

АКТИВНОСТЬ ЛАКТОФЕРРИНА РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ОТНОШЕНИИ ГРАМПЛОЖИТЕЛЬНЫХ КОККОВ И *CANDIDA ALBICANS*

Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей — филиал Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования

Цель. Изучение влияния лактоферрина (ЛФ) коровы и человека на штаммы *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus*, *Candida albicans*. **Материалы и методы.** Суточные агаровые культуры музейных и клинических штаммов микроорганизмов стандартизировали, развели физиологическим раствором до 5000 микробных клеток/мл, вносили по 0.1 мл в ступенчатое разведение ЛФ (от 1000 мкг/мл), инкубировали 18 — 24 часов при 37°C. Количество ЛФ в образце с полной видимой задержкой роста микробов являлось минимальной ингибирующей концентрацией (МИК) для штамма. **Результаты.** МИК ЛФ человека была в 4 — 8 раз меньше, чем ЛФ коровы. Самые малые дозы требовались для подавления *C. albicans* ($11,3 \pm 1,5$ и $43,8 \pm 9,5$ мкг/мл соответственно), самые большие при использовании человеческого ЛФ необходимы для подавления *S. aureus* ($38,2 \pm 4,6$), а коровьего — *E. faecalis* ($206,3 \pm 51,1$). **Заключение.** ЛФ человека значительно эффективнее в подавлении бактериальной инфекции, однако в процессе эволюции наблюдается рост резистентности штаммов *S. aureus* к ЛФ. Учитывая большую доступность коровьего ЛФ и отсутствие тенденции к повышению резистентности, целесообразно использовать коровий ЛФ в высоких дозах при лечении инфекций, вызванных резистентными формами бактерий и *C. albicans*.

Журн. микробиол., 2018, № 2, С. 54—58

Ключевые слова: лактоферрин, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, лекарственная устойчивость, минимальная ингибирующая концентрация

V.N.Zorina, O.N.Vorobeva, N.A.Zorin

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE HUMAN AND BOVINE LACTOFERRIN AGAINST GRAM-POSITIVE BACTERIA AND *CANDIDA ALBICANS*

Novokuznetsk State Institute for Further Training of Physicians — Branch of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Russia

Aim. A comparative study of the effect of bovine and human lactoferrin (LF) on *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* strains. **Materials and methods.** The daily agar cultures of museum and clinical strains of microorganisms were standardized, diluted with physiological solution up (from 5000 microbial cells/ ml to 0.1 ml) was added to the stepwise dilution of LF (from 1000 μg /ml) and incubated 18 — 24 hours at 37°C. The amount of LF in the sample with the total apparent growth retardation of the microbes was the minimum inhibitory concentration (MIC) for the strain. **Results.** The MIC of human LF was 4 — 8 times less than MIC of bovine LF. The smallest dose was required for the suppression of *C. albicans* (11.3 ± 1.5 and 43.8 ± 9.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectively), the largest when using human LF was needed to suppress *S. aureus* ($38,2 \pm 4,6$), and in a case of bovine LF — *E. faecalis* ($206,3 \pm 51,1$). **Conclusion.** Human LF is much more effective in suppressing bacterial infection, but in the course of evolution, there is an increase in the resistance of *S. aureus* to LF. The higher availability of bovine LF and the lack of a tendency to increase resistance, it is advisable to use high-doses of bovine LF in the treatment of resistant forms of bacteria and *C. albicans*.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 2, P. 54—58

Key words: lactoferrin, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, drug resistance, minimal inhibitory concentration

