

61:03-3/1041-0

РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ

На правах рукописи

КОЛГАНОВА Татьяна Владимировна

**КОРРЕКТИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОБИОТИКОВ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДИСБАКТЕРИОЗЕ**

03.00.07 – микробиология

03.00.15 – генетика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

НАУЧНЫЕ РУКОВОДИТЕЛИ:

кбн, с.н.с.

Осипова И.Г.

кмн, доцент

Васильева Е.А.

Москва 2003

СОКРАЩЕННЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В РАБОТЕ

ASG – L-Аспарагиназа

GBL – glucan-binding lectin

GTF – glucosyltransferase

HUS – hemolytic-uremic syndrome (гемолитико-уремический синдром)

MN (MN) – маннан

PPO – Полифенол Оксидаза (тирозиназа)

RBc – эритроциты

SLT - шигаподобный токсин

UPEC – уропатогенная (ые) E.coli

UTI – urinary tract infection(s) (инфекции мочевыводящего тракта)

VT - веротоксин

АК – аминокислота

БК (ЗЭ) – буккальные клетки (клетки защечного эпителия)

БСА – бычий сывороточный альбумин

ГК – геморрагический колит

ЖКТ - желудочно-кишечный тракт

ИР – исследование роста

КОЕ – колониеобразующая единица

КР – колонизационная резистентность

м.д. – мышьяная доза

НИЛИ – низкоинтенсивное импульсное лазерное излучение

ОКИ - острые кишечные инфекции

ОП - «острова» и «островки» патогенности

ПБ – пробиотики

по (bp) – пар оснований (base pairs)

ФБ – фосфатный буфер

ФСБ – фосфатно – солевой буфер

ч.д. – человеческая доза

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ЧАСТЬ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
Глава 1. Нормофлора и ее роль в обеспечении колонизационной резистентности организма.....	12
Глава 2. Адгезия как первый этап колонизационного процесса.....	22
Глава 3. Нарушения колонизационной резистентности – дисбиозы. Модели дисбактериозов.....	29
3.1. Инфекции, вызываемые энтерогеморрагическими <i>Escherichia coli</i>	32
3.2. Урогенитальные инфекции, как следствие дисбиоза.....	37
Глава 4. Профилактика и лечение дисбиозов	
4.1. Использование пробиотиков в терапии дисбиозов.....	40
4.2. Низкоинтенсивное импульсное лазерное излучение (НИЛИ) в терапии инфекционных заболеваний.....	45
ЧАСТЬ 2. СОБСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ	
Глава 1. Материалы и методы	
1. Материалы.....	49
2. Методы.....	53
2.1. Идентификация бактерий.....	53
2.2. Методы исследования бактериальной адгезии	
2.2.1. Тест агрегации дрожжей.....	53
2.2.2. Тест «исследование адгезии к иммобилизированным субстратам» (Growth assay).....	53
2.2.3. Обогащение культур микроорганизмов клетками, экспрессирующими пили I типа.....	54
2.2.4. Радионуклеидное исследование адгезии.....	54
2.2.5. Формалинизация эритроцитов.....	55
2.2.6. Исследование адгезии к эритроцитам	55
2.2.7. Исследование адгезии микроорганизмов к клеткам заще- чного эпите- лия.....	56
2.2.8. Исследование связывание протеина FimH с пероксидазой хрена.....	57
2.2.9. Обработка ферментами ASG и PPO.....	57
2.2.10. Обработка НИЛИ.....	57

2.3. Определение антагонистической активности методом отсроченного антагонизма.....	57
2.4. Моделирование дисбактериоза у животных.....	58
2.5. Исследование транслокации кишечной флоры в органы и ткани.....	59
2.6. Методы работы с ДНК.....	59
2.6.1. Выделение плазмидной ДНК.....	59
2.6.2. Обработка ДНК.....	60
2.6.3. Методы введения генетического материала в клетку.....	61
2.6.3.1. Кальциевая трансформация.....	61
2.6.3.2. Конъюгация и мобилизация.....	62
2.7. Оценка продукции колицина и чувствительности бактерий к его действию	
2.7.1. Тест с верхним агаром.....	62
2.8. Методы статистической обработки результатов исследований.....	63
 Глава 2. Получение генноинженерных вариантов штамма E.coli M17	
2.1. конструирование плазмид ColΔmob и pCollacZ.....	64
2.2. получение штаммов E.coli M17/ pCollacZ, E.coli M17/ ColΔmob, E.coli M17 fimH::npt/ pCollacZ, E.coli M17 fimH::npt/ pColΔmob.....	69
 Глава 3. Антагонистическая активность нормальной микрофлоры по отношению к патогенным Escherichia coli.....	71
 Глава 4. Сравнительное исследование адгезивной активности различных групп пробиотиков.....	76
 Глава 5. Исследование влияния на уровень адгезии различных штаммов E.coli физико-химических факторов.....	81
5.1. Влияние низкочастотного инфракрасного лазерного излучение на уровень адгезии патогенных E.coli к различным субстратам.....	81
5.1.1. Исследование влияния НИЛИ на уровень жизнеспособности E.coli.....	81
5.1.2. Влияние НИЛИ на уровень адгезии патогенных E.coli к эритроцитам...	82
5.1.3. Изменение адгезии патогенных E.coli под влиянием обработки НИЛИ эритроцитов.....	84
5.1.4. Влияние НИЛИ на уровень адгезии патогенных E.coli к клеткам защечного эпителия.....	84

5.2. Влияние обработки ферментами L-Аспарагиназой и Полифенол оксидазой на уровень адгезии E.coli к различным субстратам.....	85
5.2.1. Определение бактерицидных свойств ферментов ASG и PPO.....	85
5.2.2. Определение эффективной антиадгезивной концентрации ASG и PPO.....	86
5.2.3. Исследование влияния ферментов L-Аспарагиназы и Полифенол оксидазы на адгезию патогенных E.coli к эритроцитам.....	88
5.2.4. Исследование влияния ферментов ASG и PPO на адгезию патогенных E.coli к клеткам щечного эпителия.....	88
5.2.5. Исследование влияния ферментов ASG и PPO на адгезию E.coli в опытах "Исследования адгезии к иммобилизованным субстратам" и "радионуклеидном исследовании адгезии".....	89
5.2.6. Исследование влияния ASG и PPO на величину связывания очищенного протеина FimH с пероксидазой хрена в реакции ELISA.....	92
5.3. Влияние комплексной обработки НИЛИ и ферментами ASG и PPO на уровень адгезии E.coli.....	93
5.4. Влияние НИЛИ и ферментов PPO и ASG на адгезивную активность пробиотиков.....	98
Глава 6. Исследование защитного действия пробиотиков на модели in vivo	
6.1. Отработка модели дисбактериоза на мышах.....	98
6.2. Моделирование инфекционного процесса, вызванного E.coli O157:H7.....	102
6.3. Использование пробиотиков для профилактики и лечения инфекции, вызванной E.coli O157:H7.....	103
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	107
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	118

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что основной функцией нормальной микрофлоры человека является обеспечение колонизационной резистентности (КР) пищеварительного тракта. В обычных условиях поддержание КР микрофлорой осуществляется за счет продукции антибиотических веществ, конкуренции за места адгезии, подавления адгезии условнопатогенных бактерий, ингибирования транслокации и ряда опосредованных механизмов [88].

Факторы, способствующие нарушению состава микрофлоры и приводящие к развитию дисбактериозов, весьма многочисленны: это и прием лекарственных препаратов различных групп, стрессы, неблагоприятная экологическая обстановка, неправильный рацион питания, голодание. При антибиотикотерапии в первую очередь в нормобиоценозе исчезают "нормальные" кишечные палочки, и их место занимают условно патогенные и патогенные эшерихии, способные вызывать как местные, так и генерализованные инфекционно-воспалительные процессы. Причиной и характерным признаком дисбактериоза является избыточный рост патогенных и условно патогенных микроорганизмов в биотопе, что, в свою очередь, способствует их колонизации в нетипичных эконизах. Поэтому до настоящего времени актуальным является исследование и разработка новых подходов к коррекции дисбактериозов, одним из которых является разработка новых пробиотиков (ПБ), в том числе на основе нормальной кишечной палочки. Одним из первых отечественных ПБ является колибактерин. Штамм *E.coli* A. Ниссле [45], входивший в состав колибактерина, за годы эксплуатации утратил плазмиду, детерминирующую колициногенность, в связи с чем снизил антагонистическую активность в отношении ряда бактерий, чувствительных к действию колицина [64].

Считается, что основным требованием при подборе производственных штаммов для препаратов – ПБ должна быть их высокая колонизационная активность [131,132]. При этом особое внимание следует обращать на такие факторы колонизации как антагонистическая и адгезивная активности.

Адгезивная активность является первым этапом развития колонизационного процесса и в большинстве случаев желательна для ПБ, тогда как у патогенных микроорганизмов рассматривается в качестве одного из стартовых механизмов развития инфекции. Таким образом, при подборе ПБ для коррекции дисбиоза, вызванного тем или иным патогеном, целесообразно сравнение адгезивных свойств патогена и

ПБ с целью выяснить, может ли данный ПБ конкурировать с патогеном за субстраты связывания и тем самым препятствовать колонизации последнего в организме.

Одной из важнейших задач при коррекции дисбиозов является удаление патогенов из экониш. Блокирование адгезии патогенов к субстратам связывания может предотвратить развитие инфекции на раннем этапе. Из литературы известны вещества, способные блокировать адгезию микроорганизмов, среди которых пептиды, моно и олигосахариды, ферменты, в том числе полифенол оксидаза (РРО). Известна так же способность физических факторов таких, как ультразвуковое воздействие, низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ), снижать адгезивную активность. Но если блокирование адгезии патогенов целесообразно, то снижение адгезивности нормальной флоры нежелательно, в ряде случаев это может привести к неблагоприятным последствиям. Отсюда очевидна актуальность поиска агентов, способных избирательно ингибировать адгезивность патогенов, воздействуя при этом незначительно на нормофлору.

Имеется положительный опыт применения низкоинтенсивного импульсного лазерного излучения (НИЛИ) в различных областях медицины, в частности в урологии для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний. Опубликован ряд работ, посвященных воздействию НИЛИ на организм человека и на отдельные его клеточные субпопуляции, но о воздействии НИЛИ на микроорганизм сведений в литературе очень мало. Известно только, что достигаемая с помощью такого лечебного воздействия быстрая санация мочевыводящего тракта у больных позволяет предположить возможное воздействие НИЛИ не только на макроорганизм, но и на микроорганизмы.

В настоящее время при доклиническом изучении ПБ руководствуются, в основном, методами *in vitro*, так как отсутствует эффективная экспериментальная модель дисбактериоза на животных. Наиболее информативная – модель на гнотобиотических животных. Однако работа с ними требует наличия специальных условий и оборудования. Поэтому, предложено несколько способов моделировать дисбактериоз у «микробных» животных. Дисбактериоз вызывается посредством тотальной кровопотери, голодания, стрессовых ситуаций, радиационного облучения, приема антибиотиков. Последний способ изучался В.Г. Лиходедом с соавт. [28,34,60]. Ими в частности было доказано, что введение мышам больших доз ампиокса сопровождается значительным снижением клеточного и гуморального антиэндоксинного иммунитета.

Учитывая всё вышеизложенное, настоящая работа преследовала цель изучить корректирующее действие ПБ при экспериментальном дисбактериозе. Для достижения поставленной цели последовательно решались следующие задачи:

1. Сконструировать на базе известной плазмиды ColE1 гибридные плазмиды, несущие детерминанту синтеза колицина и лишенные генов *mob*, контролирующих конъюгативную мобилизацию плазмиды.
2. Получить и исследовать новые рекомбинантные варианты производственного штамма М-17 способные к продукции колицина Е1.
3. Изучить антагонистическую активность новых рекомбинантных ПБ в отношении патогенных клинических штаммов *E.coli*, выделенных от пациентов с дисбиозами.
4. Провести сравнительное изучение адгезивной активности ПБ различных групп (бифидо, лакто, колисодержащих, споровых и грибов) и клинических штаммов *E.coli*, выделенных от пациентов с дисбиозами.
5. Изучить влияние физико-химического воздействия (НИЛИ и ферментов L-аспарагиназы (ASG) и полифенол оксидазы (PPO)) на адгезию микроорганизмов.
6. Разработать адекватную модель дисбактериоза для оценки эффективности ПБ на животных.
7. Изучить защитное действие ПБ при экспериментальном дисбактериозе у животных.

Научная новизна:

1. Впервые на основе родительской плазмиды ColE1 получены новые плазмиды pCollacZ и ColДmob, а так же рекомбинантные штаммы, содержащие полученные плазмиды: *E.coli* М-17/pCollacZ, М-17 *fimH::npt/pCollacZ*, М-17/ColДmob, М-17 *fimH::npt/ColДmob*. Штаммы обладают способностью к продукции колицина Е1, при этом сконструированные плазмиды лишены *mob* области и вследствие этого не способны к мобилизации конъюгативными плазмидами.
2. Впервые изучена антагонистическая активность новых рекомбинантных штаммов и коммерческих ПБ различных групп в отношении клинических штаммов *E.coli*, выделенных от пациентов с дисбиозами.
3. Впервые исследовано влияние НИЛИ на адгезивные свойства *E.coli* и установлена бульшая чувствительность патогенов к антиадгезивному действию НИЛИ по сравнению с ПБ.

4. Впервые исследовано влияние ферментов ASG и PPO на адгезивную активность микроорганизмов и установлена бульшая чувствительность патогенов к антиадгезивному действию ферментов по сравнению с ПБ.
5. Разработана модифицированная модель экспериментального дисбактериоза на животных. При этом для доказательства наличия дисбактериоза впервые использован штамм *E.coli* O157:H7 (212), вызывающий геморрагический колит.
6. Впервые предложен способ коррекции геморрагического колита с помощью ПБ: генноинженерных вариантов штаммов М-17, а так же коммерческих препаратов - биофлора, биоспорина, лактобактерина, колибактерина.

Практическая значимость.

1. Представлены новые научные данные о механизме защитного действия ПБ.
2. Предложена новая модель для изучения дисбактериоза с использованием мышей. Доказана эффективность применения ПБ для профилактики и лечения дисбактериозов на этой модели.
3. In vitro доказана возможность комплексного использования ПБ, НИЛИ и ферментов PPO и ASG для предотвращения колонизации патогенов.
4. Получены новые рекомбинантные варианты пробиотического штамма *E.coli* М-17, обладающие способностью синтеза колицина Е1, которые могут быть использованы для разработки пробиотических препаратов.

Полученные данные можно использовать в лекционном материале по микробиологии в разделах нормальная флора, дисбактериозы и пробиотики.

Положения, выносимые на защиту.

1. Сконструированные плазмиды pCollacZ и ColDmob содержат детерминанту синтеза колицина Е1 (cea), ген иммунитета к нему (imm), не способны к мобилизации конъюгативными плазмидами (не содержат mob области), стабильно поддерживаются в популяции (за счет наличия гена cer) и пригодны для использования в качестве факторов, придающих родительскому штамму *E.coli* М 17 способность к синтезу колицина Е1 и вследствие этого повышенную антагонистическую активность в отношении патогенов.
2. Полученные рекомбинантные штаммы, а так же колисодержащие ПБ в опытах in vitro проявляют высокий уровень антагонистической активности в отношении клинических штаммов патогенных *E.coli*, выделенных от больных с дисбиозами, тогда как споровые пробиотики и энтерол обладают низким уровнем антагонизма в отношении изучаемых штаммов.

3. Воздействие НИЛИ блокирует адгезины уropатогенных *E.coli*, и тем самым предотвращает колонизацию этих патогенов в организме. Обработка эритроцитов НИЛИ приводит к ингибированию рецепторов, что также выражается в частности снижением адгезии. Патогенные *E.coli* в значительной мере более чувствительны к воздействию НИЛИ, чем представители нормофлоры.
4. Ферменты ASG и PPO обладают свойством снижать уровень адгезивности микроорганизмов на различных моделях и экспериментах *in vitro*: иммобилизованные субстраты, эукариотические клетки (эритроциты и клетки зашечного эпителия) и др. ПБ значительно менее чувствительны к воздействию ферментов по сравнению с патогенными *E.coli*.
5. Получена адекватная модель дисбактериоза у животных для исследования эффективности ПБ. В качестве маркера наличия дисбактериоза использован штамм *E.coli* O157:H7.
6. ПБ обладают протективным действием в отношении клинического штамма *E.coli* O157:H7 на модели *in vivo*.

Апробация работы. Результаты исследований были доложены на научно-практических конференциях НПО "Биомедицинские технологии" (Москва, 2000, 2002, 2003), на международной научно-практической конференции памяти Г.И. Гончаровой (Москва, 2002) и на заседаниях кафедры микробиологии и биологии медицинского факультета РУДН (Москва, 2000, 2001, 2002, 2003).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 работ.

1. Т.В. Колганова, И.Г. Осипова, М.В. Далин, Х. Ватанабе, Е.А. Васильева, В.Л. Чеснокова, В.Ф. Евлашкина, Э.Г. Кравцов, Н.Ю. Абрикосова, О.Ю. Лукьянова. Некоторые механизмы взаимодействия пробиотиков с веротоксинпродуцирующими *Escherichia coli* O157: H7// сб. Биотехнология, Москва, 2000, №13, с. 69-76.
2. Адгезивная активность пробиотиков, применяемых в гинекологической практике/ И.Г. Осипова, Л. Созаева, В.Ф. Евлашкина, Е.А. Васильева, О.Ю. Лукьянова, Т.В. Чумаева, Т.В. Колганова. // сб. Биотехнология Москва, 2001, №16, с. 35-39.
3. Т.В. Колганова, Х. Ватанабе, М.В. Далин, Е.А. Васильева, И.Г. Осипова, В.А. Лившиц, О.Ю. Лукьянова, В.Ф. Евлашкина К вопросу о механизме защитного действия пробиотиков// сб. Биотехнология, Москва, 2001, №16, с. 23-28.
4. Т.В. Колганова, А.В. Ермолаев, Р.Дж.Дойл. Влияние ферментов аспарагиназы и полифенолоксидазы на адгезивные свойства микроорганизмов// БЭБ, 2002, № 1, с. 71 – 74.

5. Т.В. Колганова, Т. Джарадат, Т.В. Чумаева, И.Г. Осипова и др. К вопросу о воздействии импульсного инфракрасного лазерного излучения и пробиотиков на штаммы *Escherichia coli*, выделенные от людей с заболеваниями мочевыделительной системы// международная научно-практическая конференция памяти Г.И. Гончаровой, Сб. материалов, Москва, 2002, с. 25.
6. Изучение адгезивной активности пробиотиков различных лекарственных форм, применяемых в гинекологической практике/ Т.В. Чумаева, И.Г. Осипова, Е.А. Васильева, Т.В. Колганова, О.В. Золотарева, С.Э. Саркисов// международная научно-практическая конференция памяти ГИ Гончаровой, Сб. материалов, Москва, 2002, с. 24.
7. Т.В. Колганова, Т. Джарадат, А.В. Ермолаев, И.Г. Осипова, Е.А. Васильева, М.В. Далин, Р.Дж. Дойл. К вопросу о комплексном воздействии импульсного инфракрасного лазерного излучения и аспарагиназы на штаммы *Escherichia coli*, выделенные при заболеваниях мочевыделительной системы// БЭБ, 2002, т. 133, №6, с. 681-683.
8. Т. В. Колганова, Т. Джарадат, А. В. Ермолаев, И.Г. Осипова, Е.А. Васильева, М.В. Далин, Р.Дж. Дойл. К вопросу о комплексном воздействии низкочастотного лазерного излучения и полифенолоксидазы на адгезивную способность штаммов *Escherichia coli*, выделенных при заболеваниях мочевыделительной системы у людей// БЭБ, 2002, т. 134, №7, с. 190-192.
9. Изучение адгезивной активности пробиотиков различных лекарственных форм, применяемых в гинекологической практике/ Т.В. Чумаева, И.Г. Осипова, Е.А. Васильева, Т.В. Колганова., О.В. Золотарева, С.Э. Саркисов // сб. Биотехнология Москва, 2002, №19, с. 100-103.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на _____ стр. машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов экспериментальных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и библиографического указателя, включающего _____ источников. Работа иллюстрирована _____ рисунками и _____ таблицами.

ЧАСТЬ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ГЛАВА 1. НОРМОФЛОРА И ЕЕ РОЛЬ В ОБЕСПЕЧЕНИИ КОЛОНИЗАЦИОННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОРГАНИЗМА

Термин колонизационная резистентность (КР) впервые введен Van der Waaij D., под ним понимают совокупность взаимосвязанных физиологических, микробиологических и иммунологических факторов организма, препятствующих колонизации организма патогенами [14]. КР обеспечивается за счет нормальной перистальтики кишечника [194], препятствующей избыточной колонизации тонкой кишки, а так же благодаря нормофлоре, играющей в поддержании КР основную роль [88].

Нормальной следует считать эволюционно сложившуюся микрофлору, которая формировалась во взаимодействии с организмом человека в течение основного периода его существования как биологического вида [55].

До настоящего времени нет общепринятой классификации нормальной микрофлоры [180], однако, чаще всего принято подразделять нормальную микрофлору кишечника здоровых людей и животных на индигенную, транзиторную и факультативную. Нормофлору подразделяют так же на облигатную и факультативную. Количество и функции основных представителей нормофлоры приведены в таблице 1. В то время, как роль транзиторной микрофлоры в настоящее время активно изучается, основная функция индигенной микрофлоры известна и заключается в поддержании КР. Микроорганизмы индигенной микрофлоры в составе биопленки в сотни раз более устойчивы к воздействию неблагоприятных факторов по сравнению с бактериями находящимися в просвете кишечника. Микрофлора характеризуется неоднородностью и относительным постоянством в разных отделах желудочно-кишечного тракта. Подсчитано, что в кишечном тракте взрослого человека количество микроорганизмов составляет 10^{13} , т.е. почти равно числу клеток всех тканей и органов макроорганизма [61]. О многокомпонентности микрофлоры человека говорит хотя бы тот факт, что в 1.0 г содержимого слепой кишки обнаруживается около двух миллиардов микроорганизмов, представителей 17 различных семейств, 45 родов и свыше 400 различных видов [17,138,158]. Количество индигенных видов среди них невелико, но численность их значительна [49], и они, колонизируя поверхность клеток слизистой, обитают в толще слоя муцина, покрывающего эпителий.

Муцин в комплексе с бактериями представляет собой специфическую биопленку, защищающую энтероциты от действия чужеродных агентов [16,62,81]. Доказано свойство бактерий нормофлоры индуцировать экспрессию гена, кодирующего синтез

Таблица 1.

