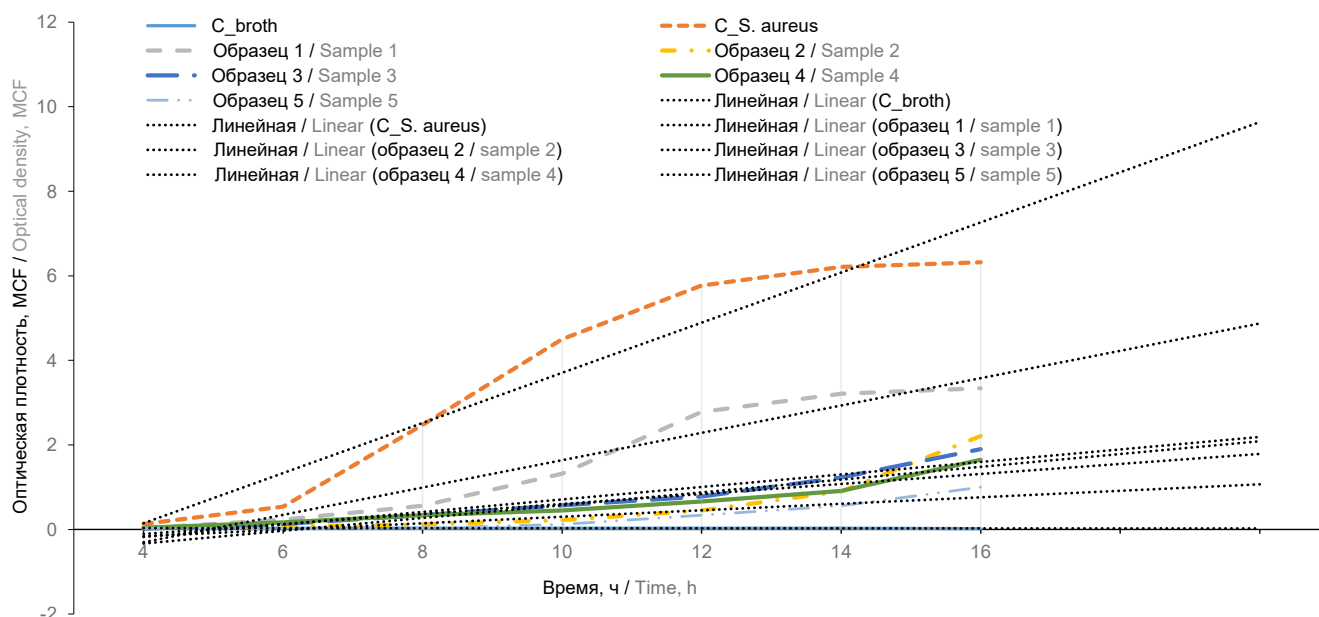
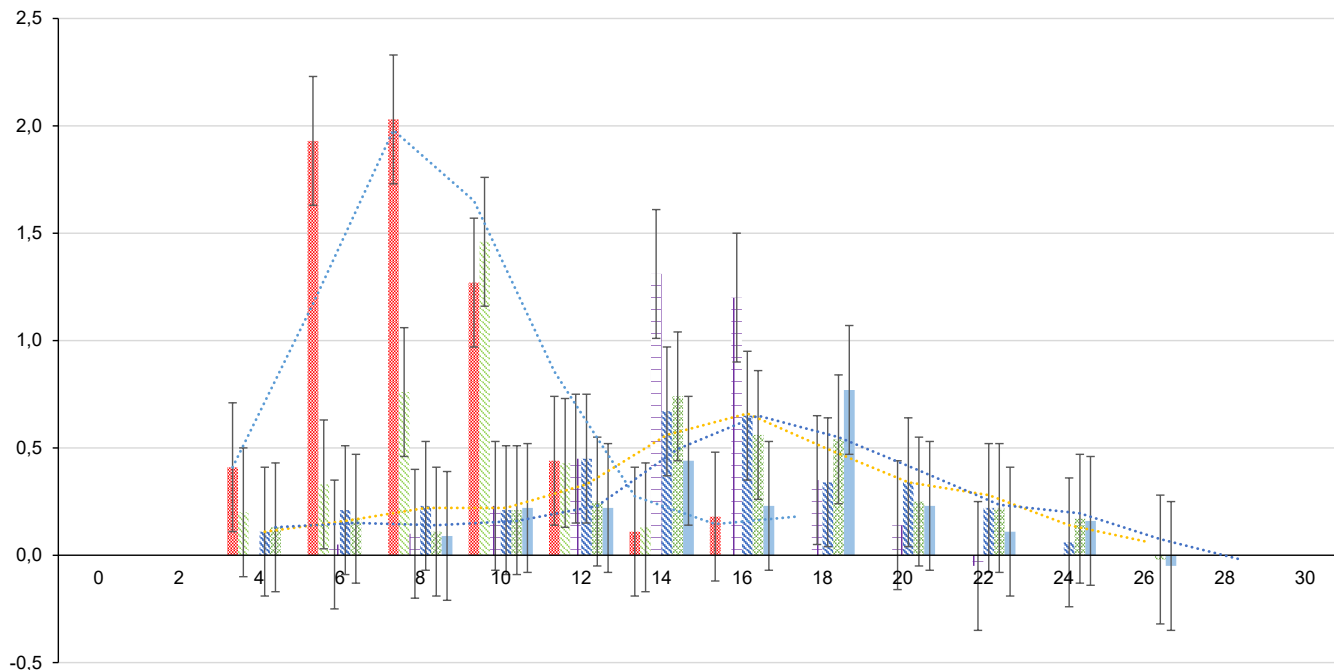