ВВЕДЕНИЕ

Лактоферрин (ЛФ) является важнейшим компонентом мукозального иммунитета, осуществляющим эффективную первичную защиту от патогенной инвазии, а также обладающим выраженной иммуномодулирующей активностью [1]. Данный полифункциональный гликопротеин обнаружен у большинства млекопитающих, имеет сопоставимую структуру у человека и животных (80 кДа, 711 аминокислотных остатков у человека и из 689 у коровы) [5, 8]. Наибольшие концентрации ЛФ присутствуют в молозиве и молоке, меньшие — в слезной жидкости, слюне, семенной плазме, крови и моче, в секретах — вагинальных, бронхов, желудочно-кишечного тракта [5, 8]. Синтезируется ЛФ эпителиальными клетками, а также нейтрофилами, причем в экзокринных секретах и генитальном тракте его синтез постоянен, а в нейтрофилах он синтезируется при клеточной дифференциации, депонируется в гранулах и высвобождается лишь при активации клеток [1, 5]. Молекула белка пластична, состоит из N- и C-субъединиц, гомологичных по строению на 33 — 41% [5], но различающихся по функциональной активности [7]. Различают нативную (апо-) и связанную с молекулами металлов (железо, медь, цинк, магний) холо-форму белка [5]. Антимикробная активность ЛФ реализуется сразу несколькими путями — он способен секвестрировать железо и дестабилизировать мембраны микроорганизмов, препятствует адгезии микробов, увеличивает фагоцитарную активность макрофагов, модулирует общий иммунный ответ, а также защищает от вирусных инфекций, подавляющих иммунный ответ [1, 8]. В частности, ЛФ напрямую взаимодействует с бактериальными ЛПС, предотвращая взаимодействие с CD14 и запуская сигнальный каскад, приводящий к высвобождению цитокинов и хемокинов, медиаторов липидов и активных форм кислорода [1, 8]. Кроме того, ЛФ обладает и выраженными антифунгицидными свойствами — индуцирует гибель клеток *Candida albicans* по апоптическому типу, провоцирует дисфункции их митохондрий, взаимосвязанные с накоплением ROS и высвобождением цитохрома C [2]. Защитными свойствами обладает не только целая молекула ЛФ, но и ее отдельные фрагменты: установлена эффективность применения пептида из 11 N-концевых остатков ЛФ человека (hLF1-11) против метициллинрезистентного стафилококка (*MRSA*) у мышей, а также при лекарственной устойчивости к *Acinetobacter baumannii* и инвазивной форме *Candida albicans*, устойчивой к флуконазолу [9]. Действие ЛФ избирательно: апо-форма ЛФ и его гидролизат ингибируют рост *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, однако не влияют на различных представителей родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* [3]. Необходимо отметить значительную гомологию ЛФ у различных млекопитающих: при сравнении C-субъединицы молока коровы с соответствующей субъединицей свиньи, лошади, человека, верблюда, козы и буйвола идентичность последовательностей составляет от 72% до 96% [7, 8]. Однако существует и ряд межвидовых различий, влияющих на защитные свойства ЛФ [7]. Подобные различия обосновывают противоречивость результатов при сравнении эффективности ЛФ от разных видов и при разной патологии: по данным одних авторов против вируса гепатита (HIV) наиболее активен ЛФ верблюда, активность ЛФ человека и коровы сопоставимо меньше [4], по другим публикациям ЛФ коровы значительно превосходит человеческий при менингококковой инфекции у мышей [6].

Целью нашего исследования было сравнительное изучение влияния лактоферрина коровы и человека на гноеродные кокки и *C. albicans in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Коровье и сливное человеческое молоко (3 — 5 сутки лактации) освобождали от жира центрифугированием. Казеин осаждали подкислением препарата до $\text{pH}=4,0$ и отделяли центрифугированием. Надосадок нейтрализовали диализом в течение ночи и вносили на колонку анионообменника MacroPrep High Q (Bio-Rad, США). ЛФ элюировали линейным градиентом NaCl. Остаточные примеси удаляли гель-хроматографией на колонке TSK-gel Toyopearl 55F (Toyo Soda, Япония).

Для сравнительного изучения антимикробных свойств лактоферрина молока человека и коровы использовали 28 штаммов грамположительных кокков (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*) и 10 культур *Candida albicans*, из которых 4 были музейные с типичными свойствами, а 34 — клинические, полученные от больных с различными гнойно-воспалительными заболеваниями кожи, мягких тканей, дыхательной и мочевыделительной систем. Все они характеризовались множественной лекарственной устойчивостью к антибактериальным и антимикотическим препаратам и хлорсодержащим дезинфектантам.

Определение чувствительности микроорганизмов к ЛФ проводили стандартным методом двукратных серийных разведений в мясо-пептонном бульоне с концентрациями: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,8; 3,9; 1,95; 1,0; 0,5 мкг/мл. Суточные агаровые культуры исследуемых штаммов стандартизировали, разводили физиологическим раствором до 5000 микробных клеток в 1 мл (КОЕ/мл). В каждое разведение ЛФ и в контрольную пробирку с МПБ вносили по 0,1 мл микробной взвеси, перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 18 — 24 часов. Результат учитывали визуально по появлению признаков роста в контрольной и в опытных пробирках. Количество ЛФ в последней пробирке с полной видимой задержкой роста культуры расценивалось как минимальная ингибирующая концентрация (МИК) для испытуемого штамма.

Статистическая обработка результатов проводилась при помощи компьютерной программы InStat-II (GraphPad, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно полученным данным, минимальная ингибирующая концентрация ЛФ, полученного из молока человека, была в 4 — 8 раз меньше, чем ЛФ коровы (табл.).