Количественное содержание и функции представителей микробиоценоза кишечника и их функции в поддержании КР

Облигатная микрофлора

Факультативная и условно-патогенная микрофлора

Наименование микроорганизма	Количество микроорганизмов в 1г фекалий		Функция микроорганизма
	человека	мышей	
Облигатная микрофлора			
Bifidobacterium (большинство bifidum)	$10^9 - 10^{10}$	$10^9 - 10^{10}$	Физиологическая защита кишечного барьера от проникновения микробов и токсинов внутрь организма; выработка жирных кислот; активация пристеночного пищеварения; синтез АК, витаминов; усиление всасывания ионов металлов и вит. D; иммуномодулирующее действие — препятствуют деградации IgA, стимулируют интерферонообразование и вырабатывают лизоцим.
Lactobacterium sp.	$10^6 - 10^8$	10^9	Продуцируют молочную кислоту, перекись водорода, пируват, ацетат, пропионовую кислоту, манитол, низин; высокая антагонистическая активность против протей; иммуномодуляция — стимуляция фагоцитарной активности нейтрофилов, макрофагов, синтеза иммуноглобулинов, образование интерферонов, ИЛ I, фактора некроза опухоли α ; рециркуляция желчных кислот и холестерина; сохранение баланса состава микробных популяций после приема антибиотиков.
Propionobacterium acnes	$10^6 - 10^{7*}$	нд	Нормальные кислотообразователи, обладают антагонистическим действием в отношении патогенов.
Escherichia coli	$10^7 - 10^8$		С нормальной ферментативной активностью
	$10^6 - 10^{7*}$	$10^6 - 10^7$	Со сниженной ферментативной активностью
	$10^6 - 10^{7*}$		Лактозонегативные
Enterococcus sp.	$10^5 - 10^6$	$10^5 - 10^6$	Общее их количество не должно превышать количество кишечных палочек. Обладают антагонистической активностью в отношении патогенных микроорганизмов
Streptococcus sp.	$10^5 - 10^6$		Пептострептококки — образуют водород, превращающийся в перекись, тем самым поддерживают кислый pH, участвуют в протеолизе белков молока, ферментации углеводов. Непатогенные стрептококки способствуют выработке Ig.
Bacteroides	$10^7 - 10^{11}$	$10^7 - 10^8$	Расщепляют желчные кислоты, участвуют в процессе липидного обмена
Peptococcus	$10^5 - 10^6$		Метаболизируют пептон и АК с образованием жирных кислот, вырабатывают широкий спектр органических кислот
Staphylococcus	$<10^4$	10^4	Антагонистическая активность к широкому спектру патогенных и условно патогенных микроорганизмов, высокая ферментативная активность, противоаллергенное и антитоксическое действие
Bacillus	Значит. Кол-ва	10^3	
Дрожжеподобные грибы	$<10^4$	10^6	
Proteus	$<10^4$	10^4	
Klebsiella, Serratia, Citrobacter etc.	$<10^5$		
Fusobacterium, eubacterium, catenobacterium etc.			Участвуют в синтезе пептидаз, расщепляющих короткие пептиды до АК
Факультативная и условно-патогенная микрофлора			

кишечного муцина MUC2 and MUC3, причем экспрессия наблюдалась лишь в клетках линии HT-29 (кишечный эпителий), тогда как клетки неинтестинальной линии HEp-2 в тех же условиях продуцировали лишь минимальное количество MUC2 mRNA и не продуцировали MUC3 mRNA. Добавление в среду MUC2 и MUC3 муцинов понижала уровень адгезии патогенных кишечных палочек к эукариотическим клеткам, как первой, так и второй линии [81,168,170]. Важнейшим механизмом обеспечения КР является конкурирующее действие микроорганизмов за экологическую нишу, осуществляющееся благодаря проявлению бактериями нормофлоры разнообразных свойств [183,189,201,240].

Бактерии нормофлоры обладают антагонистической активностью в отношении патогенных микроорганизмов. Понятие антагонистической активности очень широко и складывается из многих составляющих, среди которых более высокая скорость размножения бактерий нормофлоры, более широкий набор ферментов, а также продукция различных бактерицидных и бактериостатических субстанций [184,197]. Среди таких веществ, продуцируемые лакто и бифидобактериями органические жирные кислоты, обладающие высокой антагонистической активностью по отношению к патогенам. Лактобактерии, бифидобактерии и особенно кишечная палочка способны к синтезу бактериоцинов – естественных антибиотикоподобных веществ [164,223]. Так субстанции, выделяемые бифидобактериями, ингибируют рост таких патогенных бактерий, как сальмонеллы, клостридии, листерии. Бактериоцины, продуцируемые лактобактериями (гельветицин, лактобревин, булгарицин, реутерин, лактоцины, плантарицин, лактолин, лактоцидин) способны подавлять размножение широкого спектра микроорганизмов: клостридий, стрептококков, энтеробактерий, листерий, грибов рода Кандида и др. [197,220]. Первый из известных бактериоцинов, продуцируемый энтеробактериями, – колицин обладает мощным ингибирующим действием в отношении бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. Важным свойством бактерий, вырабатывающих бактериоцины является их устойчивость к синтезируемым субстанциям.

Способность к образованию колицинов не является постоянным свойством бактерий вида *E.coli*. Она связана с Col-факторами (или Col-плазмидами). Существует классификация колицинов по перекрестной устойчивости/ толерантности бактерий, однако это свойство отражает не столько организацию самого колицина, сколько свойство бактериальной клетки в целом. По генетическим характеристикам самих колицинов, механизму их действия на бактериальную клетку была предложена их классификация (таблица 2) [59].

Таблица 2

Некоторые типы колицинов и их характеристики

колицин	группа	Механизм действия	Число АК	Молекулярная масса
E1	A	Деполяризация мембраны	522	57.279
A	A	То же	592	62.989
K	A	То же	ND	Ок. 69.000
Ia	B	То же	ND	Ок. 79.000
Ib	B	То же	ND	Ок. 80.000
E2	B	ДНК-эндонуклеаза	581	61.561
E3	B	Инактивация рибосомального синтеза	551	57.962
DF13	B	То же	561	59.283

Колицины – это белки. В небольших количествах они присутствуют в супернатанте соответствующей колициногенной культуры. Продукция колицинов повышается на несколько порядков при индукции, т. е. при воздействии на колициногенные бактерии таких агентов, как УФ и радио- излучение, митомицин С. Роль генетической системы *lexA* доказывается наличием в промоторе гена продукции колицина сайта связывания с белком *LexA* [124]. Синтез колицина летален: продуцирующая колицин клетка гибнет. Открытие генов лизиса, являющихся частью того же оперона, что и гены продукции колицина, показывает, что, пока существует иммунность, летальный эффект не связан с действием самого колицина. Наиболее изученным колицином является колицин E1, синтез которого кодирует плазмида ColE1, основные гены которой и выполняемые ими функции представлены в таблице 3.

Антагонистическая активность бактерий нормофлоры доказана в экспериментах *in vitro*, с использованием методов отсроченного антагонизма, совместного культивирования, а так же *in vivo* [15,120]. Выявлению существенных деталей антагонистических взаимоотношений между микроорганизмами кишечного биоценоза способствует проведение экспериментов на моделях, с использованием перевиваемых клеточных культур, развивающихся куриных эмбрионов, изолированной петли кишечника, кератоконъюнктивной пробы и др. [54].

Установлено участие бактерий нормальной микрофлоры в ферментативной деятельности пищеварительного тракта. И, хотя некоторые из ферментов могут играть роль проканцерогенов, их мутагенная активность тесно связана с характером субстрата и является субстрат - индуцированной. Продуцируемые нормальной микрофлорой органические кислоты, особенно ацетат и бутират, напротив, являются антиканцерогенами. Способность бактерий нормофлоры синтезировать ферменты,

Таблица 3.

Основные гены плазмиды Col E1 и их функции

Ген	Функция
ori	Точка начала репликации
gom	Продукт – белок, модулирующий связывание РНК I с РНК II, обеспечивающее прохождение репликации. При отсутствии гена gom происходит накопление молекул плазмидной ДНК в клетке.
tom и mob	mob кодирует синтез белков, с помощью которых производится односторонний разрыв ДНК в области tom. Во время конъюгации, инициированной конъюгативной плазмидой, нить с разрывом образует комплекс с белком Mob, что обеспечивает мобилизацию плазмиды через канал, возникший в процессе конъюгации, в клетку – реципиент.
cer	Обеспечивает поддержание плазмидного мономера, что обеспечивает высокую копиюность плазмиды в клетке.
exc	Обеспечивает несовместимость уже присутствующей в клетке плазмиды с любой другой родственной плазмидой.
cea-kill	Продукт – белок колицин

расщепляющие сахара, особенно лактозу, крайне важна у младенцев с лактазной недостаточностью и при неинфекционных заболеваниях кишечника, например, болезни Крона [38,45,61,62]. Важную роль играет микрофлора кишечника в метаболизме белков, азот- и углеродсодержащих соединений, липидов, желчных кислот, холестерина, ряда и микроэлементов. Микрофлора кишечника участвует во всасывании солей кальция и железа, регулирует моторную активность толстой кишки, поддерживает водный, газовый, ионный гомеостаз организма, связывает и разрушает токсические субстанции, инактивирует избыток пищеварительных ферментов [38,45,61,62]. Большое значение придается нормофлоре кишечника в защите организма от токсических элементов экзогенного происхождения. Микрофлора кишечника совместно с системами энзимного и иммунного гомеостаза участвует в активации или инактивации лекарственных препаратов, в частности антибиотиков. Бактериальной флоре пищеварительного тракта свойственно участие в синтезе витаминов, в первую очередь витамина К, витаминов группы В. Нормофлора способствует всасыванию витамина D [15,35,45,47].

Важным вкладом бактерий нормальной микрофлоры в обеспечении КР организма является их иммуномодулирующее действие. Установлено влияние низкомолекулярных метаболитов, продуцируемых микрофлорой, на синтез и накопление в кишечном соке секреторного IgA. Непосредственным стимулом пролиферации синтезирующих IgA клеток в слизистой кишечника являются микробные антигены. Бак-

терии нормофлоры повышают фагоцитарную активность макрофагов и нейтрофилов; признана их способность модулировать гуморальный иммунитет, число В лимфоцитов и уровень специфических антител; тогда как в вопросе о регуляции Т клеточного иммунитета и продукции цитокинов единого мнения нет. Ценным свойством бактерий нормофлоры является модулирующее действие на продукцию интерферонов: так имеются данные о противовирусном действии *L. casei* в отношении цитомегаловируса [35].

Одна из основных функций индигенной нормофлоры, обеспечивающая колонизационную резистентность макроорганизма - адгезия микробов к рецепторам слизистой оболочек кишечника. Способность штаммов нормофлоры связываться с теми или иными рецепторами поверхности слизистой обеспечивает конкуренцию за эти рецепторы с патогенными и условно-патогенными микроорганизмами. Микроорганизмы, составляющие нормальную микрофлору, могут находиться как на поверхности слизистой оболочки кишечника, будучи интимно с ней связанными (индигенная, мукозная или М-флора), так и в просвете кишки (просветная, полостная или П-флора). Представители М-флоры фиксируются к строго определенным рецепторам эпителиальных клеток [233]. Число таких рецепторов на эпителиальных клетках ограничено. Это подтверждается наблюдениями, свидетельствующими о том, что предварительная обработка мишеней лектином КонА или адгезинами бактерий резко снижает количество микроорганизмов, способных фиксироваться на преинкубированных клетках. Считается, что адгезированные бактерии нормофлоры «блокируют» рецепторы эукариотических клеток, делая их недоступными для связывания с патогенными агентами [186]. Механизмы, отвечающие за процесс специфической адгезии индигенных микроорганизмов, в последние годы интенсивно исследуются. Установлено, что одним из элементов, ответственных за нее, являются поверхностные структуры бактерий, содержащие адгезины, которые комплементарны соответствующим рецепторам, расположенным на мембранах эпителиоцитов. Адгезины могут быть локализованы в мембранах бактерий, на их поверхности, а также на специфических фимбриях, которые способны, пенетрируя сквозь толщу экзополисахаридного гликокаликса, фиксировать бактерии на соответствующих рецепторах. Адгезия бактерий может осуществляться и к рецепторам, локализованным в муциновом слое прикрытых другими микроорганизмами (опосредованная адгезия). При этом едва уловимые изменения в рецептор-связывающем участке адгезина могут оказать значительное влияние на тропизм адгезирующего микроба. Своеобразие рецепторов детерминировано генетически у каждого индивидуума, о чем свидетель-

ствуется наличие почти полностью идентичной анаэробной и аэробной флоры у однояйцевых, но не у разнояйцевых близнецов человека [15,62].

Существует три варианта методических подходов к изучению *in vitro* адгезии микробных клеток к мишеням. Первый предполагает регистрацию факта взаимодействия клеток с помощью светового микроскопа. Второй включает приемы культивирования для учета жизнеспособных микроорганизмов, прикрепившихся к клеткам-мишеням. Третий предусматривает введение изотопной метки (^3H или ^{18}C) и дальнейший учет связавшихся микробных клеток по этой метке.

В норме, находясь в состоянии динамического равновесия, представители кишечной микрофлоры не оказывают отрицательного влияния на организм. Однако, вследствие различных нарушений (сдвиг иммунологического статуса, приема антибактериальных препаратов, инфекционный процесс, стресс, травма и т.д.) бактерии нормофлоры начинают усиленно размножаться и могут заселять нетипичные для них экологические ниши, становясь причиной аутоинфекций [44,246,270,271]. Перенос интестинальных бактерий через слизистую оболочку кишечника, их прохождение через систему мезентериальных лимфатических узлов и воротной вены печени в органы получил название транслокации [41,90,149,186,270,271]. Термин транслокация впервые появился в 19 веке (С. Edmiston и R. Condom), в 1973 году Затула С.Р. и Резник С.Р. показали, что введенные *per os* *Bacillus subtilis* могут проникать в органы и кровь животных [54]. В 1979 году R. Berg A. Garlington на гнотобиотической модели обнаружили транслокацию индигенной микрофлоры кишечника в мезентериальные лимфатические узлы и другие экстраинтестинальные органы [90]. Позднее, в 1985 году Никитенко В. продемонстрировал транслокацию бактерий из желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) в рану и окружающие ее ткани [41]. Описаны три главные причины, содействующих бактериальной транслокации из ЖКТ: резкое увеличение количества бактерий в ЖКТ, иммунодефицит, повышение проницаемости слизистого барьера кишечника. Из аутофлоры наиболее часто транслоцируется кишечная палочка, протей и энтеробактерии, из транзиторных штаммов – сенная палочка. Следующими в ряду идут грамположительные аэробы. Уровень транслокации облигатных анаэробов очень низок [41,90]. Представители достаточно экологически пластичного вида *E.coli*, попадая из обычного для них биотопа толстого кишечника и илеоцекальной области подвздошной кишки в иные органы (вышележащие отделы кишечного тракта, кровь, урогенитальную и дыхательную систему) рассцениваются как признак кишечного дисбактериоза и симптом внекишечного эшерихиоза [47]. Уровень транслокации грамотрицательной микрофлоры у мышей в ме-

зентериальные узлы увеличивает пероральное введение антибактериальных препаратов, снижающих количество анаэробных бактерий (пенициллин, метронидазол, клиндамицин); антибиотики, снижающие уровень аэробной микрофлоры, напротив уменьшают транслокацию [90,149]. Транслокация происходит более выражено за счет таких факторов, как геморрагический шок, кишечная непроходимость, опухоли, нарушения целостности слизистой кишечника и многих других [90].

Эшерихии способны вызывать диареи (острые кишечные инфекции – ОКИ). Группа патогенов, вызывающая ОКИ, неоднородна и включает в себя несколько подгрупп эшерихий, в том числе энтероинвазивные, энтеротоксигенные, энтеропатогенные, энтероагрегативные и энтерогемоорагические *E.coli*. Все эти варианты ОКИ различаются по патогенезу, клинике и др. Эшерихии могут стать причиной внекишечных инфекций, таких как сепсис, менингит, HUS, UTI и т. д. При UTI кишечная палочка является основным этиологическим фактором, она высеивается у больных в 95 % случаев, часто в микробных ассоциациях (кишечная палочка, стафилококк, протей и др.). Считается, однако, что представители индигенной микрофлоры не могут вызвать инфекционный процесс, даже попав за пределы кишечника, поскольку быстро разрушаются иммунной системой человека, а заболевания вызывают лишь истинные патогены (возбудители ОКИ) и условные патогены [19]. Такая гетерогенность рода *Escherichia* должна очень четко приниматься во внимание при разработке препаратов - ПБ на основе кишечной палочки, поскольку некоторые на первый взгляд желательные характеристики потенциального ПБ могут служить в организме человека фактором патогенности. Например, доказано, что высокоадгезивные варианты штамма *E.coli* - M^H (имеющие высокое связывание с РНКазой В и маннаном) хорошо заселяют кишечник, но при этом представляют собой потенциальных возбудителей заболеваний мочевыделительной системы, преобладающими же штаммами интестинальной ниши были варианты M^L (высокое связывание с РНКазой В и низкое с маннаном) [59].

Потенциальную опасность у лиц с иммунодефицитами могут представлять бактерии рода *Lactobacillus*. Поскольку лактобактерии на сегодняшний день относятся к числу приоритетных для производства ПБ, проблеме их потенциальной безопасности посвящено множество публикаций [80,82,126,147,179,192,218,251]. Лактобактерии разных видов высеваются из инфицированных ран, часто в комплексе с другими микроорганизмами [67,148,229,279], могут обнаруживаться на клапанах сердца при бактериальном эндокардите, высеваются при нефритах, хондритах. Обитающие в ротовой полости лактобактерии могут стать причиной развития парадонтоза и кариеса

[226,246]. Интересен тот факт, что выделенный из крови при бактериемии *Lactobacillus rhamnosus* обладал более высоким уровнем адгезивности, чем фекальные изоляты [73].

Спорным остается вопрос о потенциальной опасности бифидобактерий. Так наиболее широко представленный в кишечнике вид *Bifidobacterium bifidum* по-видимому не представляют опасности в отношении развития аутоинфекций из-за низкого уровня транслокации и патогенности. В опытах по изучению транслокации и защитного действия против инфекции, вызванной *E.coli* O157:H7 доказана безопасность и эффективность *Bifidobacterium longum* [148]. Однако другие виды бифидобактерий (*B. dentium*, *B. adolescentis*) высеваясь при эндокардитах, бактеремиях, местных инфекциях, инфекциях ротовой полости [100].

Другие представители облигатной микрофлоры так же представляют риск развития аутоинфекций. Пропионобактерии (*P. acnes*) могут стать возбудителями угревой сыпи у подростков; пептострептококки – возбудителями гинекологических заболеваний, заболеваний ротовой полости (кариес, гингивит, парадонтоз), абсцессов при хирургических вмешательствах (чаще в челюстно-лицевой хирургии); энтерококки – инфекций толстого кишечника (энтероколитов), инфекций мочевыводящих путей и воспалительных процессов другой локализации, антибиотико-ассоциированной диареи, особенно у детей [82].

Представители факультативной и условно-патогенной флоры, в состоянии индигенного равновесия играющие положительную роль для макроорганизма, при транслокации так же могут становиться причинами инфекций [56]. Бактероиды могут вызывать гнойно-воспалительные процессы различной локализации (гинекологические, стоматологические, раневые инфекции). Стафилококки могут стать причиной воспалительных заболеваний, септических процессов, пищевых отравлений. У детей раннего возраста стафилококковые колиты протекают тяжело и часто осложняются заболеваниями мочевыводящих путей. Патогенные стрептококки могут вызывать подострые и хронические эндокардиты, ангины, заболевания мочеполовых органов, поражения кишечника, сепсис, раневые инфекции, пищевые токсикоинфекции. Бациллы могут спровоцировать гнойно-септические осложнения. *Clostridium perfringens*, продуцируя активный энтеротоксин, способны обусловить развитие пищевой токсикоинфекции, протекающей весьма тяжело. *Clostridium difficile*, провоцируя развитие псевдомембранного колита, могут стать причиной эндогенной инфекции любой локализации. Отмечается их роль в развитии диарейного синдрома у детей, находящихся на искусственном вскармливании, и в генезе антибиотикоассо-

цированных диарей. Грибы рода *Candida* способны вызывать различные кандидозы (стоматит, молочница, уретрит) вплоть до кандидозного сепсиса. В патологии иммунодефицитных состояний большое значение имеют криптококки и аспергиллы. Условнопатогенные бактерии семейства *Enterobacteriaceae* (клебсиеллы, протеи, серрации и др.) обладают высокой способностью к транслокации и могут вызывать внекишечные инфекции различной локализации [56].

Нельзя, однако, рассматривать транслокацию только как следствие иммунной несостоятельности макроорганизма. По мнению некоторых авторов транслокация представляет собой процесс биологически целесообразный, стимулирующий иммунитет не только у теплокровных, но и холоднокровных животных, а так же растений [41,186,204]. С током крови бактерии достигают патологического очага, где локализуются в жизнеспособных тканях, в основном соединительной, костной, вокруг сосудов. В зоне повреждения микробы выделяют широкий набор антибиотиков, протеолитических ферментов, иммуномодуляторов, факторов роста фибробластов, чем способствуют очищению воспаленного очага от некротизированных фрагментов и ускорению регенерации. В своих экспериментах И.Б. Сорокулова с соавт. [54,55] подтвердили, что колибактерин, бифидумбактерин, лактобактерин, бактисубтил при пероральном введении попадают в кровь и органы теплокровных, не вызывая у животных каких-либо патологических изменений, которые могли бы быть обнаружены клиническими, лабораторными, морфологическими и другими методами. Явление органо-тканевой транслокации у всех микроорганизмов, составляющих основу эубиотиков, следует рассматривать в качестве одного из начальных звеньев естественного механизма стимулирования неспецифической резистентности макроорганизма в отношении патогенных и условнопатогенных микроорганизмов [35,55,208,209,211].

Потенциальную опасность нормофлора представляют и в качестве «банка» генов. Опасность при передаче патогенным бактериям представляют гены устойчивости к антибиотикам, ген деградации муцина, гены амилазы и протеазы (ариламидазы), обнаруженные у *L. rhamnosus*, *L. paracasei* и др. штаммов [148,159,191]. Доказана потенциальная способность *Enterococcus faecium* выступать в роли возможного реципиента кластера устойчивости к ванкомицину *vanA*, *vanB*, *vanC* [159]. Если состав микрофлоры у пациентов нарушен вследствие антибиотикотерапии, это свойство энтерококков может привести к диссеминации гена устойчивости. На сегодняшний день основополагающей является концепция о том, что ведущая роль в экспрессии вирулентности принадлежит «островам» и «островкам» патогенности (ОП)

[6,93,125]. ОП представляют собой не стабильные фрагменты ДНК, размерами от 1-10, 10-30, до 200 кв, включающие дискретные гены вирулентности. Эти фрагменты отличаются по содержанию G+C, фланкированы малыми прямыми повторами нуклеотидных последовательностей, связанных с 3' областью tRNA и часто являются местом интеграции фагов. Такие ОП могут нести криптические или функционирующие гены фаговых интеграз, транспозаз или других фрагментов транспозонов и IS-элементов. Известны ОП, несущие гены адгезинов, инвазинов, различного типа токсинов, белков системы секреции III и IV типов, генов лекарственной устойчивости и т.п.. Дрейф ОП между видами патогенных бактерий может привести к тому, что штаммы приобретут несвойственные для них факторы патогенности. Например, свойство вырабатывать шигаподобный токсин (SLT) у энтерогеморрагической кишечной палочкой E.coli O157:H7, возникло, вероятно, путем трансдукции гена шига-токсина от *Shyggella dysenteriae* в энтеропатогенную кишечную палочку.

1.1. Адгезия как первый этап колонизационного процесса

В условиях макроорганизма адгезия бактерий на клетках-мишенях представляет собой многоступенчатый процесс и состоит из нескольких стадий: приближения, неспецифического взаимодействия поверхности микроорганизма и мембран клетки-мишени, сменяющегося специфическим лиганд-рецепторным взаимодействием адгезинов с определенными рецепторами [6,7,94,202,203,255].

Адгезины, представляя собой специфические макромолекулярные комплексы микробных клеток, как правило, входят в состав фимбрий или поверхностных структур клеточной стенки, с помощью которых происходит фиксация бактерии на субстрате клетки-мишени [7,69,106,142,172]. Фимбрии или пили – это филаментозные белковые поверхностные структуры, продуцируемые в основном грамотрицательными микроорганизмами. Детальный анализ профилей ингибирования сахарами, проведенный в опытах по исследованию адгезии, показал, что большинство фимбрий являются связывающимися с углеводами белками, похожими на лектины [59].