Рис. 2. Автоматическое культивирование *S. aureus* ATCC 25993.

Лог-фаза и переход в экспоненциальное развитие.

Fig. 2. Automatic cultivation of *S. aureus* ATCC 25993.

Lag phase and transition to exponential development.



**Рис. 3.** Скорость бактериального прироста *S. aureus* ATCC 25993.

**Fig. 3.** The rate of bacterial growth of *S. aureus* ATCC 25993.

Основные статистически достоверные различия для разных образцов представлены в **таблице**.

При культивировании бактериальной популяции с добавлением **образца 1** изменений продолжительности адаптивной фазы не отмечалось. Экспоненциальное развитие было аналогично по протяженности (4–14 ч), однако, по сравнению с контрольным образцом, отмечалась пролонгация периода ускоренного развития до 8 ч. Характер развития логарифмической кривой был близок к контрольному образцу, но пиковый показатель в апогее данного периода был значительно ниже —  $2,78 \pm 0,3$  McF (12 ч). Период отрицательного ускорения отмечался постепенным снижением скорости генерации, что привело к достижению M-концентрации (показатель ОП —  $3,51 \pm 0,3$  McF, 15 ч). Стационарная фаза отмечалась небольшим удлинением до 34-го часа культивирования без достоверного прироста биомассы. Средний показатель ОП в стационарном равновесии —  $3,52 \pm 0,3$  McF, что на 45% ниже, чем в контрольном образце. Фаза отмирания проходила аналогично контрольному образцу.

При культивировании бактериальной популяции с добавлением **образца 2** отмечалась достоверная пролонгация фазы адаптации с первыми признаками бактериального роста только к 8-му часу культивирования. Фаза экспоненциального развития характеризована отличительным от предыдущих образцов длительным ускоренным развитием (8–14 ч), что повлияло на последующее смещение времени начала истинного логарифмического роста (рис. 3). Логарифмический скачок был сопо-

ставим по тенденции с предыдущими образцами, хотя пиковый показатель ОП (при достижении M-концентрации) немного превосходил предыдущие значения —  $3,9 \pm 0,3$  McF (22 ч). Нахождение культуры в стационарном равновесии было укорочено по сравнению с предыдущим образцом на 5 ч. Средний показатель ОП в стационарной фазе —  $3,94 \pm 0,3$  McF, что на 38% ниже, чем в контрольной пробирке.

По результатам культивирования бактериальной популяции с добавлением **образца 3** не отмечено задержки продолжительности адаптивной фазы, но период ускоренного развития клеток был увеличен относительно всех предыдущих образцов (продолжительность 8 ч).