При этом активнее всего ЛФ, вне зависимости от происхождения, ингибировал рост грибов рода *Candida*. Однако и в этом случае требовалось почти в 4 раза больше коровьего ЛФ для достижения эффекта, сходного с использованием человеческого.

В случае использования ЛФ коровьего молока в отношении двух изученных видов стафилококков эффективность его влияния была сопоставимой. Для подавления *E. faecalis* требовалось в среднем в 2 раза больше ЛФ, однако вследствие достаточно большой индивидуальной вариабельности результатов в данной подгруппе, статистически достоверных отличий не выявлено.

При изучении ЛФ из молока человека *S. aureus* значительно хуже поддавался воздействию, требовалась достоверно большая концентрация ЛФ — в среднем +30% к объему, необходимому для подавления *S. epidermidis* и *E. faecalis*.

Таким образом, эффективность ЛФ коровы значительно уступает ЛФ человека при противодействии бактериальной инвазии и грибам рода *Candida*,

самым устойчивым к воздействию ЛФ человека оказался *S. aureus*, а к ЛФ коровы — *E. faecalis*.

В целом, ЛФ коровы и человека обладают антимикробными свойствами, бактериостатические эффекты которых были показаны в отношении антибиотикорезистентных стафилококков и энтерококков и дрожжеподобных грибов рода *Candida*, однако МИК у них значительно различается. Это может быть связано, с одной стороны, со структурными различиями белка у разных видов млекопитающих [7, 8], а с другой, с объектом приложения — в эксперименте использовали штаммы возбудителей, полученных от человека.

Кроме того, антимикробная активность ЛФ в значительной степени обусловлена его способностью связывать железо, лишая бактерию необходимого для роста и жизнедеятельности микроэлемента [1, 8]. Возможно, потенциальная связывающая способность ЛФ коровьего молока, содержащего в среднем в 4 раза больше железа, чем ЛФ женского молока, также оказала влияние на результаты исследования.

Обращает на себя внимание повышенная устойчивость *S. aureus* к ЛФ человека по сравнению с двумя другими видами бактерий и отсутствие сходной реакции на коровий ЛФ. Можно предположить, что за время эволюции *S. aureus* выработал способы защиты от ЛФ, либо, что более вероятно, злоупотребление антибиотикотерапией привело к формированию резистентных мутантных форм, не чувствительных не только к биогенным и абиогенным лекарственным препаратам, но и к ЛФ. Это предположение косвенно подтверждается тем, что использование ЛФ (перорально) с антибиотиками при лечении гнойно-воспалительных заболеваний повышает его эффективность [8] — механизмы воздействия частично перекрываются, усиливая друг друга и сходным образом ослабевая у устойчивых форм. В этом случае перспективным представляется использование в схемах лечения стафилококковых инфекций коровьего лактоферрина, отличающегося от человеческого по структуре — его требовалось в 2,7 раза больше, однако эффективность в отношении *S. aureus* была наибольшей, по сравнению с воздействием на другие бактерии.

Таким образом, человеческий ЛФ демонстрирует значительно большую антимикробную активность в отношении штаммов *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis* и *C. albicans*, обладающих множественной лекарственной устойчивостью. Однако приемлемая эффективность в сочетании со значительно боль-

Сравнительная характеристика противомикробной активности ЛФ человека и ЛФ коровы по МИК

Вид патогена	ЛФ человека (а) (мкг/мл) M±m [95% ДИ]	ЛФ коровы (б) (мкг/мл) M±m [95% ДИ]	p
<i>S. aureus</i> (1)	38,2±4,6 (n=9) [27,6—48,8] SD=13,780	104,2±20,8 (n=9) [56,1—152,2] SD=62,500	1a-1б) p=0,0070 1a-2a) p=0,0594nds 1a-3a) p=0,0333 1a-4a) p=0,0001 1б-4б) p=0,0143
<i>S. epidermidis</i> (2)	27,8±2,3 (n=9) [22,5—33,1] SD=6,890	118,1±26,4 (n=9) [57,1—179,0] SD=79,331	2a-2б) p=0,0036 2a-1a) p=0,0594nds 2a-4a) p=0,0001 2б-4б) p=0,0135
<i>E. faecalis</i> (3)	26,6±2,4 (n=10) [21,2—32,0] SD=7,550	206,3±51,1 (n=10) [90,7—321,8] SD=161,51	3a-3б) p=0,0025 3a-1a) p=0,0333 3a-4a) p=0,0001 3б-4б) p=0,0058
<i>C. albicans</i> (4)	11,3±1,5 (n=10) [8,0—14,7] SD=4,679	43,8±9,5 (n=10) [22,2—65,3] SD=30,190	4a-4б) p=0,0035 4a-1a) p=0,0001 4a-2a) p=0,0001 4a-3a) p=0,0001 4б-1б) p=0,0143 4б-2б) p=0,0135 4б-3б) p=0,0058

Примечание. SD — стандартное отклонение, [95% ДИ] — доверительный интервал, nds — приближающиеся к достоверным, но недостаточно значимые различия.