Среди семейства Enterobacteriaceae в зависимости от эффекта маннозидов на адгезивное взаимодействие выделяют два основных типа фимбрий: чувствительных к D-маннозе (МЧ) и устойчивых к D-маннозе.

МЧ-фимбрии называют так же общими (common) или фимбриями I типа. Большинство (до 90%) нормальных и патогенных энтеробактерий способно экспрессировать пили I типа [160]. С использованием стандартных сывороток выявлено наличие близкого серологического родства пилей I типа у бактерий родов *Escherichia*, *Klebsi-*

ella, Shigella, в то время как пили бактерий родов Salmonella и Citrobacter составляют другую серологическую группу. Enterobacter, Hafnia, Serratia и Providencia каждый представляют отдельную серологическую группу. Среди кишечных палочек пили I типа обнаруживаются у большинства представителей. Подтверждением чему могут служить недавние опыты с использованием метода ДНК гибридизации; было исследовано 69 штаммов E.coli, и среди них на эталонных праймерах не гибридизовались только 9. Функциональная роль пилей I типа, являющихся наиболее древними и хорошо изученными, тем не менее, до конца не выяснена. В экспериментах с использованием стрептомицинообработанных мышей было показано, что пили I типа не являются определяющим фактором для колонизации бактериями толстого кишечника [175]. В тоже время, показана способность пилей I типа связываться с клетками защитного эпителия и муцинами слюны [144,162]. Полагают, что экспрессия пилей I типа, а так же CFA I является медиатором адгезии к эпителиальным клеткам, но не способствует адгезии к муцину [108,254]. Некоторые авторы полагают, что наличие пилей I типа у эшерихий способствует инфицированию ими мочеполового тракта. Было показано, что бактерии, экспрессирующие пили I типа провоцируют образование рубцов при пиелонефрите, благодаря продукции активных форм кислорода нейтрофилами [59,175]. В механизме повреждающего действия бактерий при пиелонефритах существенную роль играет способность пилей I типа связываться с ламинином, в результате чего может происходить пенетрация бактерий через базальную мембрану в более глубокие слои ткани макроорганизма [59]. Доказана роль пилей I в развитии инфекционных заболеваний различной этиологии. Исследовались штаммы патогенных бактерий, вызывающие гастроинтестинальные инфекции, инфекции мочевыводящего тракта, перитониты, внутрибольничные пневмонии, бронхиты и пневмонии у кур [7,76,147,261,262]. В итоге выяснилось, что пили I типа генотипически и фенотипически не однородны. По способности связывания с бычьей РНКазой В, дрожжевым маннаном, фибронектином плазмы (ФН) и синтетическим пептидом, состоящим из аминокислот, аналогичных первым 30 в фибронектине плазмы, выделяют пять основных типов адгезивности: M^H – характеризуются высоким связыванием с РНКазой В, маннаном и отсутствием связывания с ФН и синтетическим пептидом, M^L – демонстрирует высокое связывание с РНКазой В, низкое с маннаном, отсутствие связывания с ФН и синтетическим пептидом, MF- высокое связывание с РНКазой В, маннаном, умеренное с ФН плазмы, отсутствие связывания с синтетическим пептидом, MFR – умеренно высокое связывание со всеми перечисленными субстратами, MR – характеризуется наличием способности связы-

вать ФН и синтетический пептид по маннозорезистентному типу. В недавно опубликованных работах описан вариант пилий I типа, проявляющий способность связываться с коллагеном IV типа [59].

Наряду с пиями первого типа, важная роль в колонизационном процессе принадлежит маннозорезистентным пиям. По способности вызывать маннозоустойчивую гкмагглютинацию эритроцитов различных видов животных описано достаточно большое количество адгезинов. Показано, что основная роль при колонизации кишечника энтеротоксигенными штаммами принадлежит адгезинам K88, K99, CFA I, CFA II, F41, DR и др. У возбудителей UTI в 90% случаев обнаруживались так называемые Р-фимбрии, а так же S-фимбрии, отвечающие за менингита новорожденных [221,248,261]. Важно отметить, что большинство штаммов патогенных бактерий (особенно кишечной палочки), вызывающих инфекции, реализуют патогенность благодаря наличию нескольких типов фимбрий.

Следует отметить, что некоторые штаммы патогенов демонстрируют нефимбриальную адгезию. Например, энтерогеморрагические кишечные палочки (ЕНЕС), так же как и энтеропатогенные *E. coli* (ЕРЕС) экспрессируют ген *eae*, кодирующий синтез белка наружной мембраны - интимина, изменяющего архитектуру слизистой оболочки кишечника [118,275]. Процесс состоит в том, что бактериальные клетки, вызывая локальное сглаживание микроворсинок, практически вплотную касаются мембраны энтероцитов, под которыми часто образуются пьедесталоподобные структуры. Такой тип адгезии получил название *attaching and effacing* [118]. Кишечные палочки, несущие на своей поверхности афимбриальный адгезин АФА часто ответственны за развитие циститов у детей и взрослых.[221]. Для энтеропатогенных эшерихий характерно чрезвычайно прочное прикрепление к мембране энтероцитов, что позволяет предполагать участие лектиноподобных нефимбриальных адгезинов.

По нефимбриальному типу осуществляется адгезия грамположительных бактерий. Наличие фимбриоподобных структур обнаружено только у бактерий рода *Corynebacterium*. Адгезия грамположительных микроорганизмов осуществляется за счет липотейхоевых кислот (ЛТК), представляющих собой гликолипиды, а так же за счет лектиноподобных структур (GBL и GTFs). Как правило, адгезия грамположительных микробов имеет маннозорезистентную природу, однако, обнаружен и маннозочувствительный тип адгезии [200]. Так, бактерии рода *L.plantarum* в опытах на культуре HT-29 демонстрировали маннозочувствительную адгезию. Ингибирование процесса протеиназой К свидетельствовало о белковой структуре образований на

клеточной поверхности, которые вовлечены в адгезивный процесс с углеводными рецепторами [68].

Условиями, определяющими интенсивность процесса адгезии, следует считать: 1). величину бактериального инокулята; 2). степень вирулентности микроорганизмов; 3). тропность последних к разным тканям и органам хозяина благодаря наличию на поверхности бактерий лигандов (адгезинов), “узнающих” клеточные рецепторы; 4). индивидуальную чувствительность эукариотических клеток, связанную с присутствием мембранных рецепторов, комплементарных лигандам бактерий. Результаты исследования молекулярного строения бактериальных лигандов показали их строго индивидуальную химическую структуру у представителей разных таксономических групп микроорганизмов. Многие факторы такие к примеру, как кожные ожоги могут приводить к увеличению адгезии, что, как правило сопровождается развитием инфекционных процессов. Аналогично оцениваются и хронический алкоголизм, респираторно-кардиоваскулярные заболевания, лейкопения, недоношенность у новорожденных, неправильное питание, хирургическое вмешательство [59].

Важность блокирования процесса адгезии для предотвращения развития инфекционного процесса отмечают многие авторы [91,110,121,122,123,139,277]. Исходя из механизма адгезии, ее можно блокировать либо через угнетение бактериальных адгезинов, либо путём воздействия на рецепторы клеток-мишеней макроорганизма. Из опубликованных данных известно множество субстанций, обладающих способностью блокировать адгезию микроорганизмов. Наиболее изучено блокирование адгезии олигосахариддами – аналогами рецепторов. Так на модели мышей с уроинфекцией, вызванной введением в мочевого пузыря пилюрованных *E.coli* с I типом пилей, показано значительное снижение бактериурии при одновременном введении α -метил –D-маннозида [59]. Доказана эффективность блокирования процесса адгезии с помощью иммуноглобулинов. Так, пассивная иммунизация поликлональными (у крыс) или моноклональными (у мышей) антителами предотвращала развитие у животных восходящей инфекции мочевыводящих путей, вызываемой соответствующими родительскими штаммами *E.coli* [77]. Содержащийся в интестинальном муцине IgA является решающим фактором, обеспечивающим защитное действие муцина против колонизации патогенов [81]. Муцин является эффективным защитным фактором против колонизации патогенов не только в кишечнике. Так фарингиальный муцин препятствует адгезии *S.pneumoniae* к эпителию гортани. Такие вещества, как сурфактанты и амброксол, катализирующие синтез муцина, способны ока-

зывать мощное ингибирующее действие на адгезию патогенных микроорганизмов [72].

Влияние на адгезивный процесс без сомнения оказывают антибиотики в субингибиторных концентрациях [272]. Это было показано при использовании индометацина на модели адгезии клинических штаммов сальмонелл, пенициллина в опытах по адгезии различных штаммов микроорганизмов из рода *Lactobacillus* [14]. Механизм влияния антибиотиков на адгезивные взаимодействия до конца не изучен, - предполагается, что антибактериальные препараты способны изменять гидрофобные свойства клеточной стенки микроба, ответственные за начальные этапы процесса адгезии [10].

Другие субстанции, например, биологически активные вещества из элеутерококка, способны снижать рецепторную функцию эритроцитов; было показано, что через две недели после начала приема препарата элеутерококка цитoadгезия у стафилококка снизилась в среднем на 42.2%, а у кишечной палочки на 45.9% [9].

Брилене ТА [9] в своей работе отмечает, что половые гормоны прогестерон, эстрадион и эстрадиол приводят к изменению адгезивности микроорганизмов, причем под влиянием прогестерона у одних штаммов лактобацилл адгезивность повышалась, у других снижалась, а у третьих менялась незначительно.

Адгезивность микроорганизмов способна изменяться, как правило, в сторону уменьшения, под воздействием физических факторов. Доказана способность низкочастотной звуковой энергии (50 кПа, 200 Гц) снижать адгезивность микроорганизмов ротовой полости, в частности, *Actinomyces* [39,176,252]. Ультразвуковое излучение, КВЧ излучение так же обладает способностью снижать персистентные свойства микроорганизмов, в частности вида *Staphylococcus aureus* [30]. Низкоинтенсивная лазерная терапия, с успехом применяющаяся в различных областях медицины, одним из механизмов действия, по-видимому, имеет способность угнетать персистентные свойства и адгезивность патогенных микроорганизмов. В частности, это способность охарактеризована для энтеробактерий, неферментирующих грамотрицательных энтеробактерий, *S.aureus*, *Ps.aeruginosa* [2], но, к сожалению, - это единственное упоминание о воздействии лазерного излучения на адгезивные свойства микроорганизмов, обнаруженное в доступной нам литературе.

В последнее время большое внимание стало уделяться изучению адгезивных свойств непатогенных бактерий, являющихся представителями нормальной микрофлоры организма или входящих в состав бактериальных препаратов [157]. Это обосновано возможной конкуренцией нормофлоры с патогенами за сайты связывания.

Работы в этом направлении многочисленны и проводятся в течение ряда лет. Так З.М. Андреева с соавт. (1977) в своих экспериментах показала, что добавление шигелл к клеткам тканевой культуры Нер-2, предварительно проинкубированной со штаммами *E.coli* 17 и 776, обладающими выраженной способностью адгезироваться на этих клетках-мишенях, приводит к резкому снижению инфицирования шигеллами эпителиальных клеток. Такое же воздействие наблюдается и *in vivo* при назначении колибактерина. В исследованиях R. Fuller (1979) было показано, что введение лактобацилл с выраженной адгезивностью приводит к значительному снижению числа *E.coli*, колонизировавших кишечник цыплят [131,132]. Показано снижение колонизации энтеропатогенных бактерий клеток линии Сасо-2, предварительно обработанных *Lactobacillus johnsonii* [188]. Бактерии рода *Lactobacillus* способны предотвращать колонизацию влажной эпителии уропатогенами (*Ps.aeruginosa*, *Enterococcus* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *E.coli*) [198], связывание с гликолипидными рецепторами бактерий *Helicobacter pylori* [1,39]. Интерес представляют исследования Tuomola EM (1999), в которых она доказывает снижение адгезии кишечных патогенов, несущих на своей поверхности S-фимбрии, при использовании бактерий из рода *Lactobacillus* [156]. Было показано, что исходный уровень адгезии лактобацилл не имеет принципиального значения для предотвращения адгезии патогенных бактерий. Это обусловлено специфическим механизмом, по которому осуществляется блокирование адгезии— коагрегации с патогенами [253,254]. Впервые такой механизм был описан ранее G. Reid (1988) для уропатогенных микроорганизмов при использовании лактобактерий в качестве протективного и терапевтического средства. Способность блокировать адгезию патогенных бактерий (в частности, *Clostridium perfringens*) к интестинальному муцину показано для *Bifidobacterium lactis* [171]. Ряд работ посвящен использованию ПБ для профилактики и лечения HUS в связи с неэффективностью антибиотикотерапии при этой форме патологии. Предлагается использовать для лечения и профилактики HUS препараты на основе лактобактерий [209,211], а так же бифидобактерий [212], клостридий (*Clostridium butyricum* MIYAIRI 588), *Streptococcus bovis* [249]. В ряду комплексных ПБ создана комбинация из *Streptococcus faecalis*, *Clostridium butyricum* и *Bacillus mesentericus*, исследованная на модели новорожденных крольчат [242]. Doyle с соавт. [120] предложили способ профилактики и лечения инфекций, вызванных *E. coli* O157; для этого использовался изолят кишечных палочек нормальной флоры телят, полученный через 28 дней после заражения *E. coli* O157:H7, такие нормальные кишечные палочки обладали

способностью сокращать количество или элиминировать возбудителя, предупреждая развитие болезни.

Из изложенного очевидно, что блокирование адгезии патогенов целесообразно, тогда как снижение адгезивности нормальной флоры нежелательно; в ряде случаев это может приводить к неблагоприятным последствиям. В частности, антибиотики различных групп обладают способностью снижать адгезивность микроорганизмов, однако, при исследовании их воздействия на патогены (*Salmonella* и уропатогенные *E.coli* - UPEC) и представителей нормофлоры (кишечная палочка, лактобактерии) показано, что последние значительно более сильно подвержены антиадгезивному действию антибиотиков; особенно это касается наиболее распространенной группы β -лактамов. Отсюда очевидна необходимость поиска агентов, способных ингибировать адгезивность патогенов, воздействуя при этом на нормофлору незначительно.

Влияние ферментов ASG и PPO на адгезивные свойства микроорганизмов

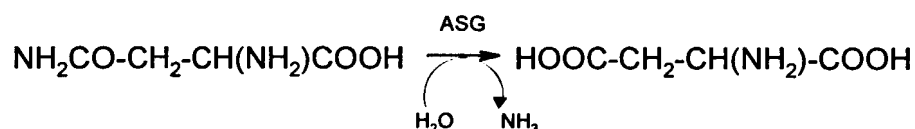
Идея использования ферментов PPO и ASG для ингибирования адгезии микроорганизмов основывается на обобщенных сведениях о пространственной структуре около 200 углевод-связывающих протеинов, в комплексе с их полисахаридными лигандами. Частным случаем таких протеинов можно считать белковые фимбрии микроорганизмов. Известно, что в глюкан-связывающих сайтах чаще всего обнаруживаются остатки аспарагина и одной из ароматических аминокислот (АК) (табл. 4). Кроме того, аспарагин наряду с треонином и серином вообще проявляет физико-химическое сродство к сахарам, именно через эти АК осуществляется связь между углеводной и белковой частью в молекулах гликопротеинов (табл. 4). Механизм действия ферментов в этих ситуациях заключается, по-видимому, в их способности воздействовать на АК остатки, в результате чего, во-первых, меняется пространственная структура глюкан-связывающего протеина, а во-вторых, даже без изменения пространственной структуры лектина, АК подвергаются ферментативной модификации (рис. 1) и теряют способность образовывать белково-углеводные связи. На рисунке 1 показано, каким образом ферменты модифицируют остатки аспарагина и тирозина. ASG относится к классу гидролаз и путем дезаминирования и гидратации преобразует аспарагин в L-аспарагиновую кислоту, PPO окисляет фенольное кольцо тирозина до ортохинона, вследствие чего незаряженные гидрофильные АК - остатки приобретают отрицательный заряд и теряют способность связываться с углеводной компонентой рецептора.

Таблица 4

Основные АК, образующие связи с сахарами

	Самая распро- страненная АК в глюкан- связывающих сай- тах	Вторая по распро- страненности АК в глюкан-связывающих сайтах	% аспарагина в глюкан-связывающих сай- тах (в остальных белках около 5%)
Бактерии (N=24)	Asn	Lys	21
Вирусы (N=18)	Asn	Arg	19
Грибы (N=28)	Asn	Tyr	20
Растения (N=40)	Asn	Tyr	12

Аспарагиназа (ASG) (3.5.1.1)



Полифенол оксидаза (тирозиназа) (PPO) (1.10.3.1)

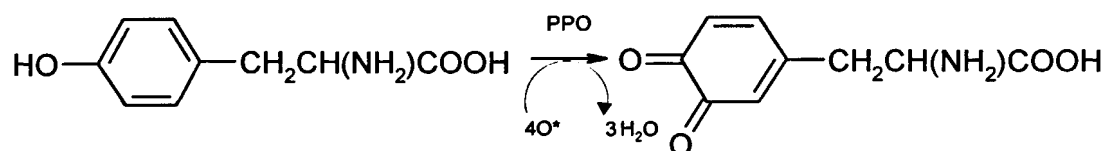


Рис 1. Механизм действия ферментов на аспарагин и тирозин, сопровождающийся изменением структуры и заряда АК

ГЛАВА 3. НАРУШЕНИЯ КОЛОНИЗАЦИОННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ – ДИСБИОЗЫ. МОДЕЛИ ДИСБАКТЕРИОЗОВ.

Факторы, ведущие к нарушениям в составе нормобиоценоза, т.е. к дисбиозам, весьма многочисленны. Видимо, в связи с этим почти 90 % населения нашей страны в той или иной мере страдает дисбиозами, т.е. микробиологическими нарушениями [3]. При этом дисбиоз, как правило, сопряжен с нарушениями в состоянии иммунной системы. Нарушение нормофлоры, состояние иммунного статуса и проявление бо-

лезни следует рассматривать в единстве, причем роль пускового механизма в каждом конкретном случае может принадлежать любому из этих компонентов триады: дисбактериозу, иммунному статусу и болезнетворному агенту. В одних случаях дисбиоз дает толчок развитию патологического процесса непосредственно, в других – через развитие иммунодефицита, в - третьих вызывает эти взаимосвязанные процессы. Дисбактериоз может быть следствием развития иммунодефицитов или сопровождать болезнь и т.д. [4,29,40,44,63].

Дисбактериоз с полным правом можно рассматривать как вяло текущее хроническое заболевание [63].

Микрoэкологическая система человека подвержена воздействию целого ряда самых разнообразных экзогенных факторов. Условия обитания, климатогеографические факторы, применение ксенобиотиков, воздействие химических ядов, радиоактивных веществ, возбудителей кишечных инфекций, пищевые факторы, стрессовые воздействия вызывают те или иные изменения кишечного микробиоценоза.

Избыточное размножение условнопатогенной микрофлоры в тонком кишечнике приводит к подавлению ферментативных реакций, обеспечивающих полостное и пристеночное пищеварение. Нарушение эволюционно сложившихся микробиоценозов пищеварительного тракта может сопровождаться возникновением различных неблагоприятных экологических условий - селекцией антибиотикорезистентных штаммов и штаммов с наличием одного или нескольких факторов патогенности, формированием контингентов лиц с повышенной чувствительностью к инфекционным агентам; развитием таких параклинических состояний как диарея, запоры, синдром нарушения всасывания, а так же клинических поражений (гастриты, язвенная болезнь, коагулопатии, гипо- и гиперхолестеринемия, ревматоидный артрит, мочекаменная болезнь, новообразования толстой кишки и молочных желез, заболевания печени) и т.д. [224]

В последние годы предпринята попытка установления наиболее характерных сдвигов кишечной микрофлоры при различных нозологических формах. Так, при кишечной непроходимости в фекалиях наиболее часто обнаруживаются микробы родов *Bacteroides*, *Clostridium*. Преобладание бактероидов считают наиболее достоверным признаком запоров. Напротив, снижение содержания анаэробов с параллельным нарастанием количества аэробных бактерий чаще встречается при опухолях кишечника, печени и поджелудочной железы. При циррозе печени (реже - при колитах) отмечается увеличение процента обнаружения бактерий рода *Veillonella*, что нехарактерно для других патологий. При кожном зуде S. Dhar et al. и J. Ring et al.

отмечают увеличение количества стафилококков и обсуждают вопрос о роли *S. aureus* в патогенезе атопической экземы, проявление которой исчезали при назначении адекватной антибиотикотерапии эритромицином и клотримазолом.

Изменения в кишечном микробиоценозе являются также характерными для лучевых поражений. При этом наблюдается увеличение обсемененности всех биотопов и изменение соотношения микробных видов внутри ассоциации (уменьшается количество лактобацилл и увеличивается содержание эшерихий и стафилококков в фекалиях), а также увеличивается частота обнаружения штаммов с признаками патогенности и измененными характеристиками; в частности появляются штаммы, устойчивые к антибиотикам [33].

Многочисленные исследования в области микрoэкологии посвящены изучению влияния антибиотиков на нормальную микрофлору кишечника и других биоценозов. Отмечено, что антибиотики даже при парентеральном введении способны экскретироваться через пищеварительный тракт и здесь их концентрация может оказываться бактерицидной для большинства присутствующих там микроорганизмов. Выявлено, что некоторые парентерально вводимые антибиотики вызывают снижение количества грамотрицательных энтеробактерий в толстом кишечнике, стимулируя вместе с тем элиминацию анаэробов и размножение грамположительных микроорганизмов, что, как выяснилось, повышает риск транслокации бактерий.

Пероральное введение иммунодепрессантов так же приводит к развитию дисбактериоза в различных отделах желудочно-кишечного тракта, что описано как в эксперименте, так и в клинике.

В связи со значительным увеличением числа факторов, вызывающих нарушение микробиоценоза кишечника и КР, разработка эффективных методов профилактики и лечения дисбактериозов кишечника различного генеза является одной из важнейших проблем современного здравоохранения. Важное место среди этих методов занимает использование ПБ.

В литературе описаны различные подходы к моделированию дисбактериоза у животных. Помимо гнотобиотических моделей, охарактеризованы дисбактериозы, вызванные голоданием, тотальной кровопотерей, радиационным облучением, введением антибиотиков [5]. В.Г. Лиходеем с соавт. предложена методика интрагастрального введения ампиокса. На этой модели авторами доказано, что введение мышам больших доз ампиокса сопровождается значительным снижением клеточного и гуморального антиэндоксинового иммунитета [28,34,60].

3.1. Инфекции, вызываемые энтерогеморрагическими *Escherichia coli*

Случаи заболевания геморрагическим колитом, часто осложненным HUS регистрируются в течение последних двадцати лет по всему миру. Основой причиной инфекции является кишечная палочка серотипа O157: H7 [127,140,141,177,257]. Этот микроорганизм впервые выделен и описан в 1982 году в США М. А. Karmali [154,185,205,222]. В течение последнего десятилетия прошлого века в мире регистрировалось несколько вспышек геморрагического колита, причиной которых были *Escherichia coli* O157: H7. Так наиболее крупные из них имели место в США (1992-1993, 1999 гг.) [104,232,256], Японии (1995 - 1996 гг.) [145,238,265,266], Шотландии (1996) [11,230], Германии, Австрии (1997) [157,259], Канаде [109] а так же в России (в Приморье и Тульской области) в 1996 г [36]. В Японии и США заболевание приняло характер эпидемии. Случаи спорадических заболеваний геморрагическим колитом распространены повсеместно и могут быть вызваны *E. coli* как серотипа O157: H7, так и серотипов O26 [167], O103 [247], O111 [249], объединенных в группу так называемых *Escherichia coli* non – O157 [258]. Последние три серотипа наиболее часто выделяются у больных геморрагическим колитом в Аргентине, Австралии, Чили [187]. В Германии от детей, больных геморрагическим колитом, выделяли другой серовар – *E. coli* O157: H- [71].