Логарифмический период отличался существенно сниженной скоростью бактериальной генерации ( $\approx 0,38 \pm 0,3^{h+2}$  McF), что повлияло на более плавное увеличение биомассы, а следовательно, и показатель ОП исследуемого образца. Просматривающейся границы перехода лог-периода в период отрицательного ускорения не наблюдалось. Экспоненциальная фаза данного образца отличалась максимальной продолжительностью относительно предыдущих образцов с пиковым показателем ОП максимальной биомассы к 24-му часу эксперимента ( $3,48 \pm 0,3$  McF). Стационарная фаза отмечалась непродолжительностью, без признаков прироста биомассы. Средний показатель ОП в стационарном равновесии —  $3,51 \pm 0,3$  McF. Фаза отмирания проходила аналогично контрольному образцу.

Сводные показатели образцов 1–5 по пиковым точкам развития  
Summary indicators of samples 1–5 at the peak points of development

Фаза Phase	Период Period	Образец 1 Sample 1		Образец 2 Sample 2		Образец 3 Sample 3		Образец 4 Sample 4		Образец 5 Sample 5	
		ч / h	McF	ч / h	McF	ч / h	McF	ч / h	McF	ч / h	McF
Адаптивная / Adaptive		0*	0,04	0*	0,04	0*	0,03	0*	0,05	0*	0,02
Экспоненциальная / Exponential	Начало Beginning	4*	0,03	8*	0,12	4*	0,02	4*	0,04	8*	0,03
Экспоненциальная / Exponential	P_1	8**	0,56	14**	0,9	12**	0,78	14**	0,66	14**	0,56
Экспоненциальная / Exponential	P_2	12**	2,78	18**	3,41	18**	2,55	20**	2,21	20**	2,00
Экспоненциальная / Exponential	P_3	15**	3,51	22**	3,9	24**	3,48	26**	3,39	26**	2,54
Стационарная / Stationary		15*	3,51	22*	3,9	24*	3,48	26*	3,39	26*	2,54
Средняя концентрация микробной взвеси по ОП стационарной фазы Average concentration of microbial suspension by optical density at the stationary phase		3,52 ± 0,3*		3,94 ± 0,3		3,51 ± 0,3*		3,41 ± 0,3#		2,49 ± 0,3#	

**Примечание.** \* — время начала фазы/периода кривой роста, ч; \*\* — время окончания фазы/периода кривой роста, ч; \* — достоверное снижение кривой роста в стационарной фазе по сравнению с образцом 2; # — максимальное достоверное снижение кривой роста в стационарной фазе ( $p < 0,05$ ).

**Note.** \* — time of the beginning of the phase/period of the growth curve, h; \*\* — time of the end of the phase/period of the growth curve, h; \* — significant decrease in the growth curve in the stationary phase in comparison with sample 2; # — the maximum significant decrease in the growth curve at the stationary phase ( $p < 0.05$ ).

По результатам культивирования бактериальной популяции с добавлением **образца 4** установлено, что адаптивная фаза аналогична контрольному образцу. В экспоненциальной фазе период ускоренного развития популяции был пролонгирован до 14-го часа эксперимента (на 2 ч дольше, чем в предыдущем образце). Дальнейшее развитие клеток не отличалось от тенденции кривой образца 3. Прослеживались более чёткое снижение скорости генерации новых популяций (с 20-го часа) и более длительный период отрицательного ускорения. Показатель ОП при достижении биомассой М-концентрации —  $3,39 \pm 0,3$  McF (26 ч). Стационарная фаза имела небольшое недостоверное изменение ОП, без прироста биомассы, со средним показателем ОП  $3,41 \pm 0,3$  McF, что статистически не отличалось от предыдущего образца.

При культивировании бактериальной популяции с добавлением **образца 5** отмечалась задержка наступления экспоненциальной фазы развития за счёт удлинения адаптивной фазы до 8 ч. На промежутке 8–14 ч отмечался период ускоренного развития клеток. Истинное логарифмическое развитие популяции имело двуступенчатую тенденцию увеличения биомассы (диауксийный тип развития). Лог-период\_1 — 14–16 ч, лог-период\_2 — 18–20 ч. На промежутке 16–18 ч отмечалось резкое падение скорости генерации новых популяций. Максимальный показатель ОП в завершение второго периода логарифмического развития —  $2,02 \pm 0,3$  McF (20 ч). Период отрицательного ускорения с последующим добором биомассы культуры был самым продолжительным из всех образцов (7 ч). Переход в стационарное равновесие отмечен на промежутке 25–27 ч

с показателем ОП при достижении М-концентрации  $2,54 \pm 0,3$  McF. Средний показатель ОП в стационарной фазе —  $2,49 \pm 0,3$  McF, что на 61% ниже, чем в контрольном образце.