шей доступностью коровьего ЛФ представляются более перспективными, особенно при лечении антибиотикорезистентных форм бактериальной и кандидозно-инфекций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зорина В.Н., Зорин Н.А. Белковые компоненты врожденного иммунитета в защите от патогенной инвазии. Журн. микробиол. 2013, 3: 111-117.
2. Acosta-Zaldívar M., Andrés M.T., Rego A. et al. Human lactoferrin triggers a mitochondrial- and caspase-dependent regulated cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. Apoptosis. 2016, 21(2): 163-173. doi: 10.1007/s10495-015-1199-9.
3. Chen P.W., Jheng T.T., Shyu C.L., Mao F.C. Synergistic antibacterial efficacies of the combination of bovine lactoferrin or its hydrolysate with probiotic secretion in curbing the growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol. 2013, 62 (Pt 12): 1845-1851. doi: 10.1099/jmm.0.052639-0.
4. El-Fakharany E.M., Sánchez L., Al-Mehdar H.A., Redwan E.M. Effectiveness of human, camel, bovine and sheep lactoferrin on the hepatitis C virus cellular infectivity: comparison study. Virol. J. 2013, 10: 199. doi: 10.1186/1743-422X-10-199.
5. Giansanti F., Panella G., Leboffe L., Antonini G. Lactoferrin from milk: Nutraceutical and pharmacological properties. Pharmaceuticals (Basel). 2016, 9 (4). pii: E61.
6. Schryvers A.B., Gonzalez G.C. Comparison of the abilities of different protein sources of iron to enhance *Neisseria meningitidis* infection in mice. Infect. Immun. 1989, 57 (8): 2425-2429.
7. Sharma S., Sinha M., Kaushik S. et al. C-lobe of lactoferrin: the whole story of the half-molecule. Biochem Res. Int. 2013; 2013: 271641. doi: 10.1155/2013/271641.
8. Siqueiros-Cendón T., Arévalo-Gallegos S., Iglesias-Figueroa B.F. et al. Immunomodulatory effects of lactoferrin. Acta Pharmacol Sin. 2014, 35 (5): 557-566. doi: 10.1038/aps.2013.200.
9. van der Does A.M., Bogaards S.J., Jonk L. et al. The human lactoferrin-derived peptide hLF1-11 primes monocytes for an enhanced TLR-mediated immune response. Biometals. 2010, 23 (3): 493-505. doi: 10.1007/s10534-010-9322-4.

Поступила 15.10.17

Контактная информация: Зорина Вероника Николаевна, д.б.н., 654007, Новокузнецк, пр. Строителей, 5, р.т. (3843)45-84-18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*Е.В.Отрашевская*¹, *В.Н.Винокурова*¹, *Е.А.Шитиков*²,
*Е.А.Сотникова*², *Т.А.Перевышина*¹, *С.А.Колченко*², *Т.Б.Бутусова*²,
*Е.С.Кострюкова*², *Е.Н.Ильина*², *Г.М.Игнатьев*^{1,3}

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ СУБ-ШТАММА *M. BOVIS* VCG-1 (RUSSIA) В ПРОЦЕССЕ ПРОИЗВОДСТВА ВАКЦИНЫ БЦЖ

¹НПО «Микроген», Москва; ²Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины, Москва; ³Санкт-Петербургский НИИ вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов

Цель. Изучение структуры генома и анализ стабильности генетических свойств субштамма *M. bovis* VCG-1 (Russia), применяемого для производства вакцин. *Материалы и методы.* Было проведено полногеномное секвенирование и последующий сравнительный анализ образцов субштамма *M. bovis* VCG-1 (Russia) от рабочего банка до конечного пассажа производственного культивирования, а также производственных серий. Молекулярно-биологическими методами был проведен анализ числа тандемных повторов (VNTR) по 24 локусам и сполиготипирование. *Результаты.* Последовательность субштамма *M. bovis* VCG-1 (Russia) рабочего посевного банка была полностью собрана, аннотирована и депонирована в базу GenBank. Анализ DU2- и RD-регионов подтвердил принадлежность субштамма *M. bovis* VCG-1 (Russia) к группе DU2-I, BCG Russia.