Возбудитель геморрагического колита – *Escherichia coli* O157: H7 (EHEC) представляет собой грамотрицательную подвижную споронеобразующую палочку. Содержание Г+Ц в ДНК 50-51%. Основным фактором патогенности считается экзотоксин [109], обладающий цитотопатическим действием на клетки HeLa, Vero и другие клеточные линии *in vitro* [48,109,154,195]. Большинство сероваров продуцируют детерминируемые интегрированными профагами рибосоминактивирующие протеины (РИП-энзимы): шигаподобный токсин (цитотоксин) I (SLT I, веротоксин I), аналогичный токсину *Shigella dysenteriae* типа I, и (или) шигаподобный токсин (цитотоксин) II (SLT II, веротоксин II) [165]. Эти токсины нарушают в клетках энтероцитов синтез белка, всасывание Na^+ и воды, что приводит к аккумуляции жидкости в подслизистой оболочке. В структуре этих токсинов насчитывают шесть субъединиц: компонент А - фермента с гликозидазной активностью и 5 компонентов В - низкомолекулярного мономера, обуславливающего связывание токсина с гликолипидными рецепторами Gb3, располагающимися на поверхности клеток микроворсинок кишечника, эндотелии кровеносных сосудов, гладкомышечных клеток, эндотелиоцитов почек, а так же эритроцитах, макрофагах и моноцитах [74,129,250,263]. Структура Gb3 рецепторов идентична структуре рецепторов антигена P^k , поэтому

доступность этого антигена обуславливает усиление связывания SLT I и SLT II с эритроцитами [27,92,109,155,193]. SLT II более токсичен. Это обусловлено тем, что он обладает большим, чем SLT I сродством к Gb3 из-за особенностей жирнокислотного компонента данного рецептора. SLT I и II обладают гемолитической активностью *in vitro*, что может использоваться для их идентификации. Способность синтеза веротоксина может передаваться путем трансдукции [48,152]. По данным некоторых исследователей продукция веротоксина (SLT I) имеет плазмидное детерминирование.

ЕНЕС, так же как и ЕРЕС экспрессируют ген *eae*, кодирующий синтез белка наружной мембраны - интимина, изменяющего архитектуру слизистой оболочки кишечника [116,153,275]. Таким типом адгезии не обладают другие *E.coli*. *E.coli* O157:H7 не синтезируют пилий: *fim* кластер присутствует, но дефектен по большому количеству АК, вследствие чего синтеза пилей I типа не происходит. Определенная роль в патогенезе поражений принадлежит эндотоксинам, проявляющим весь спектр активности, характерный для эндотоксинов грамотрицательных бактерий, а так же гемолизинам [50,105]. Предполагают, что их синтез связан с так называемыми островками патогенности (*pathogenicity islet*) [6,93]. *E. coli* O157: H7 способна к продукции колицинов [97,120]. Большинство штаммов несет плазмиду на 1.4 kb более крупную, чем *pColD*, продуктом которой является белок с Mr 87000 (Mr колицина D – 90000). Эти штаммы являются нечувствительными как к собственному колицину, так и к колицину D [97], однако, некоторые ЕНЕС ингибируются под действием других колицинов группы В (G, H, Ia, B), а так же колицинов группы А (E1 – E8, K, N, S4, Mcc B17) [184].

Escherichia coli O157: H7 имеет следующую антигенную структуру: поверхностные липополисахаридные термостабильные О-157 антигены, определяющие серогруппу и жгутиковые термолабильные Н7 антигены.

Заражение происходит алиментарным путем, как правило, при несоблюдении правил гигиены [23,95]. Источниками микроорганизмов являются питьевая вода, немытая картошка, яблочный сок, йогурт, майонез, не пастеризованное молоко, фарш и т. д. [75,86,120,232]. ЕНЕС обладает уникальной кислотоустойчивостью и, как следствие этого, может длительно сохраняться в продуктах питания [49D]. Естественным резервуаром инфекции считается ЖКТ крупного рогатого скота [49D]. ЕНЕС встречается у домашней птицы и собак. ЕНЕС обнаружена у широко распространенной домашней мухи (*Musca domestica*) [143], которая так же может быть источником инфекции для человека тем более, что заражающая доза для *E. coli* O157: H7

невелика (50 – 100 клеток) [256]. Такая низкая для *E. coli* заражающая доза связана с высокой кислотоустойчивостью ЕНЕС (рН 2), что делает малоэффективным кислотный барьер желудка.

Заболевание начинается, как правило, с острой диареи, сопровождающейся спастическими болями, после 3 – 4 - х дневного (по нек. данным от 1 до 10) инкубационного периода [112,140]. Инфекция может перейти в форму геморрагической диареи, при этом установить процент заболевших геморрагической диареей от количества выздоровевших после первой стадии заболевания практически невозможно, т. к. диагностика возбудителя до серотипа на первой стадии, как правило, не проводится [109,199]. Обычно через неделю симптомы исчезают в 95 % случаев. Однако, отдаленные последствия до конца не выяснены, исследования показывают наличие у 15 – 40 % переболевших почечных осложнений [107,128]. У 5 % больных (как правило, у детей младше 5 лет) заболевание приобретает тяжелое течение, появляются такие симптомы, как заворот кишок, опущение почки, HUS (тромбоцитопеническая пурпура) [140]. HUS характеризуется быстрым развитием гемолитической анемии, тромбоцитопенией, острой почечной недостаточностью, а так же расстройствами со стороны ЦНС различной степени (летаргия, судороги, кома) [137,190]. HUS является следствием прямого воздействия веротоксинов на эндотелиальные клетки почек [196], что влечет за собой их разбухание, внутрисосудистое свертывание крови, агрегацию тромбоцитов, механические повреждения эритроцитов и снижение гломерулярной фильтрации [151]. Остается, однако, невыясненным, почему поражаются преимущественно почки, хотя рецепторы для токсинов присутствуют на мембранах эндотелиальных клеток капилляров не только почечных гломерул, но и других органов [51,232]. Снижение содержания кислорода в эритроцитах может так же играть роль в развитии гемолитической анемии [219]. HUS может вызвать такие осложнения, как отек мозга, тяжелый ишемический колит, функциональные расстройства сердечной деятельности и др. [127].

Лечение данной нозологии зависит от стадии болезни: кишечная она (диарея, геморрагический колит) или системная (HUS, пурпура). При этом следует учитывать, что в большинстве случаев заболевание исчезает без сопутствующего лечения, имея симптомами только диарею.

На стадии геморрагического колита лечение проводят по схеме, принятой для острого энтероколита, при этом основным является поддерживающее лечение [32,109], в частности диетотерапия. Традиционное медикаментозное лечение рекомендуется проводить с осторожностью. В случае обезвоживания организма, напри-

мер, при обильном поносе, показано парентеральное введение раствора глюкозы и электролитов; при аллергических реакциях - антигистаминные препараты. Следует обратить внимание на противопоказание в отношении антиперистальтических препаратов, которые не только усиливают дегидратацию тканей, но и увеличивают время пребывания токсинов, в частности веротоксинов, в ЖКТ. Однако в стратегии лечения обычных острых инфекционных колитов и геморрагического колита имеется одно существенное отличие: если в первом случае эффективным является использование антибактериальных средств, таких как сульгин, фталазол, триметоприм+сульфаметоксазол, тетрациклин и др., то в случае геморрагического колита назначение антибиотиков недопустимо [87,166,232]. Это обуславливается рядом причин. Во-первых, при массовой гибели возбудителя происходит резкий выброс эндотоксина, что при сопутствующих неблагоприятных для макроорганизма условиях может вызвать эндотоксический шок [46]. Во-вторых, антибиотики, в частности ампициллин, увеличивают синтез Gb 3 рецепторов на поверхности клеток, связывающих веротоксины, что ведет к ухудшению течения болезни [51] (тот же эффект стимуляции синтеза Gb 3 рецепторов наблюдается и при применении кортикостероидов, иногда назначаемых при обычных острых инфекционных колитах, осложненных аллергическими реакциями [32,181]. В-третьих, в опытах *in vitro* показано, что синтез и/или высвобождение веротоксинов увеличивается после добавления антибиотиков [232,264].

Как правило, энтероколиты, а так же геморрагический колит развиваются на фоне общего снижения сопротивляемости организма, которое во многих случаях является следствием дисбиоза в кишечнике [32]. Об этом свидетельствует тот факт, что геморрагическим колитом болеют в подавляющем большинстве случаев дети до 5 лет и старики, у которых состояние нормофлоры нестабильно (очень велика вероятность дисбактериоза), а так же то, что именно в Японии и США, где чаще, чем в других странах применяют антибиотики, нарушающие КР, заболевание ГК и HUS приобрело характер эпидемии [104,109,145,232]. Эти данные объясняют возросший интерес к группе препаратов - ПБ. В России их стали применять давно [32]. За последние годы разработаны комбинированные и моно- препараты ПБ, а так же предложены пробиотические штаммы, характеризующиеся антагонистическим действием на штаммы *E. coli* O157. Наибольшее число исследователей предлагают использовать для лечения и профилактики HUS препараты на основе лактобактерий [209,211], а так же бифидобактерий [212], клостридий (*Clostridium butyricum* MIYAIRI 588) [244]. Среди комплексных ПБ интересна комбинация из *Streptococcus faecalis*,

Clostridium butyricum и *Bacillus mesentericus*, исследованная на модели новорожденных крольчат [242]. В литературе есть сообщения, касающиеся использования для лечения HUS ПБ на основе *E. coli*. R. Doyle с соавт. [120] предложили способ профилактики и лечения инфекций, вызванных *E. coli* O157, изолятом кишечных палочек нормальной флоры телят, полученным через 28 дней после заражения *E. coli* O157:H7. Изолированные кишечные палочки не были исследованы по классической методике колициночувствительности/ резистентности, однако, R. Doyle делает акцент на том, что, вероятнее всего, штаммы данного изолята обладают способностью вырабатывать какие-либо колицины. Сведений о возможности применения колисодержащих ПБ при HUS у человека в доступной нам литературе не обнаружено. Другой группой новейших средств, используемых для лечения HUS, являются синтетические олигосахаридные рецепторы, способные связывать веротоксины, что делает возможным их применение при HUS, однако, эта группа препаратов находится в стадии изучения [74,127,212]. Для лечения ГК предложены экстракты растений - Аспарагуса [210], *Wasabia japonica* [136], последняя содержит в качестве активного компонента аллилизотиоционат. Некоторые исследователи предлагают для лечения ГК использовать креозот, характеризующийся антитоксическим действием [227].

Лечение HUS включает в себя неотложную регидратацию (per os или внутривенно), однако, следует постоянно следить за электролитным балансом, т. к. у пациентов с HUS часто наблюдается олигурия, что может повлечь за собой гипергидратацию, гипонатриемию и судороги [109]. В случае необходимости показана гемотрансфузия и гемодиализ. Во многих странах используют долговременный (до 14 дней) перитонеальный диализ. Специфическая терапия подразумевает назначение синтетических олигосахаридных рецепторов для веротоксинов [74,127]. Важным аспектом является необходимость наблюдения больного после выписки из больницы, т. к. нередко развиваются осложнения в виде снижения функции почек, расстройства ЦНС и др. [127].

Профилактика HUS в основном сводится к соблюдению санитарно-гигиенических мер [86,120,256]. Специфическая профилактика практически отсутствует, хотя имеются данные о разработке антитоксической вакцины [66]. Вопрос о вакцинопрофилактике кишечных инфекций постоянно обсуждается; известны вакцины против дизентерии [50,214], вакцина против заболеваний, вызванных энтеротоксигенными *E. coli* [214], однако, широкого применения в практике они не нашли [109]. Для профилактики развития HUS рекомендуют применять олигосахаридные рецепторы [127],

креозот [208], а так же композиции, содержащие ПБ [209,211,212,242,244]. Как правило, HUS развивается не сразу и правильное и своевременное лечение ГК предотвращает его появление.

3.2. Урогенитальные инфекции, как следствие дисбиоза

Этиологическими агентами инфекции мочевыводящих путей чаще всего являются условно-патогенные микробы кишечника или кожи, причем в более 95 % случаев это энтеробактерии (преимущественно *E.coli*), патогены вида *Pseudomonas aeruginosa*, энтерококки или (у молодых женщин) *Staphylococcus saprophyticus*, *Candida albicans*, часто выделяются микробные ассоциации (кишечная палочка, стафилококк, протей и др.) [235].

Экстраинтестинальные инфекционно-воспалительные заболевания эшерихиозной этиологии представляют серьезную междисциплинарную медицинскую проблему. Ее острота обусловлена прежде всего тем, что данная патология характеризуется высоким уровнем летальности, риском инвалидности и низкой эффективностью проводимой терапии [19]. Эти обстоятельства делают актуальной задачу расшифровки патогенетических механизмов развития данной патологии с поиском признаков, определяющих патогенный потенциал *E.coli*.

В самом общем виде основные звенья патогенеза включают транслокацию эшерихий из микробиоценоза кишечника в мезентериальные лимфоузлы и через портальную венозную систему в кровеносное русло (так называемый восходящий путь инфицирования). Возникающая при этом бактериемия способствует диссеминации эшерихий в макроорганизме с инфицированием его внутренних органов. Находя там благоприятные условия для своего развития, *E.coli* вызывают альтерацию тканей и инициируют инфекционно-воспалительный процесс. Для макроорганизма негативные последствия транслокации эшерихий наступают только тогда, когда развивается массивная бактериемия, а в процессе бактериальной миграции вовлекаются специфические клоны *E.coli* с комплексом свойств защитной и агрессивной направленности: повышенная серорезистентность, факторы бактериальной персистенции, токсины и т.п. Интересно, что *E.coli* с такими признаками иногда высеваются из кишечника у относительно здоровых людей и часто встречаются в фекалиях у лиц с кишечным дисбактериозом [4,18]. Эти данные свидетельствуют в пользу комменсального характера взаимосвязей потенциальных возбудителей UTI с макроорганизмом, которые при сопутствующих факторах перерастают в инфекционный процесс.

При пиелонефрите из мочи, как правило, выделяется монокультура *E.coli* (в 73,6 %), которая чаще является причиной бактериурии, чем при мочекаменной болезни или аденоме простаты.

В патогенезе UTI большую роль играет адгезия микроорганизмов к слизистой оболочке мочеполового тракта. Адгезивные свойства UPEC интенсивно изучались, что позволило выявить основные адгезины, участвующие в колонизации мочеполового тракта. Выявлены как маннозочувствительные пили I типа, так и семейство маннозорезистентных пилий, включающее в себя P фимбрии, S фимбрии, IC фимбрии, G фимбрии, X фимбрии [261,273]. Основные адгезины UPEC и их тропность к тканям мочеполового тракта приведена в табл.5 [98].

Некоторые авторы отмечают генетическую предрасположенность к UTI. Так, рецидивирующие UTI у пациентов без каких – либо структурных аномалий мочевыводительных путей отмечаются в основном при определенных типах групп крови, что связано с отсутствием экспрессии некоторых групповых антигенов. По-видимому, у данных пациентов рецепторы, ответственные за адгезию, менее защищены или происходит экспрессия других гликофинголипидов [58].

Некоторые заболевания, например, кандидозный стоматит и сахарный диабет резко увеличивали адгезию *E.coli*, экспрессирующих пили I типа, к эпителию мочевыводящих путей [134]. При этом не выявлялось никаких различий в адгезии штаммов *E.coli* без фимбрий и с P-фимбриями. Этот феномен, вероятно, связан с тем, что при заболеваниях происходит снижение антиадгезивных свойств мочи, реализуемых в основном, за счет Tamm-Horsfall протеина (THP), представляющего собой гликопротеин, покрывающий эпителий и секретирующийся в мочу, а так же интерлейкинов. Пили I типа проявляют высокую способность связываться с THP, в меньшей степени это свойственно S фимбриям, P-фимбрии, наиболее типичные для возбудителей UTI, с THP не связываются. Таким образом, THP является мощным защитным фактором против проникновения *E.coli* в мочевыводящую систему, однако, он реализуется лишь для I пилированных и в меньшей степени S-пилированных штаммов [130,178,206,268]. Антиадгезивными свойствами мочи, активными в отношении штаммов *E.coli* с различными типами пилий являются интерлейкины. Их концентрация в моче так же может снижаться при некоторых заболеваниях, например, сахарном диабете, что приводит к развитию инфекционного процесса.

Традиционным методом лечения инфекционных заболеваний мочевыводительной системы служит антибактериальная терапия. Антибиотики помимо бактериоста-

тического или бактерицидного действия обладают способностью снижать адгезивные свойства бактерий к эпителию мочевыделительной системы [276].

Таблица 5.

Опосредование адгезии E.coli к тканям почки, мочевого пузыря, эпителиальными клетками и белками мочи человека.

Сайт связывания	Адгезин				
	S фимбрии	P фимбрии	Пили I типа Почка	Пили IC типа	X фимбрии
Баумановская капсула	+++	+++	-	-	+++
Гломерулы	+++	+++	-	-	-
Проксимальные каналы	++	++	+++	-	+++
Дистальные каналы	++	++	+	++	+++
Мочеточник	++	+	+	++	+++
Стенка сосудов	+++	+++	+++	+++	-
Мочевой пузырь					
Эпителий	++	+	-	-	+
Стенка сосудов	+++	+++	++	+++	-
Мышечный слой	+	+	+++	+	+
Соединительная ткань	++	-	-	-	+++
Моча					
Эпителиальные клетки	+	+	-	-	+
Tamm-Horsfall гликопротеин	++	-	+++	ND	ND
Интерлейкин ИЛ-6	++	++	-	ND	ND
Интерлейкин ИЛ-8	-	-	+++		

Однако применение антимикробных препаратов далеко не всегда ведет к полному выздоровлению, а зачастую и увеличивает время лечения. В большинстве случаев это объясняется снижением функции почек, и как следствие трудностью в подборе дозы антибиотика, отеком ткани пораженного органа, резким угнетением микроциркуляции в очаге воспаления. Неэффективность антибактериальной терапии связана с отрицательными сдвигами в иммунологической реактивности организма. Очень часто сложность подбора антимикробных препаратов связана с появ-

лением резистентной флоры. Заслуживает внимания и тот факт, что применение антибиотиков влечет за собой развитие дисбиозов организма. Так, больные с хронической уроинфекцией характеризуются наличием дисбиотических нарушений микробиологии ЖКТ. Более выраженный дисбаланс микробиологии толстой кишки наблюдается у лиц, страдающих хроническим простатитом, мочекаменной болезнью, осложненной пиелонефритом [52]. Женщины, больные UTI, в большинстве случаев имеют нарушения КР вагины [78,113,220,221]. Всё вышесказанное обосновывает поиск новых методов лечения и профилактики пиелонефрита.

Одним из таких методов, весьма популярных в последнее время, является использование ПБ. В основном показано назначение бактерий рода *Lactobacillus* как перорально, интрауретрально, так и интравагинально. Показана так же эффективность ПБ на основе непатогенного штамма *E.coli* при интравагинальном применении в качестве способа сокращения бактериурии и санации мочевого пузыря от патогенных бактерий [113].

Другим способом, используемым в качестве моно и комбинированной терапии является низкоинтенсивное импульсное лазерное излучение (НИЛИ). Его терапевтическая эффективность доказана за более, чем 15 летнюю практику применения в различных областях медицины. Механизм воздействия НИЛИ комплексный, направленный, в основном на стимуляцию защитных сил макроорганизма. Однако, показано и прямое действие НИЛИ на клетку микроорганизма, заключающееся в ускорении переноса электронов в дыхательной цепи, и ведущее к увеличению интенсивности биохимических процессов. О потенциальном воздействии НИЛИ на адгезивные свойства микроорганизмов данных в доступной нам литературе практически не обнаружено, за исключением одной работы, в которой показано снижение адгезивности энтеробактерий, неферментирующих грамотрицательных энтеробактерий, *S.aureus*, *Ps.aeruginosa* [1,2] под действием НИЛИ.

ГЛАВА 4. ПРОФИЛАКТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ДИСБИОЗОВ

4.1. Использование пробиотиков в терапии дисбиозов

Впервые термин «пробиотик» (ПБ) был предложен в 1965 году D.M. Lilly [164] как антоним антибиотика для обозначения микробных метаболитов, обладающих способностью стимулировать рост микроорганизмов. В 1974 году R.B. Parker [207] использовал этот же термин для обозначения микробных препаратов, обладающих способностью регулировать микробную экологию кишечника, а позднее R. Fuller применил его для обозначения живых индигенных микроорганизмов из группы нор-

мофлоров [131,132]. По поводу терминологии дискуссия велась в течение многих лет, предлагались термины «эубиотики», «симбиотики», «пребиотики» и др., однако, в настоящее время общеупотребительным является лишь понятие «пробиотик». Под ПБ подразумевают вещества микробного или немикробного происхождения, оказывающие при естественном способе введения благоприятные эффекты на физиологические и биохимические функции организма хозяина посредством оптимизации его микрoэкологического статуса [26,61,62]. Впервые для коррекции нарушений микрофлоры Мечниковым И.И. была предложена «простокваша» на основе болгарской палочки. Несколько позже во время первой мировой войны А. Ниссле выделил из кишечника единственного солдата, не заболевшего ОКИ штамм *E.coli*, используемый до настоящего времени в составе препарата «Мутафлор» [45].

ПБ используют для коррекции микрoэкологических нарушений при острых и хронических заболеваниях и дисфункциях желудочно-кишечного тракта, при нарушениях обмена, после антибактериальной, гормональной и лучевой терапии, в дооперационный и послеоперационный периоды и т.д., для коррекции микрофлоры у гинекологических и стоматологических больных, для профилактики и в качестве вспомогательной терапии онкологических заболеваний [65,70,115,156,169,178,182]. Действие ПБ обусловлено, во-первых, их антагонистической активностью против патогенов, реализуемой благодаря продукции антибактериальных веществ, изменению pH среды, как правило в сторону защелачивания, что обеспечивает опосредованное их влияние на ферментативную активность патогенов; во-вторых, благодаря конкуренции с патогенами за рецепторы адгезии; в-третьих, за счет стимуляции иммунитета (стимуляции активности макрофагов, увеличения уровня антител) [131,132,173,228,259,269]. Основные метаболиты нормофлоры и их биологическое действие представлены в табл.6.

Фармацевтические компании широко рекламируют ПБ разного микробного состава и в виде разных лекарственных форм. Это как препараты из живых бактерий, так и природные стимуляторы микробного роста, энзимы, очищенные бактериальные антигены, продукты обмена веществ бактерий. Основные препараты – ПБ изготовленные из живых бактериальных культур. В России в течение длительного времени успешно используют 4 коммерческих бактериальных препарата: бифидобактерин, лактобактерин, колибактерин, бификол [274].

Таблица 6.