Все образцы проявляли антибактериальную активность по отношению к тест-штамму *S. aureus* ATCC 25993, однако при анализе активности ЛФ, содержащегося в разных субстратах (свежее молоко, замороженное молоко, молоко с добавкой мальтодекстрина), и сохранения активности в зависимости от срока хранения (3 года, 1 год) выявлен ряд важных различий с точки зрения перспектив производства препарата (таблица).

Установлено, что первые существенные различия наблюдались уже в первом периоде экспоненциальной фазы (P\_1), когда плотность микробной взвеси (0,12 McF) в образце 2 (замороженное молоко) была в 6 раз выше, чем в той же партии свежего молока в образце 3 (0,02 McF). Аналогичные показатели, свидетельствующие о высокой антибактериальной активности, отмечены для образцов 1, 4 и 5, в которых плотность микробной взвеси составляла 0,03–0,04. Указанная тенденция отмечена нами и в последующие периоды роста бактериальных популяций.

Самые выраженные отличия наблюдались в стационарной фазе роста. Средний показатель, отражающий концентрацию микробных клеток, в образце с замороженным молоком ( $3,94 \pm 0,3$  McF) был самым высоким и статистически достоверно ( $p < 0,05$ ) отличался от показателя со свежим молоком той же партии ( $3,51 \pm 0,3$  McF). Следовательно, можно констатировать, что при замораживании молока активность ЛФ не исчезает, но достоверно снижается.

В то же время установлено, что использование мальтодекстрина (образец 4) в качестве стабилизатора молока достоверно ( $p < 0,05$ ) снижает плотность микробной взвеси (до  $3,41 \pm 0,3$  МсФ) по сравнению не только с замороженным молоком, но и со свежим продуктом той же партии. Очевидно, это объясняется сохранением активности ЛФ в присутствии данного стабилизатора.

При оценке сроков хранения ЛФ в морозильной камере при  $32^{\circ}\text{C}$  оказалось, что за 1–3 года антибактериальная активность препарата снижается незначительно. Так, если максимальная активность отмечена у образца с продолжительностью хранения 1 год (минимальная ОП микробной культуры  $2,49 \pm 0,3$  МсФ), то при хранении в течение 2 лет она была несколько ниже ( $3,52 \pm 0,3$  МсФ), однако статистически достоверно не отличалась, например, от ЛФ свежего молока.

### Обсуждение

По мере появления устойчивых к множеству лекарств бактерий, особенно «супербактерий», АМП все чаще признаются в качестве многообещающей терапевтической альтернативы обычным антибиотикам. Антибактериальные пептиды имеют много преимуществ по сравнению с антибиотиками: широкий антибактериальный спектр, хорошую стабильность, минимальные побочные эффекты и низкую лекарственную устойчивость [1, 2].

Полученные нами результаты позволяют утверждать, что разработанный отечественный РЛЧ обладает достаточно высокой стабильностью, он успешно показал свою антибактериальную активность в отношении тест-штамма стафилококка через 1 и 2 года хранения препарата в обычных условиях при комнатной температуре. В наших предыдущих исследованиях была показана антибактериальная активность в отношении микроаэрофильных стрептококков, дрожжевых грибов и анаэробных бактерий, однако без учёта сроков хранения [6].

Как продемонстрировали результаты наших исследований, РЛЧ оказывает весьма выраженное бактериостатическое действие, вызывая отставание в начале большинства фаз роста микробной популяции и существенно снижая плотность (концентрацию) жизнеспособной микробной взвеси и скорость прироста популяции. Основным механизмом действия РЛЧ объясняется связыванием с консервативными структурными компонентами бактериальной оболочки (например, с липополисахаридом и липотейхоевой кислотой грамотрицательных и грамположительных бактерий соответственно), а также непосредственно с мембраной бактериальных клеток, что губительно для бактерий. В некоторых исследованиях ЛФ также связывался с внутриклеточными мишенями и ингибировал важные биологические процессы, включая образова-

ние клеточной стенки и синтез ДНК, РНК и белков [13, 14].