Метаболиты молочнокислых бактерий и их регуляторные функции

Механизм действия	Биологический эффект
Молочная кислота (молочнокислые бактерии)	
Синергизм сочетания с уксусной, пропионовой, масляной кислотами. Синтез внутри- и внеклеточного лактоферрина	Ингибирование роста условно-патогенных микроорганизмов. Снижение синтеза токсинов у плесневых грибов корма Ингибирование роста железозависимых бактерий
Углекислый газ	
Поддержание анаэробных условий и высокого парциального давления. Акцептор водорода при биосинтезе ацетата из глюкозы	Снижение дыхательного потенциала у аэробных кишечных бактерий
Перекись водорода	
Способствует образованию гипотиоцината в бактериальных клетках. Повышение лактопероксидазной активности молока и молозива. Истощение ферментной системы у каталазозависящих микроорганизмов. Инактивация клеточных энзимов	Токсическое действие на каталазоположительную микрофлору. Повышению активности колострального иммунитета. Снижение синтеза белков, ограничение передачи генетической информации, снижение факторов адгезии у грамотрицательных бактерий
Лизоцим (грамположительные микроорганизмы)	
Связывание антилизозимного фактора у энтеропатогенных бактерий. Разрушение межклеточных связей у грамотрицательных микроорганизмов. Лизис клеточных стенок грамположительных бактерий	Повышение фагоцитарной активности макрофагов. Снижение колонизационной активности у грамотрицательных бактерий. Неспецифическая стимуляция макрофагального иммунитета
Бактериоцины	
Ограничение синтеза белков Нарушение процессов транспорта через клеточную мембрану, снижение синтеза ДНК, уплотнение ядерного материала, изменение рибосом и лизосом	Бактерицидное и бактериостатическое действие. Сдерживание процессов деления бактериальных клеток, нарушение передачи наследственной информации. Деструкция рецепторных связей. Противоопухолевый эффект

Наиболее известными микроорганизмами, которые используют в качестве основы ПБ, являются лактобациллы. В нашей стране и странах СНГ широкое применение в клинической практике получил лактобактерин, основанный на *Lactobacillus plantarum* или *L. fermentum*. Сообщают об использовании *L. casei*, *L. amylovorus* для производства ПБ. Биопрепараты получают также на основе *L. acidophilus* [84,85,101,150,234].

Fuller [131] отмечает, что современные ПБ из лактобацилл в своем составе содержат и *L. delbreuckii* subsp. *bulgaricus*, *L. brevis*, *L. cellobiosus*, *L. lactis*, *L. reuteri*.

Необходимо подчеркнуть, что лактобациллы применяют не только для коррекции микрофлоры кишечника, но и вагины, для профилактики заселения полости носа новорожденных госпитальными штаммами стафилококка.

Другой группой микроорганизмов, на основе которых базируются производство многих ПБ, являются бифидобактерии. Наиболее часто в состав этих препаратов входят *Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. thermophilum* [171,279].

Эффективность бифидосодержащих ПБ показана как при коррекции микрофлоры у взрослых, так и у детей, в том числе и новорожденных.

Для разработки ПБ используют и другие микроорганизмы. Впервые стрептококки применили как ПБ в виде кислого молока или йогурта. До сих пор штамм *S. salivarius* subsp. *thermophilus* - основа для производства йогурта, является одним из наиболее известных пробиотических культур. Среди изолятов из кишечной микрофлоры применяют штаммы *Streptococcus faecium*. Два из них (M74 и SF68), выделенные из кишечника человека, широко используют в ветеринарии [267]. Некоторые ПБ в своем составе содержат другие виды стрептококков - *S. lactis*, *S. cremoris*, *S. diacetylactis* и *S. intermedius* [132].

Кишечные палочки начали употреблять в качестве основы биопрепаратов еще с 1918 года в составе мутафлора [45]. Эффективность препарата связывали с резким уменьшением образования в кишечнике токсических веществ под влиянием нормализованной кишечной микрофлоры. В СССР для разработки нового ПБ применили штамм *E. coli* M-1, который выращивали на молоке. Так называемая "Колипростокваша" имела короткий срок хранения и поэтому не получила большого распространения. Начиная с 1944 года для изготовления колибактерина применялся шт. *E. coli* M-17, представляющий собой тот же штамм M-1, пассированный автором через кишечник человека. В 1961 году был получен лиофильно высушенный препарат - сухой колибактерин, который по эффективности не уступал жидкой молочной форме. Исходный авторский штамм M-1 продуцировал колицин В и нес латентный фаг. Отсутствие контроля за названными свойствами на протяжении нескольких десятилетий практического применения штамма привело к его генетической перестройке, выразившейся в утрате детерминанты синтеза колицина В и ярко выраженной лизогенности. В.Г. Петровской и Н.В. Давыдовой [46] генетическим методом был получен поликолициногенный вариант *E. coli* M-17, несущий детерминанты колициногенности трех типов: V, В, Е. Сравнительное изучение антагонистической активности показало, что новый вариант обладал несколько более широким спектром активности в отношении энтеропатогенных кишечных палочек (ЭПКП). Результаты, полученные в опытах *in vitro*, свидетельствовали о большой активности поликоли-

циногенного варианта в отношении свежевыделенных культур шигелл по сравнению с исходным штаммом.

Ряд исследователей [43,114] предлагали варианты *E.coli* M-17 как моно- так и полирезистентные к антибиотикам, справедливо полагая, что целесообразность одновременного применения колибактерина с антибиотиками возможна лишь при условии использования в производстве антибиотикоустойчивого штамма. Руководствуясь этим доводом ранее был получен штамм, несущий гибридную плазмиду *pColar*, придающую штамму свойство продуцировать колицин E1 (а так же свойство иммунитета к нему) и резистентность к антибиотикам β -лактамного ряда.

В настоящее время разработаны новые лекарственные формы колибактерина- таблетки, капсулы, свечи [148]. Кишечные палочки являются основой и других препаратов - Нормофлорина, Колифлорана, Севакола, Мутафлора, Нормофлора [42].

Особого внимания заслуживает противоопухолевое действие кишечной палочки. Для лечения и профилактики опухолей разработан отечественный препарат «Окарин». Предпосылкой для его создания именно по такому назначению послужили сведения об изменении структуры фимбрий кишечной палочки под действием опухолевых антигенов таким образом, что бактерии теряют способность связываться и разрушать опухолевые клетки, т.е. теряют свойство, присущее *E.coli* кишечника здорового человека. В России создан эффективный метод ранней диагностики рака с помощью кишечной палочки, который позволяет выявить начало заболевания за полтора года до появления симптомов, а также определить группу риска среди пока здоровых пациентов.

ПБ содержат и другие бактерии, принадлежащие к родам *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Aerococcus*. Сообщают также о применении дрожжей для производства ПБ [163]. Так, лечение препаратом, в состав которого входили *Saccharomyces boulardii*, оказалось эффективным при кишечных инфекциях, обусловленных *Clostridium difficile*. Выраженный клинический эффект получен также при использовании *Saccharomyces cerevisiae*. Следует отметить, что ПБ могут состоять из нескольких штаммов микроорганизмов и содержать как живые культуры, так и инактивированные, а также микробные метаболиты [274].

Таким образом, многочисленные данные литературы свидетельствуют, о достаточной клинической эффективности колибактерина, обусловленной, в основном, антагонистической активностью препарата в отношении ряда патогенных и условно-патогенных бактерий, а так же способностью стимулировать проявления неспеци-

фического и формирование специфического иммунитета. Однако, до настоящего времени отсутствует достаточная ясность, как в представлениях о степени эффективности терапии с помощью ПБ при тех или иных видах патологии, так и в трактовке механизмов ее действия. Остается недостаточно изученным механизм действия ПБ. В связи с этим целесообразно было провести более широкое изучение биологических свойств ПБ с использованием разных моделей для оценки их антагонистических и адгезивных свойств. Также оставалась актуальной задача исследования защитного действия ПБ *in vivo* для раскрытия механизмов их действия.

4.3. Низкоинтенсивное импульсное лазерное излучение (НИЛИ) в терапии инфекционных заболеваний

Первый аппарат лазерной терапии был сертифицирован МЗ СССР в 1974 году. В 1986 году был основан Институт лазерной медицины. К настоящему времени лазерная терапия доказала свою состоятельность в различных областях медицины (табл.7). При ее использовании наблюдалось сокращение сроков лечения и доз принимаемых препаратов [12,57].

НИЛИ представляет собой комплексное воздействие на организм различных видов излучения: импульсного инфракрасного лазерного, пульсирующего красного, а так же постоянного магнитного поля. В основе воздействия лежит лазерное излучение полупроводникового арсенид-гелиевого лазерного диода, имеющего длину волны 890 нм. Используемая в медицине частота повторений лазерных импульсов варьирует от 5 – 50 до 1000 Гц, причем наиболее часто используется частота 1000 Гц [1,57]. Действие лазера на макроорганизм многогранно и включает противовоспалительный компонент, стимуляцию специфического и неспецифического иммунитета, а так же ряд других механизмов (рис. 2). Одним из них, в частности, считают воздействие света на клетку приводящее к ускорению переноса электронов в дыхательной цепи благодаря изменению редокс свойств ее компонентов, вызванных фотовозбуждением электронных состояний. Другим первичным клеточным механизмом, обеспечивающим благоприятное действие НИЛИ, может быть увеличение концентрации O_2^- (и H_2O_2) вследствие активации дыхательной цепи. Изменение редокс потенциала цитоплазмы влечет за собой каскад кратковременных изменений клеточного гомеостаза: увеличение концентрации АТФ, активация $Na^+ - K^+ - АТФазы$, увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и рН, изменение концентраций цАМФ, активация трансмембранных ионных токов, деполяризация клеточной мембраны [22].

На фоне обилия гипотез, объясняющих механизм действия НИЛИ на макроорганизм, до настоящего времени нет четких сведений о влиянии НИЛИ на бактерию. Немногочисленные публикации свидетельствуют об антибактериальном эффекте НИЛИ. Показано снижение хемотаксиса и персистентных свойств *S.aureus* после воздействия на них НИЛИ [31]. Не обнаружено каких-либо сведений о воздействии ЛИ на адгезивные свойства *Escherichia coli* или любых других штаммов, используемых для изготовления ПБ.

Таблица 7.

Эффективность НИЛИ в терапевтической практике [57]

Область медицины	Число больных	Результаты лечения			
		Улучшения		Без эффекта	
		Абс. число	%	Абс. число	%
Кардиология	386	363	94	23	6
Гастроэнтерология	290	278	96	12	4
Пульмонология	364	353	97	11	3
Хирургия	116	108	93	8	7
Ревматология	82	72	88	10	12
Неврология	214	180	84	34	16
Гинекология	90	84	93	6	7
Отоларингология	264	248	94	16	6
Стоматология	180	173	96	7	4
Урология	442	415	94	27	6
Дерматология	76	68	89	8	11
Проктология	102	93	91	9	9

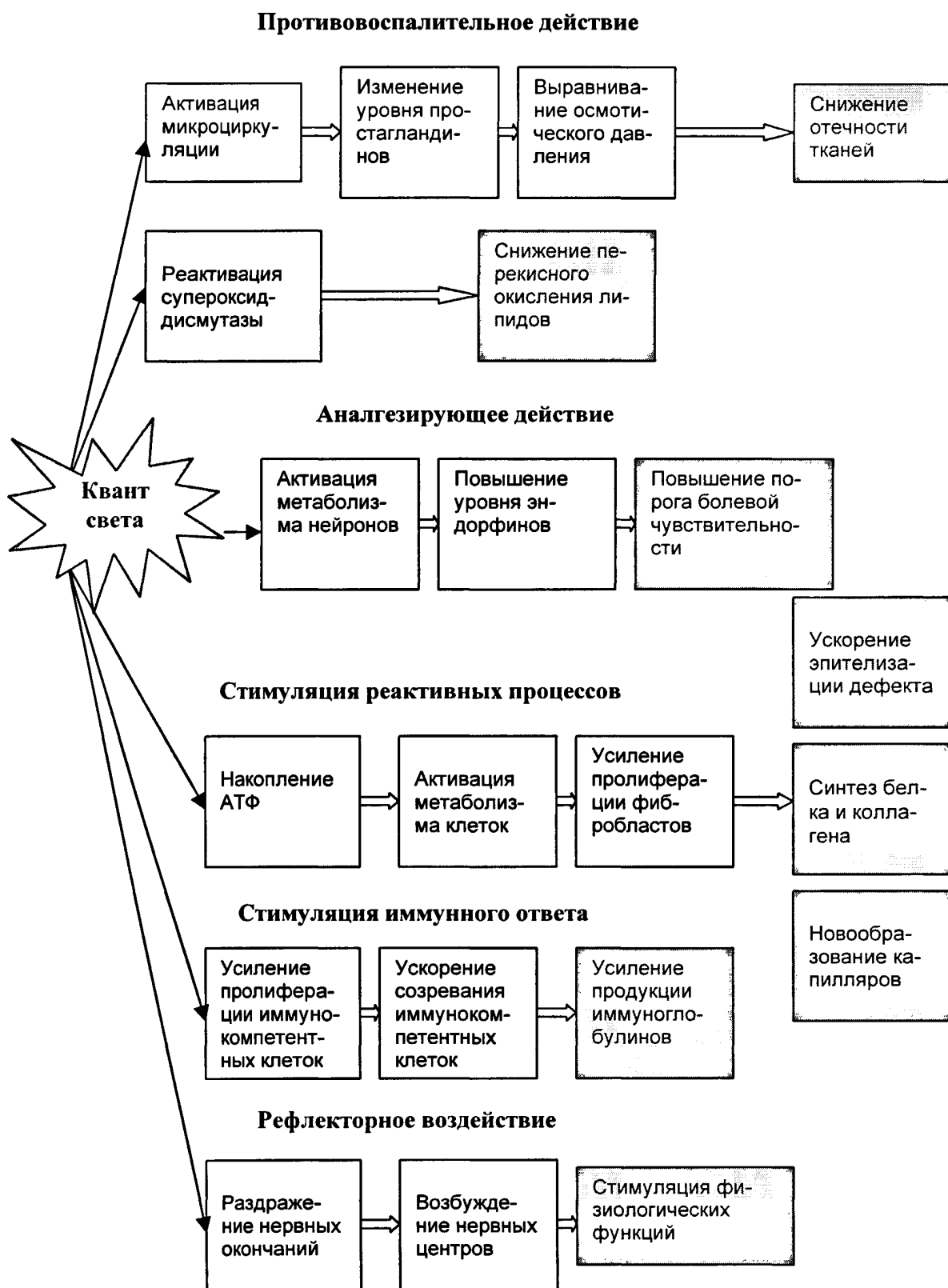


Рис 2. Возможные механизмы терапевтического действия НИЛИ

ЧАСТЬ II. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА I. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1.1. Материалы

Пробиотики (N=11)

Пробиотик	Состав	Примечания
Колибактерин	Лиофильно высушенная биомасса живых бактерий производственного штамма E.coli M-17	Коммерческие серии препаратов, поступившие в ГИСК им. Л.А. Тарасевича на сертификационный контроль
Бификол	Лиофильно высушенная биомасса живых бактерий производственных штаммов Bifidobacterium bifidum I, E.coli M-17	
Бифидумбакте-рин	Лиофильно высушенная биомасса живых бактерий производственных штаммов Bifidobacterium bifidum I	
Окарин	Лиофильно высушенная биомасса живых бактерий производственных штаммов E.coli (Г-35 №1, Г-35 №2, Г-35 №3) Streptococcus faecales (Г-35 №4)	
Биофлор	Суспензия живых клеток производственного штамма E.coli M-17 с добавлением растительных экстрактов (мяты, свеклы, капусты, петрушки, укропа, чеснока, сои), экстракта прополиса и микроэлементы.	
Споровактерин	Лиофильно высушенная биомасса живых бактерий производственного штамма Bacillus subtilis 534	
Бактисубтил	Лиофильно высушенная биомасса живых бактерий производственного штамма Bacillus cereus IP5832	
Бактиспорин	Лиофильно высушенная биомасса живых бактерий производственного штамма Bacillus subtilis 3H	
Биоспорин	Лиофильно высушенная биомасса живых бактерий производственных штаммов Bacillus subtilis 3, Bacillus licheniformis 31	
Лактобактерин	Лиофильно высушенная биомасса живых бактерий производственного штамма Lactobacillus plantarum 8P-3A	
Ацилакт	Лиофильно высушенная биомасса живых бактерий производственного штамма Lactobacillus acidophilus K3 _ш 24, 100 _{аш} , NK1	
Энтерол	Лиофильно высушенная биомасса живых бактерий производственного штамма Saccharomyces cerevisiae	
Lactobacillus fermentum 90-TS-4(21)	Вариант пробиотического штамма Lactobacillus fermentum 90-TS-4	

Клинические штаммы E.coli (N=40)

Штаммы <i>Escherichia coli</i> (n=26)	Источник	Примечания
#225, #58, #807, #723, #306, #804, #391, #681, #407, #395, #310, #727, #714, #393, #731, #629, #89, #155, #380, #788, #836, #368, #549, #88, #311, #307	Выделены от больных пиелонефритом	Выделены и идентифицированы на Кафедре урологии РУДН.
CI#4	Выделен от больного пиелонефритом	
JJP160	Выделен от больного пиелонефритом	Коллекция Е.Сокурено, UW, Seattle
JJC150	Выделен от больного циститом	
NU14 [146]	Выделен от больного пиелонефритом	
F-18	Выделен от больного с кишечной инфекцией	
O157:H7 №10		Из коллекции Х.Ватанабэ, Государственный научно- исследовательский институт инфекционных болезней при Министерстве гигиены и здравоохранения Японии
O157:H7 №2		
O157:H7 №18		
O157:H7 №61	Выделены в период эпидемии 1996 г в различных префектурах Японии от больных геморрагическим колитом и HUS	
O157:H7 №23		
O157:H7 №25		
O157:H7 №212		
O157:H7 №9		
O157:H7 №120		

Рекомбинантные и лабораторные штаммы Escherichia coli (N=8)

Штамм <i>E.coli</i>	Характеристика	Примечания
<i>E.coli</i> W3350	Su gal K, T lac leu::Tn10 Tc ^R	
<i>E.coli</i> S-17-1	pro- thi::RP4 Ap ^R , Km::mu Tc::Tn7 Sm ^R Tp ^R	ГНИИ Генетики и селекции промышленных микроорганизмов
TG1	Δ(lac pro) supE thi- hsdD5 / F' traD36 proA ⁺ B ⁺ - lacI lacZ ДМ15	
AAEC191A/ pPKL114	MG1655 производный recA ΔfimH /pPKL114	Коллекция Е.Сокурено, UW, Seattle
KB53	AAEC191A/ pPKL114/ CI#4fimH	
KB91	AAEC191A/ pPKL114/ F-18 fimH	

Foch AAEC191A/ pPKL114/ fimH- F1C

E. coli M-17

pColap

E. coli M-17

fimH::npt/pColap*

Генноинженерные варианты
пробиотического штамма M-17

Получены на кафедре
микробиологии РУДН

E. coli M-17

fimH::npt*

* данные штаммы лишены исходного адгезивного фенотипа родительского штамма M-17 и имеющие низкоадгезивный фенотип M⁻ [59].

Плазмиды

pPKL9

pBR322fimB, Ap^R

Коллекция Е.Сокурено, UW, Seattle

ColE1

cea⁺imm⁺kil⁺

pUC19

ori из ColE1 lacZ bla Ap^R

ГНИИ Генетики и селекции промышленных
микроорганизмов

pBR322

ori из ColE1, Ap^R Tc^R

pColap

cea-kill из ColE1, bla из
pUC 19

Среды

LB – L-бульон - жидкая питательная среда, выпускается в виде порошка (Difco, USA).

LA – L-агар – твердая питательная среда, содержит LB + 1,5% (m/m) агар (Bacto-Agar, Difco, USA).

LA_B – верхний L-агар, полужидкая питательная среда, содержит LB + 0,8% (m/m) агар (Bacto-Agar, Difco, USA).

Эндо – элективная питательная среда для культивирования энтеробактерий.

MRS - Lactobacilli Man-Rogosa-Sharp – жидкая питательная среда для выращивания лактобацилл (Sigma[®]).

МПБ/ МПА – мясо-пептонный бульон/ агар.

Среда Гаузе – среда для культивирования споровых бактерий.

MPC IV – твердая питательная среда для выделения и культивирования молочнокислых бактерий.

Среда Блаурокка с азидом натрия – полужидкая питательная среда для выделения бифидобактерий.

Тиогликолевая среда - полужидкая питательная среда для выделения анаэробных бактерий.

Энтерококковый агар — твердая питательная среда для выделения энтерококков.

ЦПХ – агар – твердая питательная среда для выделения синегнойной палочки.

Среда Вильсона-Блэра – твердая питательная среда для выделения клостридий.

Агар с мочевиной - твердая питательная среда для выделения протея.

Агар Сабуро - твердая питательная среда для выделения грибов.

Солевой агар (желточно-солевой агар) – твердая питательная среда для выделения стафилококков.

Антибиотики:

Ампициллин – 5 – 1000 мкг/мл («Sigma Chemical Co.», St.Louis, Mo., USA);

Канамицин - 5 – 100 мкг/мл («Sigma Chemical Co.», St.Louis, Mo., USA),

Ампиокс - 4 мг/сутки («Брынцалов А.», Россия);

Доксициклин – 0,2 мг/сутки («Polfa Tarchomin» S.A.);

Ферменты (Sigma Aldridge, USA):

L-Аспарагиназа (3.5.1.1) – 0,3 – 120,0 ЕД/мл, 1ЕД соответствует 8 мкг;

Полифенол Оксидаза (1.10.3.1) – 17,5 – 1128,0 ЕД/мл, 1 ЕД соответствует 0,5 мкг;

Пероксидаза хрена - 20 мг/мл.

Эндонуклеазы рестрикции BspLU 11.I, Alw 441.

Красители

Набор для окраски по Граму,

Краситель (концентрат) для окраски по Романовскому-Гимзе.

Прочие вещества, буферные растворы и наборы, используемые в работе

Стандартный набор для выделения ДНК - mini-QIAGEN (Germany-USA),

Фосфатно-солевой буфер (ФСБ) – 0.1 М, pH=7.4,

Фосфатный буфер (ФС) – 0.1 М, pH=7.0,

БСА-ФСБ – 0,2 % раствор БСА в ФСБ,

ЭДТА - 10 mM ,

Раствор глюкозы - 50 mM,

Раствор Трис HCl - 50 mM pH 8.0,
 PEG 6000,
 Раствор SDS – 1%,
 Лизоцим,
 Натрия гидроокись – 0.2 N,
 Калия ацетат – 3M pH=4.8,
 Аммония ацетат – 7.5 M,
 Бромистый этидий ч.д.а.,
 Агароза ч.д.а.,
 Эфир для наркоза.

Эукариотические клетки и субстраты для исследования адгезии

Клетки защечного эпителия человека – донорские,
 Эритроциты человека B/II Rh+ - донорские нативные и формализированные,
 РНКазы В (бычья панкреатическая) (*Sigma Aldridge, USA*),
 Маннан (дрожжевой) (*Sigma Aldridge, USA*),
 BSA (бычий сывороточный альбумин) (*Sigma Aldridge, USA*),
 б – метилмономаннопиранозид (б-ММП)

Животные:

Беспородные обоеполые мыши весом 10-15 г., n=500 штук.
 Мыши линии C57 Bl самцы, весом 10-15 г., n=80 штук.

Аппараты и оборудование

Аппарат НИЛИ системы РИКТА (ПКП ГИТ МЭИ),
 Автоматический ридер микропланшет (Molecular Devices. Inc., Menlo Park, Calif.).
 Инкубатор (37 °C) с ротационным ридером для микропланшет,
 Аппарат для электрофореза в агарозном геле,
 Счетчик для учета ³H –тимидина и сцинтиллятор,
 Центрифуга и микроцентрифуга (для эппендорфовских пробирок),
 Фотозлектроколориметр,
 Термостат – 37 °C
 Анаэроостат,
 Микроскоп световой,
 Камера Горяева.

2. Методы

2.1. Идентификация бактерий

Идентификация микроорганизмов осуществляли на основе изучения морфолого-культуральных и физиолого-биохимических свойств общепринятыми методами [89].

2.2. Методы исследования бактериальной адгезии

2.2.1. Тест агрегации дрожжей

1. Готовят суспензию сухих пекарских дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) в ФСБ (фосфатно-солевой буфер) (0,1М, pH=7.5) в концентрации 10 мг/мл. Дрожжи отмываются 2 раза 0.2% раствором БСА в ФСБ (БСА-ФСБ) при температуре 20°C и 1000 об./мин.

2. Культура исследуемого штамма после 18 часовой инкубации при температуре 37°C в среде LB без аэрации отмывается ФСБ 2-3 раза, готовится суспензия клеток с концентрацией 10^9 клеток/мл, что соответствует оптической плотности $OD_{530} = 1,0$. Все операции следует проводить при охлаждении (на льду).

3. Планшеты для микротитрования с U –образным дном (Nunc. Inc., Naperville, Ill., USA) при комнатной температуре предварительно обрабатывают путем добавления 0,1 % БСА-ФСБ для уменьшения неспецифического связывания (в течение 30 мин раствор оставляют в лунках). Затем делают последовательные разведения суспензии *E.coli* в лунках, добавляют БСА-ФСБ или БСА-ФСБ с 1% 6-метилманнопиранозидом (конечная концентрация) и смешивают с суспензией дрожжевых клеток. Агрегацию наблюдают визуально через 1-30 мин после момента добавления дрожжевых клеток, титр замечают как последнее разведение, дающее позитивную реакцию агрегации.

Способность агрегировать пекарские дрожжи по маннозо-чувствительному типу характерна для штаммов, экспрессирующий пили I типа [59].

2.2.2. Тест «исследование адгезии к иммобилизованным субстратам» (Growth assay)

Данный метод позволяет получить не только качественные, но и количественные показатели оценки адгезии к различным субстратам [239].

Тест проводят следующим образом:

1. Лунки планшета для микротитрования с плоским дном (Nunc) покрываются молекулами субстратов (рецепторов для адгезина пилей 1 типа) в 0,2 М растворе

NaHCO_3 (~ 100 мкл 10-20 мкг/мл). Выдерживается около 30 мин при температуре 37°C.

2. Затем не связавшийся субстрат отмывается ФСБ 2 раза, и неспецифическое связывание блокируется 0,1% раствором БСА-ФСБ (150 мкл, инкубируют около 30 мин при 37 °C)

3. После инкубирования в одни лунки добавляют 50 мкл 0,2 % БСА-ФСБ, в другие - 2% раствор б-метилманнопиранозида в 0,1% БСА-ФСБ, затем во все лунки добавляют 50 мкл бактериальной суспензии (приготовленной по описанной в пункте 1 методике) и инкубируют 40 минут при 37 °C.

4. Не связавшиеся клетки отмывают ФСБ 6 раз, в лунки добавляют питательную среду ВНІ, планшеты инкубируют при 37 °C с ротационным вращением в течение 2,5 – 3,0 часов. Оптическая плотность в каждой лунке учитывается на автоматическом ридере микропланшет (Molecular Devices. Inc., Menlo Park, Calif.).

В качестве субстратов использовались следующие вещества: маннан из *Saccharomyces cerevisiae* и бычья панкреатическая РНКазА.

2.2.3. Обогащение культур микроорганизмов клетками, экспрессирующими пили I типа

Для проведения исследований адгезивности для большей выраженности результатов производили обогащение бактериальной культуры клетками, экспрессирующими пили I типа. Данный результат достигался путем коррекции регуляции пилирования [239]. Исследуемый штамм трансформировался плазмидами rPKL9 или rPKL91, содержащими ген *fimB*, включающий экспрессию пилий бактериями. Трансформация проводилась по стандартной методике проведения кальциевой трансформации (см. ниже). Наличие дополнительной копии этого гена обуславливает 100 % клеток трансформированного штамма в «+» фазе пилирования. Адгезивность диких штаммов и штаммов, трансформированных *fimB* – содержащими плазмидами коррелирует ($r=0.931$; $P=0.0001$).

2.2.4. Радионуклеидное исследование адгезии

Все этапы исследования до стадии добавления в лунки питательной среды проводятся как в тесте «исследование роста». Имеются два основных отличия:

- в тесте используются специальные 8- или 16- луночные стрипы с плоским дном для радиоиммунных исследований (Nunc. Inc., Roskilde, Denmark),

- при посеве бактериальной культуры в среду добавляют ^3H – тимидин.

Вместо добавления жидкой питательной среды (как в тесте «исследование роста») стрипы разламываются на отдельные лунки и закладываются в специальные сцинтилляционные флаконы (Nunc). Затем во флаконы заливается сцинтилляционная жидкость Aquasol-2 (Packard Instrument Co., Inc., USA) в объеме 15-20 мл (так, чтобы лунки были полностью покрыты слоем жидкости), при этом из лунок изгоняются все пузырьки воздуха. В качестве контроля используются лунки без добавленных бактерий. Радиоактивность измеряется на приборе Tri-Carb 460 C (Packard Instrument Co., Inc., USA).

Данный метод более трудоемок, чем описанный выше тест «исследование роста», но он менее подвержен влиянию на результаты посторонних факторов, поэтому для экспериментов, в которых важна точность количественной оценки адгезивной активности используется данный метод (188 вер).

2.2.5. Формалинизация эритроцитов

Донарскую кровь группы В/II (Rh+) отмывали ФСБ 4 раза при 1000-1500 об./10 мин. Затем готовили 8 % суспензию эритроцитов. Добавляли равный объем 3 % раствора формалина.

Выдерживали при 37 °С, периодически встряхивая 18±3 часов.

После этого снова отмывали эритроциты ФСБ 3 раза, готовили 50% суспензию, содержащую 0.3 % формалина.

Приготовленные таким образом эритроциты могут храниться в течение 1 года.

2.2.6. Исследование адгезии к эритроцитам

Адгезивность штаммов изучали в системе in vitro на формализированных эритроцитах человека В/II (Rh+) по методике В.Брилиса [11] в модификации [23,24,25].

Использовали 18 часовые культуры микроорганизмов, выращенные на LB (штаммы Escherichia coli) и MRS (штамм Lactobacillus fermentum) бульонах при температуре 37°С в стационарных условиях и отмытые от среды выращивания буферными растворами (ФСБ или ФБ) 2 раза по 10 мин при 1500 об/мин. Штаммы, входящие в пробиотики, при проведения опытов подготавливали из лиофильновысушенного состояния, т.е. без подращивания культур, т.к. ранее было доказано, что процесс лиофилизации пробиотика не оказывает влияния на адгезивную активность [42].

Препараты отмывались ФСБ от среды высушивания в тех же условиях. В опыте использовали бактерии в концентрации 2×10^9 КОЕ/ мл, эритроциты в концентрации 2×10^8 клеток/ мл. Подсчет концентрации эритроцитов производили в камере Горяева под световым микроскопом. Концентрацию суспензии микробных клеток определяли по оптической плотности $OD_{530} = 1,0$ или по ОСО стандарту мутности №10 (ГИСК им. Л.А. Тарасевича). Затем смешивали по 0,5 мл суспензии эритроцитов и микробных клеток, инкубировали в течение 45 минут при температуре 37°C , периодически встряхивая.

Делали мазки по типу кровяных. Окрашивали по Граму или по Романовскому-Гимза. Определяли количество бактерий, прикрепившихся к одному эритроциту. Производили подсчет не менее 100 эритроцитов в не менее чем в 5 полях зрения. Определяли средний показатель адгезии, коэффициент адгезии.

Средний показатель адгезии (СПА) определяли по среднему числу микробов, прилипших к поверхности одного эритроцита, подсчитывая все имеющиеся эритроциты в 5 полях зрения, но не менее 50 эритроцитов. Из общего числа учитываемых эритроцитов вычисляли процент эритроцитов (К %), имеющих на своих поверхностях прилипшие микробы.

2.2.7. Исследование адгезии микроорганизмов к клеткам защечного эпителия

Клетки защечного эпителия (ЗЭ) получали *ex tempore* от доноров осторожным соскабливанием с внутренней поверхности щеки. Взвесь клеток (ЗЭ) готовили в ФСБ, отмывали 4 раза по 5 мин при 1500 об/мин и готовили суспензию с концентрацией 10^6 клеток/ мл, соответствует $OD_{530} = 0,4$. Бактериальные клетки готовили как описано выше. К бактериальной суспензии добавляли взвесь клеток (ЗЭ) в соотношении 1:3 и инкубировали при температуре 37°C в течение 1 часа, периодически встряхивая. По окончании инкубации клетки ЗЭ отмывали ФСБ 5 раз по 10 мин при низких оборотах (около 800 об/мин). Делали мазки по типу кровяных, фиксировали 96% этанолом и окрашивали генцианвиолетом или по Романовскому-Гимза. Подсчитывали не менее 50 клеток в 5 полях зрения. Определяли СПА как среднее количество микроорганизмов на 1 клетку ЗЭ. Из общего числа учитываемых клеток ЗЭ вычисляли процент клеток (К %), имеющих на своих поверхностях прилипшие микробы [53].

2.2.8. Исследование связывание протеина *FimH* с пероксидазой хрена

Лунки планшета для микротитрования с плоским дном (Nunc) покрываются молекулами

протеина *FimH*, использовалась концентрация 20 мг/мл в растворе 0,2M NaHCO₃ (*FimH* домен был получен как описано у M.Schembri et al. [236]. Затем в каждый второй ряд добавлялся б-ММП и/или фермент. После отмыwania ФСБ 6 раз добавлялся конъюгат (с пероксидазой хрена HRP) в разведении 1/500. Испытывались различные концентрации конъюгата (от 1/10000 до 1/10), однако оптимальной оказалась концентрация 1/500. Затем добавлялся субстрат-хромоген для пероксидазы хрена. Результаты оценивали, измеряя интенсивность окрашивания на ФЭКе.

2.2.9. Обработка ферментами ASG и PPO

Ферменты PPO и ASG хранили в виде стоковых растворов в Tris·HCl (50 mM) в концентрации 1 мг/мл. Обработку ферментами культур микроорганизмов и эритроцитов проводили в среде ФСБ (pH=7.4) при обработке ASG или ФБ (pH=7.0) при обработке PPO. Инкубацию проводили в стационарных условиях при 37 °C в течение 45 минут. Затем клетки отмывали от фермента ФСБ 2 раза при 1500 об/мин для культур микроорганизмов и при 800 об/мин для эритроцитов.

2.2.10. Обработка НИЛИ

Лазерную экспозицию бактериальных культур проводили в течение 1 мин и 10 мин при частоте 1000 Гц в объеме 2.5 мл, эритроцитов - в объеме 2.5 мл в условиях 1000 Гц 10 мин. Затем исследовали адгезию так, как описано выше. При комплексной обработке в последовательности фермент – лазер перед лазерной обработкой культура отмывалась от фермента ФСБ 2 раза при 1500 об/мин.

2.3. Определение антагонистической активности методом отсроченного антагонизма

На подсушенные чашки Петри со средой Гаузе №2 по диаметру петлей 3,5±0,5 мм высевали штрихом пробиотик (препарат растворяли 1 мл 0,9 %-ром NaCl на 1 дозу или таблетку). Посевы инкубировали в термостате при (37±1) °C в течение 72 ч.

Затем отступив на 1 мм от выросшей культуры, перпендикулярным штрихом подсеивали тест-штаммы. Учет результатов проводили через 18 ч инкубирования при

(37 ± 1) °C по величине зон угнетения роста тест-штаммов (измеряя эти зоны линейкой: от испытуемой культуры до начала роста тест-культур в мм). Контролем роста тест-культур служат их параллельный посев штрихом на чашки с той же средой.

2.4. Моделирование дисбактериоза у животных

Дисбактериоз у мышей вызывали путем перорального введения через жесткий зонд доксицилина (0,2 мг/сутки в течение 1 суток) или ампиокса (4 мг/сутки в течение 14 суток) по методике, описанной Лиходедом В.Г. [34]. Исследование микрофлоры проводили на 10 сутки через 1,5-3 часа после введения антибиотика. Результат введения антибиотиков оценивали по изменению состава фекальной микрофлоры. Для этого производили посевы на следующие среды: МПА (широкий спектр микроорганизмов), Эндо (кишечная палочка, протей), МРС IV (лактобактерии, молочнокислые стрептококки), среда Блаурокка с азидом натрия или тиогликолевая среда с азидом натрия (бифидобактерии, азид натрия добавляют, чтобы исключить рост грам-отрицательной флоры), энтерококковый агар (энтерококки), ЦПХ – агар (синегнойная палочка), среда Вильсона-Блэра (клостридии), агар с мочевиной (протей), агар Сабуро (грибы), солевой (желточно-солевой) агар (стафилококки). Для оценки количественного состава микрофлоры использовалась методика, предложенная И.А. Бочковым с соавторами [8]. Метод проводится по следующей схеме:

- a) Готовится точная навеска образца фекалий. Образцы разводятся 1% пептонной водой в соотношении 1:10.
- b) Готовят ряд последовательных 10-кратных разведений в 1% пептонной воде с добавлением 0.1% агара.
- c) Материал из полученных разведений засевают на поверхность ряда подсушенных селективных питательных сред в виде трех изолированных капель (можно ограничиться высевом 1 капли каждого разведения, но производить подсчет только тех капель, где число колоний более 5). На одну чашку возможно поместить до 12 изолированных капель.
подсчет числа колоний проводится в каплях, где получен рост отдельных колоний. При этом объем одной капли составлял 25 мl.
- d) число микроорганизмов в 1 г фекалий определяли по формуле:

$$X = a \cdot 1/p \cdot 4 \cdot 10^n$$

a – число колоний в капле;

p – номер разведения;

4 – коэффициент пересчета;

p – навеска фекалий.

2.5. Исследование транслокации кишечной флоры в органы и ткани

Объектом для изучения транслокации служили мыши линии С 57В1. Животные были поделены на две группы: интактные животные (получали физ. раствор *per os* 0,5 мл/сутки в течение 10 суток) и животные с дисбактериозом (получали ампиокс *per os* в дозе 4 мг /0,5 мл/ сут в течение 10 суток). Исследовалась транслокация микроорганизмов в следующие органы и ткани: кровь, тимус, селезенка, печень, почки, легкое. Животное усыпляли с помощью эфира для наркоза. Вышеназванные органы извлекали, взвешивали, промывали с помощью физ. раствора, измельчали в стерильной ступке с песком и высевали на чашки со средами: МПА, агар Эндо, МРС V. Подсчитывали число колоний и пересчитывали на грамм органа. Кровь высевали в объеме 0,1 мл без разведения.

2.6. Методы работы с ДНК

2.6.1. Выделение плазмидной ДНК

Для выделения плазмидной ДНК применяли два основных способа. Во-первых использовали стандартный набор mini-QIAGEN (Germany-USA), приспособленный для выделения ДНК из 2 – 20 мл культуры.

Во-вторых пользовались стандартной методикой [37,79] выделения плазмидной ДНК с использованием PEG. Плазмидную ДНК выделяют обычно из 1-10 мл свежей 12 часовой культуры. Клетки осаждают центрифугированием 5 минут при 10-12 тыс. об/мин, затем ресуспендируют в 200 мкл раствора А (50 mM глюкоза, 10 mM ЭДТА, 50 mM Трис HCl pH 8,0), при необходимости добавляется лизоцим *q.s.* Смесь перемешивается и выдерживается при комнатной температуре ~ 5 минут. Затем к смеси прибавляют 400 мкл (2V) лизирующего раствора В (0,2 N NaOH, 1% SDS), осторожно перемешивают и оставляют при температуре 0 °C на 10 минут. Затем добавляют 300 мкл (0,5V) нейтрализующего раствора - 3M ацетата калия (pH=4.8) и 1 каплю CHCl₃ для получения более компактного осадка. Оставляют на 30 минут при 0 °C. После центрифугирования 10-12 тыс. об/мин 10 минут отбирают

супернатант и переосаждают плазмидную ДНК путем добавления к раствору 225 мкл PEG 6000, оставляют на 30 минут при 0°C. Затем центрифугируют в тех же условиях и тщательно удаляют супернатант (можно промыть осадок 70% этанолом). Растворяют в 100 мкл воды марки SQ и оставляют на 15 минут при комнатной температуре. Затем проводят очистку от соосадившейся РНК (она присутствует в следовых количествах, так как считается, что PEG сорбирует только ДНК, но не РНК) путем прибавления 200 мкл 7,5 М раствора ацетата аммония. Раствор оставляют на 30 минут при температуре -20 °С. Затем центрифугируют не менее 10 минут. К супернатанту прибавляют 600 мкл 96% этанола и оставляют на 30 минут при температуре -20 °С. Затем центрифугируют, удаляют супернатант, осадок высушивают при комнатной температуре до исчезновения запаха спирта и растворяют в 10-15 мкл воды SQ.

2.6.2. Обработка ДНК

Электрофоретический анализ и разделение фрагментов ДНК проводили стандартным способом [37,79]. Использовали 0,7-0,8% агарозный гель (agarose type II, Sigma) и трис-боратный буфер (0,5N TBE) и электрофоретическая камера (BIO-RAD mini SUBTM DNA cell). В качестве маркера использовали 1 kb ladder, содержащий фрагменты ДНК, различающиеся примерно на 1 тыс. п.о. Электрофорез проводили обычно в течение 1-2 ч при 14 mA и 90 V (Power Supply Model 250 BRL Life Technologies, Inc., Research Products Division). Положение фрагментов ДНК на геле после прокрашивания геля раствором бромистого этидия (1 мкг/мл) в течение 10-20 минут определяли визуально по флуоресценции полос ДНК в геле под UV.

Рестрикцию ДНК производили по стандартной методике [37,79]. Обычно после инкубирования проб ДНК с эндонуклеазой рестрикции фермент инактивировали прогреванием в течение 10 минут при 65 °С.

Лигирование фрагментов ДНК производили по стандартной методике [79]. Для этого сначала фрагменты переосаждали путем добавления 0,1V 3M ацетата натрия (калия) и 2V 96% этанола. Смесь оставляли на 1-2 часа при -20 °С, затем центрифугировали, промывали осадок 70% этанолом 2 раза, затем высушивали осадок как описано выше и растворяли в воде SQ. Лигирование проводили в объеме 25 мкл: 17 мкл фрагмента (lacZ), 1 мкл вектора (ColE1), 2,5 мкл лигазного буфера (66 mM трис HCl, pH 7.6; 6,6 mM MgCl₂; 10 mM DTT), 0,25 мкл БСА, 0,25 мкл

1 mM ATP, 1 мкл лигазы T4, 3 мкл воды SQ. Обычно лигазную смесь оставляли на ночь при комнатной температуре.

Элюирование фрагментов ДНК из агарозного геля осуществлялось с использованием пробирок набора GENECLAN®. В верхнюю пробирку помещается кусок геля с вырезанным фрагментом ДНК. Центрифугируют при 10 тыс. об/мин в течение 10 минут. Содержимое нижней пробирки после центрифугирования обрабатывают смесью фенол:хлороформ (1:1). Водную фазу отбирают и переосаждают 96% этанолом, осадок промывают 70% этанолом, высушивают и растворяют в воде SQ или буфере TE.

Анализ нуклеотидной последовательности ДНК, используемых для конструирования плазмид pCollacZ и ColEДmob, проводили с помощью программы DNA SUN (ГНИИ Генетики).

2.6.3. Методы введения генетического материала в клетку

2.6.3.1. Кальциевая трансформация

Введение ДНК в клетку производили по стандартной [37] методике кальциевой трансформации. Культуры растили не более 20 часов при T=30 °C. После чего 30 мкл культуры помещали в пробирку с 3,0 мл новой среды (LB). Подращивали при T=30°C в течение 1.5-2.0 ч. до OD₅₃₀ = 0.3 – 0.4, разливали по пробиркам и помещали на ледяную баню на 5 мин. Центрифугировали 20 сек. Помещали затем ее на лед на 1 минуту. Супернатант удаляли. Добавляли 750 мкл охлажденного CaCl₂ (70 mM), ресуспендировали аккуратно. Помещали на 30 минут в лед. Центрифугировали в течение 20 минут, супернатант удаляли. Добавляли 100 мкл CaCl₂. Клетки суспендировали. Добавляли ДНК (не более 15 % от объема). Выдерживали 20-40 минут на льду, периодически встряхивая. Heat shock 1.5 мин при 42 °C. Сразу добавляли 500 мкл богатой среды (BHI), оставляли подращиваться на 15-20 мин при 37 °C. Смесь высевали газонм на чашку с селективным агентом (можно предварительно сконцентрировать смесь путем центрифугирования до 100 мкл). В работе проводилась селекция по антибиотику, по колицину E1 и по IPTG/X-Gal. Для селекции по колицину на чашку со средой (МПА или LA) газонм высевалась культура штамма TG1/ColE1, выращивалась в течение 18 часов, затем путем экспозиции в течение 30 секунд под UV, через 3-5 часов культура убивалась с помощью CHCl₃. Для этого чашку Петри переворачивали вверх дном, снимали крышку и клали внутрь фильтровальную бумагу, смоченную 300 мкл CHCl₃

Выдерживали ~ 30 минут. Поверх убитой культуры наслаивали слой агара и оставляли на сутки, чтобы колицин полностью диффундировал в агар. Для селекции по IPTG/X-Gal на каждую чашку добавляли примерно по 40 мкл 2,5% раствора X-Gal в ДМФА и 2,5% раствора IPTG в воде.

2.6.3.2. Конъюгация и мобилизация

Осуществляли по следующей схеме:

- 5 мл среды LB засеивали двумя штаммами (донор и реципиен) и инкубировали в течение 12 часов при 37 °C с аэрацией.
- Готовили следующие смеси:
 - Опыт: 2 мл LB + 0,2 мл культуры донора + 0,2 мл культуры реципиента;
 - Контроль донора: 2 мл LB + 0,2 мл культуры реципиента;
 - Контроль реципиента: 2 мл LB + 0,2 мл культуры реципиента.
- Инкубировали 2 часа при 37 °C с аккуратным вращением.
- При необходимости титровали культуры в стерильном физиологическом растворе.
- Высевали на чашки с селективной средой.

2.7. Оценка продукции колицина и чувствительности бактерий к его действию.

2.7.1. Тест с "верхним" агаром [37]

На чашках с агаром BHI размечают точки, соответствующие количеству исследуемых штаммов, и помещают 2-5 мкл 12 часовой культуры этих штаммов. Количество чашек должно соответствовать количеству тест-культур + контроль. Чашки инкубируют при 37 °C в течение 4-12 часов. Индуцируют продукцию колицина UV- облучением в течение 30 секунд и инкубируют в тех же условиях 3-12 часов. Убивают бактериальные клетки следующим образом: чашку Петри переворачивают вверх дном, снимают крышку и кладут внутрь фильтровальную бумагу, смоченную 300 мкл CHCl_3 . Выдерживают ~ 30 минут. Наслаивают на нижний слой агара 3 –5 мл верхнего 0,7% агара (LA_B), содержащего 10^7 КОЕ/мл тест-штамма. Инкубируют ночь при 37 °C. Регистрируют наличие зон просветления в слое тест-культуры вокруг пятен исследуемых штаммов. Таким способом можно одновременно оценить способность исследуемого штамма продуцировать колицин, а так же чувствительность штамма к колицину.

2.8. Методы статистической обработки результатов исследований

Статистическую обработку полученных результатов проводили по общепринятой методике вариационной статистики, вычисляя среднее арифметическое M , среднюю ошибку среднего арифметического m , среднюю ошибку разности и доверительный коэффициент; достоверность различий полученных значений определяли по критерию Стьюдента [135].