В то же время пародонтопатогенные бактерии обладают персистентным потенциалом — способностью длительное время существовать в организме хозяина, в том числе за счёт инактивации ряда факторов врождённого иммунитета, что, в частности, определяет видовой состав микробной биоплёнки пародонта. В свою очередь многие пародонтопатогенные бактерии, в частности, ведущие возбудители — *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* для обеспечения своих метаболических потребностей нуждаются в ионах железа, которые конкурентно связываются гликопротеинами трансферринового ряда, что отрицательно сказывается на популяции патогенов и всей структуре микробной биоплёнки пародонта [9, 11, 12, 15].

Рассматривая ЛФ в качестве фактора эффекторной защиты макроорганизма, следует признать, что этот железосвязывающий гликопротеин из семейства трансферринов распространён в организме достаточно широко. Ключевое биологическое назначение ЛФ — поддержание гомеостаза макроорганизма, что особенно существенно при инфекции, за счёт участия ЛФ в обмене железа, регуляции гемопоеза, прямого и опосредованного антимикробного действия и других функций [3, 16].

Антимикробный спектр ЛФ широк и охватывает бактерии, грибы, простейшие, вирусы. Патогены многообразны и включаются в 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.

### Заключение

Предложена методика автоматического программируемого культивирования для сравнительной оценки антимикробной активности ЛФ разного происхождения и в зависимости от срока годности. При добавлении образцов ЛФ выявлены различия в развитии бактериальных популяций *S. aureus*. В целом можно констатировать, что почти все образцы обладают бактериостатическим действием разной степени выраженности.

Установлена активность белка в отношении разных фаз роста бактериальной популяции (в течение различных периодов эксперимента). Все образцы показали статистически достоверное различие при достижении М-концентрации, тем самым существенно снижая генеративную активность исследуемого штамма.

Активность образцов экспериментальной партии РЛЧ сохраняется в течение 1 года и очень незна-



чительно снижается через 3 года хранения в морозильной камере при 32°C. Автоматическое культивирование с подтверждающим бактериологическим контролем позволяет оценить возможную антимицробную активность различных видов ЛФ, включая воздействие в отношении антибиотикоустойчивых форм патогенных микроорганизмов.

#### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Олсуфьева А.В., Васянина К.А., Зоткин Д.А., Ключева Л.А., Олсуфьев С.С., Чиж Р.С. и др. Роль органов полости рта в реализации местного иммунитета с элементами морфологии язычных желёз. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2021; 172(8): 186–92. <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2021-172-8-186-192>
2. Кузнецов И.А., Потиевская В.И., Качанов И.В. Изучение железосодержащих белков (лактоферрин, ферритин) при физиологических состояниях и в лабораторной диагностике заболеваний. В кн.: Гуляев Г.Ю. *Инновационное развитие: потенциал науки и современного образования*. Пенза: Наука и просвещение; 2017: 156–65.
3. Кузнецов И.А., Потиевская В.И., Качанов И.В., Куралева О.О. Роль лактоферрина в биологических средах человека. *Современные проблемы науки и образования*. 2017; (3): 69.
4. Goldman I.L., Georgieva S.G., Gurskiy Y.G., Krasnov A.N., Deykin A.V., Popov A.N., et al. Production of human lactoferrin in animal milk. *Biochem. Cell. Biol.* 2012; 90(3): 513–9. <https://doi.org/10.1139/o11-088>
5. Akiyama Y., Oshima K., Kuhara T., Shin K., Abe F., Iwatsuki K., et al. A lactoferrin-receptor, intelectin 1, affects uptake, sub-cellular localization and release of immunochemically detectable lactoferrin by intestinal epithelial Caco-2 cells. *J. Biochem.* 2013; 154(5): 437–48. <https://doi.org/10.1093/jb/mvt073>
6. Царев В.Н., Гольдман И.Л., Садчикова Е.Р., Ипполитов Е.В., Подпорин М.С. Оценка влияния рекомбинантного лактоферрина человека на характеристики кривых роста бактериальных популяций патогенов. *Национальные приоритеты России*. 2016; (4): 130–3.
7. Gendreau L., Loewy Z.G. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J. Prosthodont.* 2011; 20(4): 251–60. <https://doi.org/10.1111/j.1532-849x.2011.00698.x>
8. Gleiznys A., Zdanavičienė E., Žilinskas J. *Candida albicans* importance to denture wearers. A literature review. *Stomatologija*. 2015; 17(2): 54–66.
9. Балмасова И.П., Царев В.Н., Янушевич О.О., Маев И.В., Мкртумян А.М., Арутюнов С.Д. *Микроэкология пародонта. Взаимосвязь локальных и системных эффектов*. М.: Практическая медицина; 2021.
10. Шлепотина Н.М., Пешикова М.В., Колесников О.Л., Шишкова Ю.С. Современные представления о механизмах взаимодействия биопленки и факторов клеточного иммунитета. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(1): 83–90. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-1-83-90>
11. Ипполитов Е.В., Диденко Л.В., Царёв В.Н. Особенности морфологии биоплёнки пародонта при воспалительных заболеваниях дёсен (хронический катаральный гингивит, хронический пародонтит, кандидоз-ассоциированный пародонтит) по данным электронной микроскопии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(12): 59–64.
12. Царев В.Н., Николаева Е.Н., Ипполитов Е.В. Пародонтопатогенные бактерии — основной фактор возникновения и развития пародонтита. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017; 94(5): 101–12. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-5-101-112>
13. Sharma S., Sinha M., Kaushik S., Kaur P., Singh T.P. C-lobe of lactoferrin: the whole story of the half-molecule. *Biochem. Res. Int.* 2013; 2013: 271641. <https://doi.org/10.1155/2013/271641>
14. Cornish J., Naot D. Lactoferrin as an effector molecule in the skeleton. *Biometals*. 2010; 23(3): 425–30. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9320-6>
15. Агарков Н.М., Ткаченко П.В., Замулин Д.О., Аксёнов В.В., Гонtareва И.С., Кича Д.И. и др. Прогнозирование развития периапикального абсцесса при хроническом периодонтите у детей по параметрам крови и клеточного иммунитета. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(1): 31–4. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-1-31-34>
16. Бухарин О.В., Вальшев А.В., Вальшева И.В. Роль лактоферрина в противоинойфекционной защите. *Успехи современной биологии*. 2011; 131(2): 135–44.