ГЛАВА 2. ПОЛУЧЕНИЕ ГЕННОИНЖЕНЕРНЫХ ВАРИАНТОВ ШТАММА *E.coli* M17

2.1. конструирование плазмид ColДmob и pCollacZ

В работе использован штамм *E.coli* M17 и его низкоадгезивный вариант *E.coli* M-17 *fimH::npt*, охарактеризованный Чесноковой В.Л. (1998) в качестве более подходящего для колонизации кишечника. Штаммам было придано свойство колициногенности с целью усиления их антагонистической активности. Колициногенность изначально была присуща пробиоту *E.coli* M-17, однако, в процессе культивирования была утрачена. Возможное объяснение этому – наличие в плазмиде ColE1 области *mob*, определяющей способность плазмиды к коинтеграции с другими, в том числе конъюгативными плазмидами. В результате коинтеграции образуются гибридные плазмиды, которые, с одной стороны несут фактор колициногенности (*cea*) и устойчивости к нему (*imm*), с другой - содержат область *tra*, определяющую способность к конъюгативному переносу. Результатом конъюгативного переноса может быть, во-первых, приобретение другими бактериями, в том числе патогенными и условно патогенными, способности к синтезу колицина и иммунитета к нему, а во-вторых, потеря плазмиды и вследствие этого снижение антагонистической активности штамма – пробиотика. Таким образом, целью работы было получение колициногенной плазмиды, лишенной *mob* области. Для создания такой плазмиды, способной стабильно сохраняться в пробиотических штаммах *E.coli*, было использовано два подхода:

- удаление *mob* области родительской плазмиды ColE1 с помощью эндонуклеазы рестрикции BspLU11.I и лигирования полученных липких концов друг на друга;
- удаление *mob* области плазмиды ColE1 и вставка гена *lacZ* из плазмиды pUC19. Таким образом, получены две плазмиды, обозначенные как pCollacZ и ColДmob (рис. 3, рис. 4).

Участок ColE1, удаляемый при такой стратегии, содержит почти полностью всю область мобилизации вместе с локусом *bot*, оставляя лишь ген *mbe8*, не существенный для мобилизации плазмиды [96], при этом удаляется так же локус *gom*, что должно привести к увеличению копияности плазмиды. Конструирование плазмид провели как указано на схеме (рис. 3), пользуясь стандартными

методиками работы с ДНК (последовательные операции выделения плазмидной ДНК, рестрикции, электрофореза в агарозном геле, элюирование ДНК, лигирования и кальциевой трансформации клеток штамма TG1 лигированной смесью). Было отобрано 4 клона трансформантов штамма TG1, содержащих плазмиду pCollacZ и удовлетворяющих ожидаемым свойствам (продукция колицина, галактозидазная активность), и 5 клонов, содержащих плазмиду ColДmob (обладающих свойством продукции колицина). Трансформированные клетки содержали плазмидную ДНК. Последующий анализ фрагментов ДНК, полученных при обработке плазмидной ДНК определенными эндонуклеазами рестрикции, позволил определить структуру плазмид и ориентацию гена *lacZ* в плазмиде pCollacZ (рис. 5, и табл. 12).

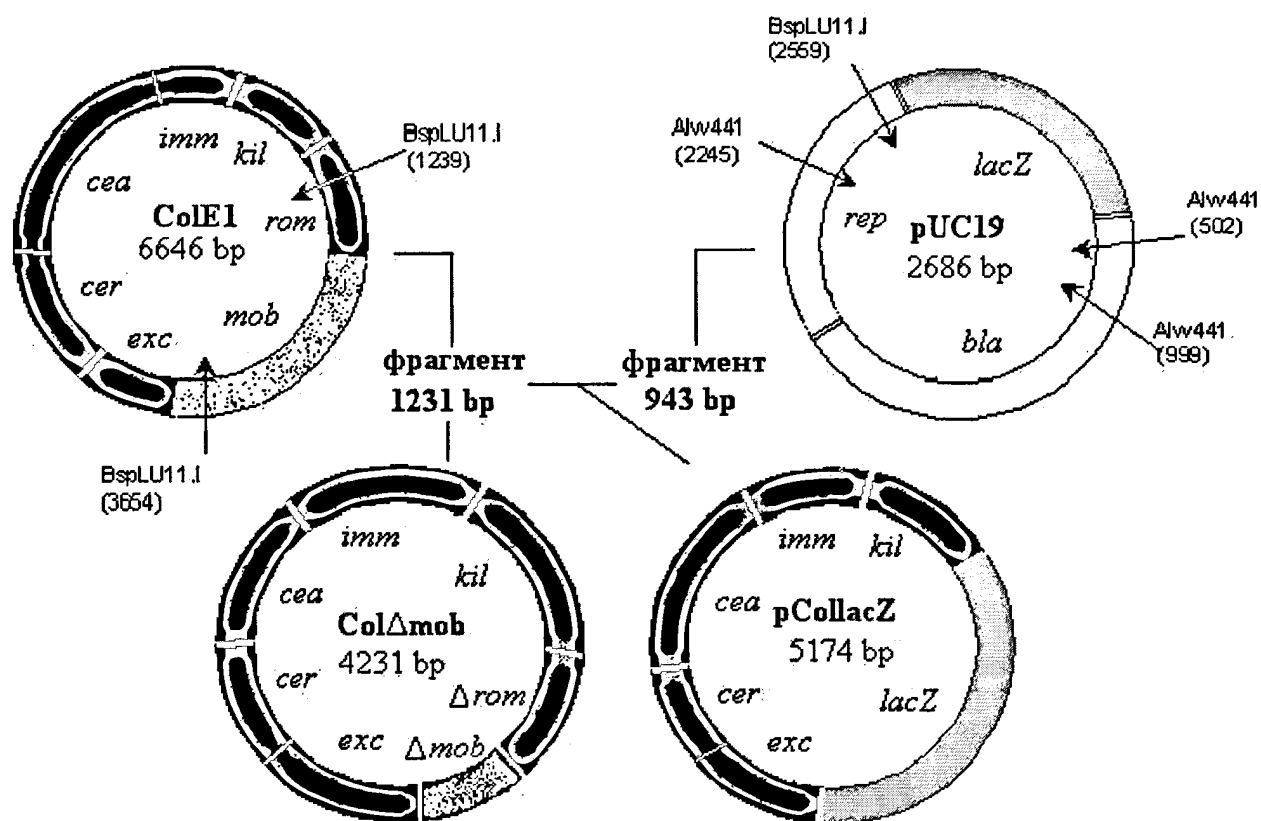


Рис.3. Схема конструирования плазмид pCollacZ и ColДmob.

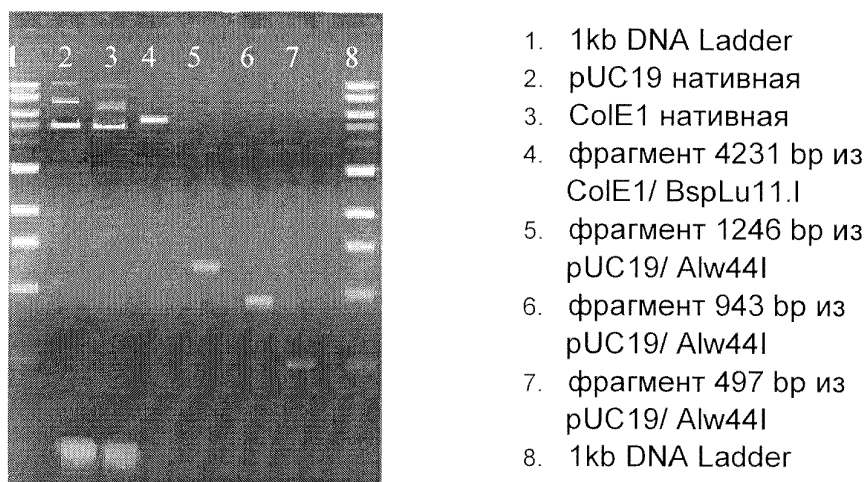


Рис. 4. Электрофоретическое разделение элюированных из геля и очищенных фрагментов ДНК плазмид pUC 19, полученных в результате обработки ее эндонуклеазой рестрикции Alw44I (1246 bp, 943 bp, 497 bp), а так же плазмиды ColE1, обработанной рестриктазой BspLU 11I (4231 bp)

Результаты обработки с помощью программы DNA SUN и осуществили компиляцию всей нуклеотидной последовательности рекомбинантных плазмид.

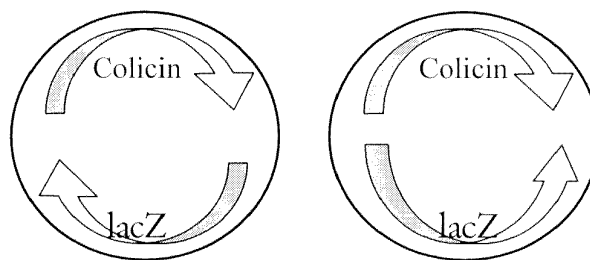


Рис. 5 Определение ориентации гена lacZ в плазмиде pCollacZ.

Таблица 12.

Величина фрагментов ДНК, получаемых при обработке ДНК гибридной плазмиды различными рестриктазами (А и В – возможные варианты вставки, см. также рис.5, 6)

Эндонуклеаза рестрикции	pCollacZ		ColДmob
	А	В	
SmaI	2245;2929	3084;2090	4231
PvuI	2528;620;322;1704	2528;355;322;1969	2528;1103

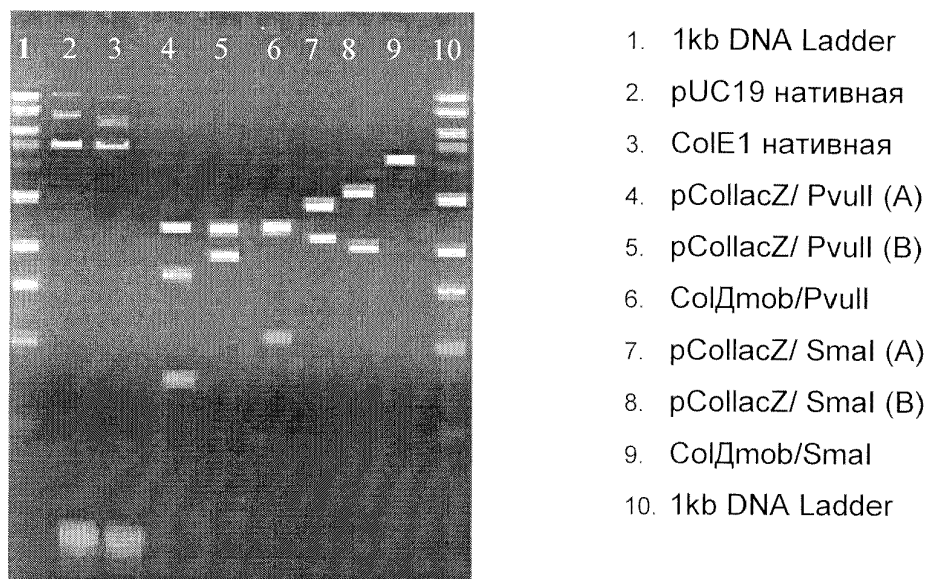


Рис. 6. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК гибридных плазмид, обработанных эндонуклеазами рестрикции, указанными в таблице 12.

Полученные штаммы TG1 содержали плазмидную ДНК и были охарактеризованы по ряду свойств:

*продукция колицина. Сравнительное исследование штаммов *E.coli* TG1 ColE1 и полученных вариантов показало, что при конструировании гибридных плазмид не произошло нарушение в функционировании генов синтеза колицина E1 и иммунитета к нему (табл. 13)

*стабильность поддержания плазмид в штамме *E.coli* TG1. Было доказано, что штамм - носитель сохраняет плазмиды при культивировании на питательной среде при отсутствии селективного агента на протяжении 100 генераций. Стабильность плазмиды ColE1 и ее производных детерминруется локусом *ser*. Исследования стабильности штаммов, содержащих плазмиды pCollacZ и ColДmob проводили, используя в качестве положительного контроля плазмиду ColE1 и в качестве отрицательного – pBR322 (производная плазмиды ColE1, лишенная локуса *ser*). Из рисунка 7 видно, что лишенная *ser* локуса плаزمида pBR322 быстро элиминируется из бактериальной популяции при выращивании в среде, не содержащей колицина, в то время как другие плазмиды стабильно наследуются клетками и таких условиях.

Генетические изменения при конструировании плазмид pCollacZ и ColДmob не затрагивают данный локус, поэтому полученные конструкции стабильны.

Свойство стабильности плазмиды необходимо для препарата пробиотика, так как гарантирует, что при приеме препарата не произойдет ее элиминация.

*мобилизуемость. Проводили методом конъюгации с использованием штамма *E.coli* S-17-1 (содержит встроенный оперон из плазмиды RP4), трансформированного плазмидами ColE1, pCollacZ и ColДmob, в качестве донора и штамма *E.coli* W3350 в качестве реципиента векторной ДНК (табл. 14). Как видно из представленной таблицы, сконструированные плазмиды не мобилизуются, что необходимо для использования штаммов, их содержащих, в промышленности. Это устраняет опасность переноса плазмиды в условно-патогенные или патогенные штаммы.

Таблица 13

Сравнительное исследование продукции колицина и толерантности к нему

штамм	TG1 ColE1	TG1 pColap	TG1 ColДmob	TG1 pCollacZ	TG1
Колонии, устойчивые к колицину E1 (%)	100	100	100	100	0
Колонии, продуцирующие колицин E1 (%)	100	100	100	100	0
Колонии, расщепляющие галактозу (синие колонии на среде с IPTG/X-Gal)	0	0	0	100	0

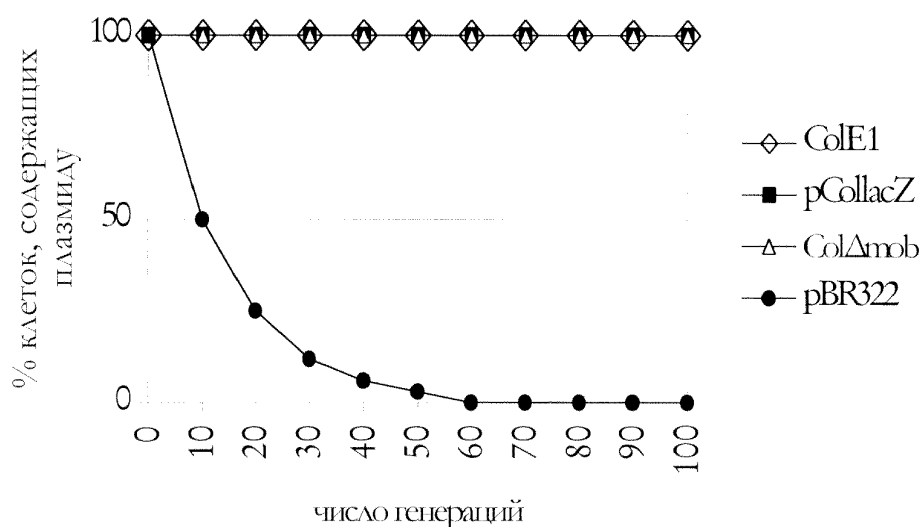
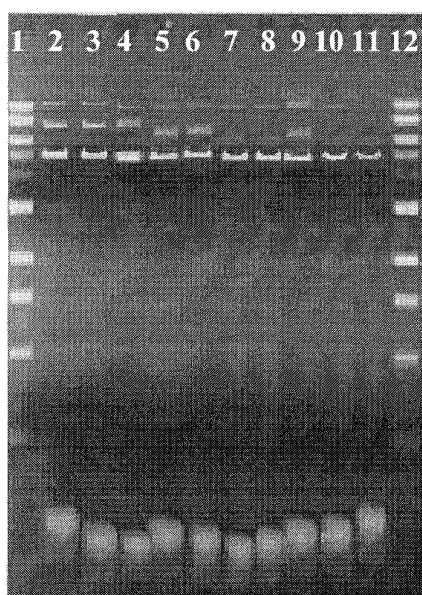


Рис. 7. Исследование стабильности поддержания плазмид pCollacZ и ColДmob в штамме TG1 в сравнении с плазмидами pBR322 и ColE1

Таблица 14

Исследование мобилизации плазмид ColE1, pCollacZ, ColДmob

Штамм- донор	Кол-во клеток донора	Кол-во клеток реципиента	Кол-во трансконъю гантов	Эффективность мобилизации на клетку	
				донора	реципиента
E.coli S-17-1 (ColE1)	$4 \cdot 10^8$	$1.25 \cdot 10^8$	10	$0.25 \cdot 10^{-7}$	$0.8 \cdot 10^{-7}$
E.coli S-17-1 (pCollacZ)	$5.2 \cdot 10^8$	$3.0 \cdot 10^8$	0	$<0.19 \cdot 10^{-8}$	$<0.33 \cdot 10^{-8}$
E.coli S-17-1 (ColДmob)	$5.6 \cdot 10^8$	$2.9 \cdot 10^8$	0	$<0.1 \cdot 10^{-8}$	$<0.23 \cdot 10^{-8}$

**Слева направо:**

- 1, 12 – 1 kb DNA Ladder;
- 2 – контроль (нативная ДНК плазмиды pCollacZ);
- 3,5,6 – плазмидная ДНК (pCollacZ), выделенная из трансформантов *E.coli* M-17;
- 4,7,8 - плазмидная ДНК (pCollacZ), выделенная из трансформантов *E.coli* M-17 fimH::npt,
- 9 – контроль (нативная ДНК плазмиды ColЕДmob);
- 10 – плазмидная ДНК (ColЕДmob), выделенная из трансформантов *E.coli* M-17;
- 11 - плазмидная ДНК (ColЕДmob), выделенная из трансформантов *E.coli* M-17 fimH::npt

Рис. 8. Электрофоретический анализ плазмидной ДНК, выделенной из 10 трансформантов (резистентных к колицину E1), полученных при введении плазмид pCollacZ и ColЕДmob в штаммы *E.coli* M-17 и *E.coli* M-17 fimH::npt.

2.2. получение штаммов *E.coli* M17/ pCollacZ, *E.coli* M17/ ColДmob, *E.coli* M17 fimH::npt/ pCollacZ, *E.coli* M17 fimH::npt/ pColДmob

Штаммы пробиотики *E.coli* M-17 и *E.coli* M17 fimH::npt не продуцируют колицины, чувствительны к действию колицина E1, не содержат плазмидной ДНК. Для

трансформации плазмид в данные штаммы была использована модернизированная методика кальцовой трансформации [59]. Частота трансформации составила $1,42 \cdot 10^{-6}$ для штамма *E.coli* M-17 и $0,9 \cdot 10^{-6}$ для штамма *E.coli* M-17 *fimH::npt* (рис. 8). Полученные варианты *E.coli* M-17 протестировали по схеме, аналогичной описанной ранее, то есть проверили стабильность поддержания плазмиды в неселективных условиях культивирования, устойчивость к колицину и его продукцию. Все свойства не претерпели изменений при смене штаммов-носителей плазмид.

* * *

В работе воссозданы варианты штамма M-17, обладающие свойством колициногенности, которое изначально было присуще и производственному штамму M-17, но которое было утрачено в процессе многолетнего культивирования. Получены плазмиды *pCollacZ* и *ColDmob*, которые по сравнению с исходной *ColE1* лишены областей *bot* и *mob*, что делает плазмиду неспособной к конъюгативной мобилизации среди других, в частности патогенных, микроорганизмов. Это свойство ранее было доказано для плазмиды *pColar*, также не содержащей *mob* области [59]. Ранее сконструированная плазида *pColar* также является нетрасмиссибельной, стабильной и придает штамму свойство продуцировать колицин E1, однако, несет ген *bla* – резистентности к ампициллину. Хотя сама по себе резистентность к антибиотику может рассматриваться для ПБ как желательное свойство, но локализация подобного гена на плазмиде для производственного штамма недопустима. Полученные варианты плазмиды *ColE1* либо просто лишены *mob* области (*ColDmob*), либо имеют вставку по *mob* области оперона *lacZ* (*pCollacZ*). Способность расщеплять галактозу, обеспечиваемая *lacZ* опероном является удобным маркером, по которому можно отбирать трансформированные клоны. Для ПБ на основе *E.coli* M-17 это свойство индифферентно, так как галактозидазная активность детерминируется хромосомными генами (рекомендации ВОЗ).

За счет свойства колициногенности полученные варианты могут обладать более высокой по сравнению со штаммом M-17 антагонистической активностью по отношению к патогенным бактериям, в частности к *UPEC* и *E.coli* O157:H7.

Таким образом, нами получены колициногенные варианты на основе штамма *E.coli* M-17 и его низкоадгезивного варианта *E.coli* M-17 *fimH::ntp*, охарактеризованного как более подходящий для колонизации кишечника [59].

ГЛАВА 3. АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НОРМАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ ПО ОТНОШЕНИЮ К ПАТОГЕННЫМ *ESCHERICHIA COLI*

В условиях макроорганизма антагонистическая активность представителей нормальной микрофлоры есть один из важнейших механизмов обеспечения колонизационной резистентности. Антагонистическая активность реализуется благодаря конкуренции с патогенами за питательные субстраты, продукции большого спектра антибиотических веществ. В большинстве случаев высокая антагонистическая активность пробиотиков, определенная в лабораторных условиях характеризует лечебно-профилактическую эффективность препаратов.

Была изучена антагонистическая активность различных пробиотиков в отношении клинических штаммов. Исследования (табл. 15 и рис. 9) показывают, что различные пробиотики в разной степени действуют на клинические штаммы *Escherichia coli* O157:H7 и UPEC штаммы.

Наибольший уровень антагонистической активности обнаружен у колисодержащих пробиотиков (колибактерин, биофлор, бификол, генноинженерные варианты штамма M17) - (до $31,3 \pm 0,55$ мм в отношении *Escherichia coli* O157:H7 у бификол). Выявлено, что колициногенные варианты *Escherichia coli* M17/ pColap, *Escherichia coli* M17 fimH::npt/ pColap, *Escherichia coli* M17/ pCollacZ, *Escherichia coli* M17/ ColDmob не имеют достоверно более высокий показатель по сравнению с родительским штаммом M17 ($p > 0,05$). Лактобактерин проявляет высокую антагонистическую активность по отношению к патогенным *Escherichia coli* обеих изучаемых групп ($15,5 \pm 2,1$ – $19,5 \pm 0,7$). Споровые пробиотики (бактисубтил, бактиспорин, споробактерин) показывают низкий уровень антагонистической активности (0 – $3,1 \pm 1,25$). Однако биоспорин имеет значительно более высокий показатель ($13,6 \pm 1,0$ и $6,8 \pm 1,9$). Энтерол не обладает *in vitro* антагонизмом по отношению к изучаемым группам *Escherichia coli*.

Из рис. видно, что большинство пробиотиков обладают более выраженным антагонизмом по отношению к штаммам *Escherichia coli* O157:H7. Средний показатель антагонизма колисодержащих пробиотиков в отношении UPEC составляет $17,1 \pm 1,2$ – $19,6 \pm 1,58$. Этот показатель совпадает с ранее изученным в отношении энтеропатогенных эшерихий ($17,2 \pm 2,0$) [42]. В то же время антагонистическая активность в отношении *Escherichia coli* O157:H7 значительно выше ($23,5 \pm 1,9$ - $31,3 \pm 0,55$) [42]. Биоспорин проявляет примерно тот же уровень антагонизма к изучаемым группам патогенных *Escherichia coli* ($13,6 \pm 1,0$ и $6,8 \pm 1,9$), как и к ранее изученным энтеропатогенным *Escherichia coli* ($12,92 \pm 1,7$) [42].