#### REFERENCES

1. Olsuf'eva A.V., Vasyanina K.A., Zotkin D.A., Klyueva L.A., Olsuf'ev S.S., Chizh R.S., et al. The role of oral organs in the implementation of local immunity with elements of the morphology of the lingual glands. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2021; 172(8): 186–92. <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2021-172-8-186-192> (in Russian)
2. Kuznetsov I.A., Potievskaya V.I., Kachanov I.V. The study of iron-containing proteins (lactoferrin, ferritin) in physiological conditions and in the laboratory diagnosis of diseases. In: Gulyaev G.Yu. *Innovative Development: The Potential of Science and Modern Education [Innovatsionnoe razvitiye: potentsial nauki i sovremennoogo obrazovaniya]*. Penza: Nauka i Prosveshchenie; 2017: 156–65. (in Russian)
3. Kuznetsov I.A., Potievskaya V.I., Kachanov I.V., Kuraleva O.O. The role of lactoferrin in human biological environments. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*. 2017; (3): 69. (in Russian)
4. Goldman I.L., Georgieva S.G., Gurskiy Y.G., Krasnov A.N., Deykin A.V., Popov A.N., et al. Production of human lactoferrin in animal milk. *Biochem. Cell. Biol.* 2012; 90(3): 513–9. <https://doi.org/10.1139/o11-088>
5. Akiyama Y., Oshima K., Kuhara T., Shin K., Abe F., Iwatsuki K., et al. A lactoferrin-receptor, intelectin 1, affects uptake, sub-cellular localization and release of immunochemically detectable lactoferrin by intestinal epithelial Caco-2 cells. *J. Biochem.* 2013; 154(5): 437–48. <https://doi.org/10.1093/jb/mvt073>
6. Tsarev V.N., Gol'dman I.L., Sadchikova E.R., Ippolitov E.V., Podporin M.S. Assessing the impact of recombinant human lactoferrin on the characteristics of the growth curves of bacterial pathogens populations. *Natsional'nye prioritety Rossii*. 2016; (4): 130–3. (in Russian)
7. Gendreau L., Loewy Z.G. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J. Prosthodont.* 2011; 20(4): 251–60. <https://doi.org/10.1111/j.1532-849x.2011.00698.x>
8. Gleiznys A., Zdanavičienė E., Žilinskas J. *Candida albicans* importance to denture wearers. A literature review. *Stomatologija*. 2015; 17(2): 54–66.
9. Balmasova I.P., Tsarev V.N., Yanushevich O.O., Maev I.V., Mkrtyunyan A.M., Arutyunov S.D. *Microecology of Periodontal Disease. The Relationship of Local and Systemic Effects [Mikroekologiya parodonta. Vzaïmosvyaz' lokal'nykh i sistemnykh effektov]*. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2021. (in Russian)
10. Shlepotina N.M., Peshikova M.V., Kolesnikov O.L., Shishkova Yu.S. Modern ideas about the mechanisms of interaction of biofilm and cellular immunity factors. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(1): 83–90. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-1-83-90> (in Russian)

11. Ippolitov E.V., Didenko L.V., Tsarev V.N. Morphology features of periodontal biofilm in inflammatory gum diseases (chronic catarrhal gingivitis, chronic periodontitis, candida-associated periodontitis) according to electron microscopy. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 60(12): 59–64. (in Russian)
12. Tsarev V.N., Nikolaeva E.N., Ippolitov E.V. Periodontopathogenic bacteria of the main factors of emergence and development of periodontitis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2017; 94(5): 101–12. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-5-101-112> (in Russian)
13. Sharma S., Sinha M., Kaushik S., Kaur P., Singh T.P. C-lobe of lactoferrin: the whole story of the half-molecule. *Biochem. Res. Int*. 2013; 2013: 271641. <https://doi.org/10.1155/2013/271641>
14. Cornish J., Naot D. Lactoferrin as an effector molecule in the skeleton. *Biometals*. 2010; 23(3): 425–30. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9320-6>
15. Agarkov N.M., Tkachenko P.V., Zamulin D.O., Aksenov V.V., Gontareva I.S., Kicha D.I. The prognostication of development of peri-apical abscess under chronic periodontitis by blood parameters and cell immunity in children. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018; 63(1): 31–4. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-1-31-34> (in Russian)
16. Bukharin O.V., Valyshev A.V., Valysheva I.V. The role of lactoferrin in anti-infective defense. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2011; 131(2): 135–44. (in Russian)

### Информация об авторах

**Царев Виктор Николаевич** — д.м.н., профессор, директор Научно-исследовательского медико-стоматологического института при МГМСУ им. А.И. Евдокимова, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия, [nikola777@rambler.ru](mailto:nikola777@rambler.ru), <https://orcid.org/0000-0002-3311-0367>

**Макеева Ирина Михайловна** — д.м.н., профессор, директор Института стоматологии, зав. кафедрой терапевтической стоматологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7878-0452>

**Садчикова Елена Рубеновна** — к.х.н., зам. директора Института биологии гена РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2039-7108>

**Подпорин Михаил Сергеевич** — к.м.н., н.с. лаб. молекулярно-биологических исследований Научно-исследовательского медико-стоматологического института при МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6785-0016>

**Трефилова Юлия Александровна** — старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0443-4071>

**Арзуканян Алина Владимировна** — аспирант кафедры терапевтической стоматологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5087-6647>

**Гольдман Игорь Львович** — к.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник Института биологии гена РАН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1534-3367>

**Участие авторов.** Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 01.04.2021;  
принята к публикации 26.08.2021;  
опубликована 25.12.2021

### Information about the authors

**Victor N. Tsarev** — D. Sci. (Med.), Professor, Director, Scientific Research Institute of Medicine and Dentistry, Head, Department of microbiology, virology, immunology, A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia, [nikola777@rambler.ru](mailto:nikola777@rambler.ru), <https://orcid.org/0000-0002-3311-0367>

**Irina M. Makeeva** — D. Sci. (Med.), Professor, Director, Institute of Dentistry, Head, Department of therapeutic dentistry, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7878-0452>

**Elena R. Sadchikova** — Cand. Sci. (Chem.), Deputy director, Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2039-7108>

**Mikhail S. Podporin** — Cand. Sci. (Med.), researcher, Laboratory of molecular biological investigation, Scientific Research Institute of Medicine and Dentistry, A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6785-0016>

**Yulia A. Trefilova** — senior lecturer, Department of microbiology, virology, immunology, A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0443-4071>

**Alina V. Arzukanyan** — postgraduate student, Department of therapeutic dentistry, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5087-6647>

**Igor L. Goldman** — Cand. Sci. (Med.), Professor, leading researcher, Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1534-3367>

**Author contribution.** All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 01.04.2021;  
accepted for publication 26.08.2021;  
published 25.12.2021