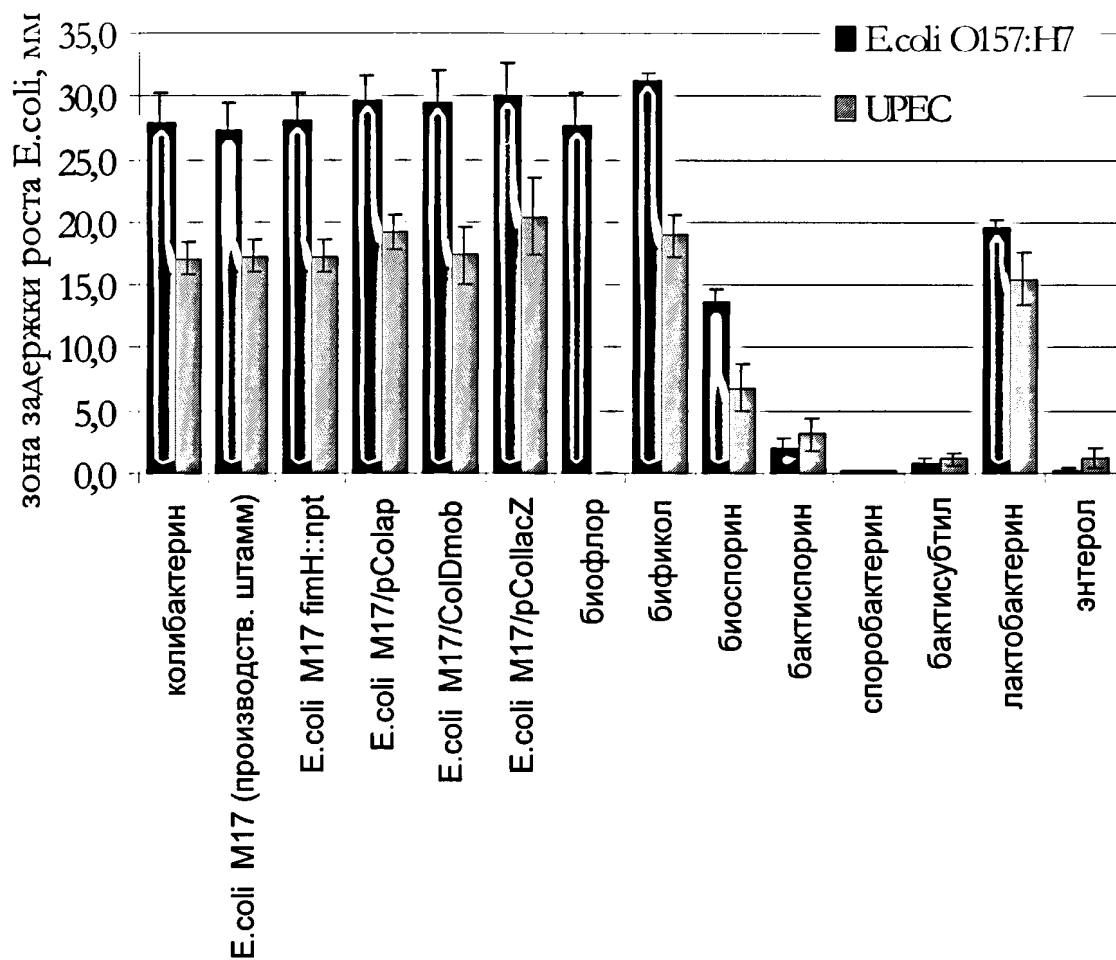


Рис 9. Антагонистическая активность пробиотиков

Таблица 15.
Антагонистическая активность пробиотиков в отношении штаммов *Escherichia coli* O157:H7 и UPEC штаммов

номера штаммов	Производственный штамм E.coli M-17	копиктерин	<i>Escherichia coli</i> M17 fimH::npt	<i>Escherichia coli</i> M17/ pColap	<i>Escherichia coli</i> M17fmH::npt	<i>Escherichia coli</i> pColap	<i>Escherichia coli</i> M17/ pColmob	<i>Escherichia coli</i> M17/ pColac2	биофлор	бификол	биоспорин	бактиспорин	споробактерин	бактисубтил	лактобактерин	энтерол
<i>Escherichia coli</i> O157:H7																
10	27,9±6,98	22,5±8,25	22,9±6,41	20,7±6,9	24,8±8,13	23,8±6,41	21,2±1,66	29,8±3,1	28,9±3,1	13,7±1,67	3,2±1,2	0,1±0,05	2,1±1,51	16,5±3,5	0,1±0,1	
2	26,5±5,12	22,9±2,63	22,3±1,85	18,9±3,43	23,6±3,78	21,7±1,85	20,1±3,43	21,3±4,9	29,6±2,05	14,0±2,29	2,1±1,45	0,3±0,12	1,0±0,54	18,9±1,5	0,0±0	
18	25,3±5,06	27,9±6,98	24,7±2,48	21,4±4,08	26,8±6,44	25,0±2,48	20,9±4,08	24,0±8,0	30,1±1,3	15,0±2,57	0,5±0,1	0,0±0	0,2±0,15	19,3±2,65	0,0±0	
61	30,7±2,89	26,5±5,12	24,3±3,36	20,0±3,64	27,9±3,84	24,0±2,48	28,2±1,66	24,6±6,7	27,6±1,54	14,7±2,36	0,0±0	0,0±0	0,1±0,05	22,2±2,45	0,2±0,1	
23	31,8±2,88	25,3±5,06	24,4±6,72	22,1±5,84	27,5±7,88	25,0±6,41	22,1±5,84	21,7±6,4	28,7±2,1	14,4±2,49	1,6±0,45	0,0±0	0,0±0	21,6±1,45	0,0±0	
25	28,5±6,13	30,7±2,89	31,0±0,67	30,0±0,67	37,0±2,67	30,2±0,67	33,3±0,67	33,7±0,4	39,5±1,4	15,3±0,89	3,2±1,5	0,0±0	0,5±0,1	19,5±1,89	0,0±0	
212	22,5±8,25	34,7±0,44	30,3±1,88	33,7±3,56	36,3±2,38	29,0±1,88	35,0±3,56	38,0±1,8	40,2±1,56	11,3±4,75	3,0±2,1	0,0±0	1,8±1,4	23,6±2,19	0,3±0,22	
9	22,9±2,63	28,5±6,13	25,5±4,6	22,4±5,38	27,8±6,94	26,1±4,6	25,1±5,38	24,7±6,7	26,5±1,78	13,4±1,83	1,8±1,4	0,6±0,14	0,7±0,6	17,4±1,74	0,7±0,48	
120	30,7±2,89	31,8±2,88	27,0±6,67	22,2±6,96	32,5±5,00	26,1±6,67	20,9±2,13	31,2±2,2	30,2±2,48	10,5±3,17	2,9±1,8	1,2±0,18	0,2±0,14	16,2±1,45	0,2±0,1	
UPEC																
225	16,0±0,31	16,0±0,31	15,2±0,7	18,2±0,82	19,5±1,69	15,2±0,92	20,5±0,82	nd	16,8±1,49	6,5±1,56	4,3±1,24	0,3±0,2	1,2±0,32	18,0±2,4	0,8±0,5	
58	19,8±1,92	19,8±1,92	20,3±1,54	16,5±1,32	19,8±1,54	20,3±2,1	16,8±1,32	nd	20,8±1,56	4,3±1,48	1,5±0,9	0,0±0	1,3±0,54	15,0±1,8	2,3±1,2	
807	16,8±1,20	16,8±1,20	16,3±1,2	18,5±1,45	18,5±1,65	16,3±1,2	19,3±1,45	nd	18,5±1,47	9,8±2,15	5,3±1,54	0,3±0,15	2,0±0,87	16,0±2,65	1,7±1,2	
723	16,5±0,62	16,5±0,62	16,0±0,8	17,1±0,99	18,6±1,45	16,0±0,8	17,5±0,99	nd	19,3±2,45	6,3±1,23	3,8±2,01	0,0±0	1,7±0,65	14,0±1,25	1,7±1,32	
306	10,8±0,23	10,8±0,23	16,3±0,9	16,5±1,23	17,2±1,11	16,3±2,48	16,5±1,23	nd	13,3±1,25	5,5±1,78	3,5±1,65	0,1±0,1	1,3±1,01	17,0±1,45	1,7±1,32	
804	16,5±1,51	16,5±1,51	18,3±1,54	15,9±1,66	14,8±1,32	18,3±1,54	16,2±1,66	nd	20,8±2,23	9,5±2,26	4,0±2,65	0,0±0	1,7±1,02	16,0±2,31	1,0±0,6	
391	14,3±2,11	14,3±2,11	17,1±2,45	15,8±2,23	18,9±2,00	17,1±2,45	17,2±2,23	nd	19,8±2,15	7,8±1,54	3,8±1,48	0,3±0,25	1,7±1,3	14,0±2,54	1,0±0,25	
681	16,5±1,65	16,5±1,65	17,2±2,12	19,8±2,12	22,1±1,78	17,2±1,54	20,6±3,64	nd	19,3±1,47	8,3±1,98	3,8±0,68	0,3±0,15	1,3±0,54	14,0±1,25	0,8±0,15	
407	15,3±0,56	15,3±0,56	16,4±0,92	21,3±2,1	22,6±2,4	16,4±0,92	20,4±0,82	nd	18,5±1,16	3,8±1,78	3,1±1,24	0,1±0,05	0,8±0,1	14,0±0,98	1,3±0,16	
395	16,6±1,65	16,6±1,65	18,1±1,84	24,5±2,3	23,6±1,45	18,1±1,84	24,0±2,3	nd	16,3±0,89	8,0±0,95	3,7±1,02	0,0±0	0,3±0,15	15,0±2,45	1,0±0,45	
310	18,8±1,84	18,8±1,84	21,2±1,78	21,8±1,58	21,3±1,69	21,2±1,78	22,0±1,44	nd	19,5±1,65	5,8±2,45	2,8±2,09	0,1±0,15	1,0±0,5	14,0±2,87	1,0±0,54	
727	18,2±1,11	18,3±2,11	23,6±2,13	19,8±1,57	20,5±1,23	23,6±2,13	19,0±1,57	nd	20,0±2,01	9,4±1,32	3,8±1,87	0,3±0,2	0,7±0,1	19,0±2,98	1,3±1,5	
714	15,9±1,62	16,0±1,62	15,0±2,1	23,6±2,13	22,2±1,12	15,0±2,1	24,8±2,13	nd	19,3±1,98	8,8±0,87	6,3±1,24	0,0±0	1,7±0,54	15,0±3,65	0,8±0,2	

393	20,4±1,23	20,3±1,23	18,0±1,13	21,0±1,45	22,2±1,04	18,0±1,13	20,9±1,45	nd	17,5±0,59	7,3±0,98	3,8±1,27	0,0±0	1,0±0,32	20,0±1,54	0,7±0,5
731	18,8±1,12	19,8±1,12	15,2±1,45	20,3±1,88	19,8±1,78	15,2±1,45	20,7±1,88	nd	21,3±1,87	5,8±1,45	1,7±0,23	0,0±0	1,0±0,21	16,0±1,87	1,3±1,1
629	20,0±1,00	21,0±1,00	17,4±2,00	20,8±1,35	20,2±1,05	17,4±1,46	20,5±1,57	nd	20,8±1,45	6,8±1,65	1,8±0,92	0,0±0	1,0±0,21	15,0±3,12	1,7±1,2
89	17,3±1,15	18,3±1,14	15,2±1,46	21,4±1,44	22,6±1,66	15,2±1,46	23,0±1,44	nd	22,0±2,58	5,3±1,54	1,1±0,21	0,1±0,1	1,0±0,21	17,0±2,45	2,0±1,3
155	18,7±1,60	17,7±1,65	19,6±1,89	18,7±1,55	17,9±1,87	19,6±1,89	30,1±1,55	nd	17,3±1,54	8,5±1,23	3,3±1,87	0,0±0	1,0±0,21	14,0±2,98	0,8±0,5
380	18,2±2,23	17,3±2,03	15,8±1,03	15,6±1,65	16,8±1,32	15,8±1,03	22,1±1,65	nd	19,7±2,13	7,5±1,54	0,3±0,25	0,0±0	1,3±0,32	21,0±2,52	1,0±0,9
788	15,2±1,49	15,8±2,55	14,3±2,1	14,2±2,21	15,2±1,49	14,3±2,1	16,4±2,21	nd	16,3±1,12	9,7±1,78	2,5±1,23	0,1±0,1	1,0±0,21	19,0±2,02	1,2±1,1
836	19,6±0,13	19,0±2,45	18,4±1,45	18,6±2,33	19,2±1,87	18,4±1,45	18,7±2,33	nd	16,5±0,97	4,5±2,54	2,3±0,45	0,3±0,15	0,8±0,17	12,0±1,01	1,3±1,02
368	17,2±1,11	17,8±1,23	15,2±0,9	21,0±0,66	21,3±1,45	15,2±2,1	21,1±0,66	nd	21,5±2,21	6,5±1,98	1,3±0,26	0,1±0,1	0,8±0,17	13,0±1,08	0,7±0,65
549	16,8±1,12	16,8±1,12	14,2±0,65	15,8±0,21	17,3±0,48	14,2±0,65	16,5±0,21	nd	18,8±0,98	6,0±3,01	3,4±0,22	0,0±0	0,8±0,17	12,0±1,45	1,0±0,54
88	15,8±0,56	15,8±0,56	13,2±1,21	22,2±1,23	20,1±2,78	13,2±1,21	22,5±1,23	nd	18,5±1,26	6,8±3,2	3,8±1,05	0,0±0	0,8±0,17	14,0±2,04	1,0±0,54
311	16,4±2,21	16,0±0,56	18,5±1,32	20,1±1,23	19,5±2,15	18,5±1,32	23,6±1,23	nd	17,8±1,24	6,8±2,8	3,3±1,45	0,0±0	1,3±0,32	14,0±2,05	1,0±0,54
307	16,1±0,79	16,0±0,89	17,4±1,13	19,2±1,25	18,4±2,47	17,4±1,13	21,5±1,23	nd	17,0±1,87	6,5±2,87	2,9±1,88	0,0±0	0,8±0,17	14,0±2,31	1,0±0,23
JJP160	18,9±0,15	18,6±0,45	17,2±2,11	18,3±2,31	17,4±1,13	17,2±2,11	20,0±0,66	nd	18,5±2,54	4,8±1,54	2,6±1,5	0,0±0	2,0±0,56	16,5±2,12	1,2±0,74
JJC150 /pPKL9	17,4±0,78	17,2±0,68	19,6±0,13	18,4±0,46	18,0±1,87	19,6±0,13	19,2±0,46	nd	18,6±2,1	5,5±2,54	3,2±1,52	0,0±0	1,3±0,32	18,5±0,3	1,2±0,28
JJF10	15,8±1,03	16,5±0,48	18,9±0,15	19,5±0,39	20,1±1,56	18,9±0,15	16,4±0,66	nd	21,2±3,2	6,3±1,87	3,1±1,53	0,2±0,15	0,0±0	15,2±1,54	1,3±0,05
NU14	17,3±0,48	17,4±0,78	18,6±0,78	20,1±1,25	20,3±1,89	18,6±1,21	22,3±1,25	nd	20,5±2,54	7,2±2,89	3,0±1,45	0,1±0,1	1,1±0,54	14,0±2,04	1,7±0,45
NU14 /pPKL9	18,5±0,54	18,4±0,78	19,5±0,22	21,2±0,66	22,3±0,56	19,5±0,13	23,1±1,23	nd	19,5±1,87	6,9±1,57	2,6±1,7	0,2±0,05	1,5±0,7	15,2±2,1	2,0±1,02

В таблице использованы средние значения 5 опытов.

nd – нет данных.

Таким образом, выявлена высокая антагонистическая активность колисодержащих пробиотиков, а так же биоспорина и лактобактерина в отношении патогенных штаммов *Escherichia coli* O157:H7 и UPEC.

Пробиотики колисодержащие (колибактерин, биофлор, *Escherichia coli* M17/ pColap, *Escherichia coli* M17 fimH::npt/ pColap, *Escherichia coli* M17/ pCollacZ, *Escherichia coli* M17/ ColДmob), биоспорин, лактобактерин обладают наибольшим уровнем антагонистической активности к исследуемым патогенам и на основании полученных *in vitro* результатов определены как наиболее перспективные для дальнейшего изучения в качестве средств профилактики и лечения заболеваний, вызванных патогенными O157:H7 и UPEC.

ГЛАВА 4. СРАВНЕНИЕ АДГЕЗИВНОЙ АКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП ПРОБИОТИКОВ

Адгезия микроба к различным субстратам в организме хозяина, являясь одним из наиболее общих свойств, представляет собой первый этап развития различных форм симбиотических отношений - персистенции представителей нормальной микрофлоры или развития инфекционного процесса в той или иной форме. Для пробиотиков показатель адгезивной активности наряду с показателем антагонистической активности может являться характеристикой их терапевтической эффективности.

В качестве модели для сравнительного исследования адгезивности различных групп пробиотиков выбраны человеческие эритроциты B/II (Rh+). Эритроциты являются универсальной моделью для изучения адгезии разных микроорганизмов, так как имеют на своей поверхности гликофорин - гликопротеин, идентичный гликокаликс у эпителиальных клеток, а так же еще более 20 различных гликопротеинов.

При изучении адгезивной активности (табл. 16) коммерческих препаратов исследовались лиофильно-высушенные культуры и выращенные в течение 24 ч (суточные культуры). Подтверждено, что процесс лиофилизации не оказывает влияния на показатель адгезии изучаемых пробиотиков [62].

Уровень адгезивности различен у разных ПБ. Среди колисодержащих ПБ наибольший СПА характерен для колибактерина ($2,5 \pm 0,40$), производственного штамма *E.coli* M-17 ($2,2 \pm 0,30$) и варианта *E. coli* M-17 pCollacZ ($3,2 \pm 0,25$). Таким образом, показано, что введение сконструированных плазмид в штамм *E.coli* M-17 увеличивает его адгезивность к эритроцитам. Варианты *E. coli* M-17 *fimH::npt/pCollacZ* и *E. coli* M-17 *fimH::npt* обладают значительно более низким уровнем адгезивной активности ($0,7 \pm 0,10$ и $0,6 \pm 0,10$) ($p < 0,05$) вследствие отсутствия гена синтеза пилей I типа *fimH*. Средний уровень адгезивности наблюдается у лактобактерина ($3,2 \pm 0,50$) и бифидобактерина ($1,7 \pm 0,20$). Среди споровых ПБ наибольшим уровнем адгезивности обладает биоспорин ($2,6 \pm 0,10$), тогда, как СПА у бактиспорина и бактисубтила низок ($0,4 \pm 0,15$ и $0,1 \pm 0,10$ соответственно). Низкий уровень адгезивности зафиксирован у энтерола ($0,3 \pm 0,15$) и ацилакта ($0,3 \pm 0,10$). Показатели К% у исследованных ПБ так же различались. Высокий К% показан у кишечных палочек с "включенным" геном синтеза адгезина *FimH*, лактобактерина, биоспорина, средний – у бактиспорина. Низкий К% проявляли кишечные палочки с

дефектным геном синтеза пилей I типа *fimH*, бактисубтил, энтерол, ацилакт и бифидумбактерин. Известно, что показатель К% прямо зависит от количества рецепторов для адгезинов микроорганизмов. Таким образом, показано, что для колисодержащих ПБ адгезия играет важную роль при реализации колонизационной активности, тогда как для споровых ПБ, лактосодержащих ПБ и энтерола процесс адгезии менее значим.

Параллельно проводилось исследование адгезивной активности патогенных *E.coli* (O157:H7 [n=9] и UPEC [n=14]). В опытах использованы 12 часовые культуры микроорганизмов. В таблице 17 показано, что уровень адгезивности исследуемых штаммов к эритроцитам варьирует.

Все штаммы UPEC проявляют разный уровень адгезивности, который колеблется от $0,60 \pm 0,16$ (*E.coli* #310) до $2,89 \pm 1,24$ (*E.coli* #407). Средний показатель адгезивности к эритроцитам у UPEC составляет $1,83 \pm 1,20$. В средней величине не учтен показатель адгезивности штамма NU14/ rPKL9 ($5,97 \pm 1,50$), так как он является трансформированным плазмидой rPKL9 вариантом клинического изолята NU14 (СПА= $0,95 \pm 0,15$). Такой высокий уровень адгезивности данного варианта по сравнению с диким штаммом обусловлен экспрессией синтеза пилей I типа, благодаря наличию плазмиды rPKL9, несущей регуляторный ген *fimB*.

Штаммы *E.coli* O157:H7 так же обладают различным уровнем адгезивной активности к эритроцитам. При этом СПА колеблется в более широком по сравнению с UPEC интервале: от $0,48 \pm 0,23$ (штамм 10) до $9,95 \pm 2,30$ (штамм 2). Из литературных данных известно, что оба штамма одинаково патогенны, вызывали эпидемии в разных префектурах Японии, имеют одинаковую PFGE характеристику [265]. Следовательно, для группы *E.coli* O157:H7 адгезивность не коррелирует с патогенностью. Однако, СПА для всей группы штаммов *E.coli* O157:H7 достаточно высок и составляет $3,45 \pm 2,89$.

В обеих группах патогенных *E.coli* отмечен средний или высокий показатель К% (кроме штамма *E.coli* O157:H7 #10). Следует отметить, что СПА выше в группе O157:H7, тогда как К% выше в группе UPEC. Этот факт свидетельствует о том, что для UPEC существует больше рецепторов на мембране эритроцитов, так же как и для нормальной кишечной палочки М-17. Следовательно, возможна выраженная конкуренция между нормальными *E.coli* и UPEC.

Таблица 16.

Адгезивная активность пробиотиков к эритроцитам

Группы пробиотиков	Название препарата, штамма	Культуры, прогретые 30 мин при 70 °C		Живые суточные культуры	
		M±m		M±m	
		СПА	К%	СПА	К%
Споровые	Биоспорин	2,6±0,10	98,8±6,35	3,5±0,25	96±8,32
	Бактиспорин	0,4±0,15	30,1±6,87	0,8±0,12	48,2±4,52
	Бактисубтил	0,1±0,10	9,4±3,84	nd	nd
Грибы	Энтерол	0,3±0,15	16,5±4,99	0,1±0,10	12,4±2,56
	Колибактерин	2,5±0,40	75,6±5,94	2,1±0,20	69,3±5,80
	E. coli M-17	2,2±0,30	70,2±7,22	nd	nd
	Произв. штамм				
	E. coli M-17 pColap	nd	nd	3,0±0,25	82,0±9,31
	E. coli M-17 fimH::ntp/pColap	nd	nd	0,8±0,10	34,1±6,82
	E. coli M-17 fimH::ntp	nd	nd	0,8±0,10	30,0±4,90
	E. coli M-17 fimH::ntp/pCollacZ	nd	nd	1,1±0,21	25,8±5,34
	E. coli M-17 fimH::ntp/ColДmob	nd	nd	1,2±0,20	28,9±7,42
	E. coli M-17 pCollacZ	nd	nd	3,1±0,19	85,6±9,51
	E. coli M-17 ColДmob	nd	nd	2,9±0,20	78,4±6,75
	Лактосодержащие				
	Лактобактерин	3,2±0,50	76,0±4,10	3,0±0,35	78,5±7,94
	Ацилакт	0,3±0,10	18,5±6,90	0,4±0,10	25,0±4,6
Бифидосодержащие	Бифидумбактерин	1,7±0,20	18,4±4,42	nd	nd

Таблица 17.

Адгезивная активность патогенных *E.coli* к эритроцитам

№ или название штамма <i>E.coli</i>	Показатели адгезивности	
	СПА	К%
UPEC		
NU14	0,95±0,06	62,5±5,98
NU14/pPKL9	5,97±0,95	98,7±9,7
JJP160	0,92±0,16	50,0±6,54
JJF10	0,98±0,04	51,2±4,78
391	0,83±0,13	54,8±7,84
723	1,02±0,03	62,5±6,74
88	2,51±0,17	47,9±8,78
310	0,60±0,09	45,8±9,45
225	2,65±0,29	93,8±7,58
629	2,08±1,12	91,7±8,96
380	1,00±0,14	64,6±9,46
549	1,44±0,18	72,9±7,45
407	2,90±0,11	89,7±7,46
788	1,50±0,77	87,5±9,34
UPEC (Mcp.±m)	1,83±0,89	72,2±19,0
<i>E.coli</i> O157:H7		
212	1,94±0,32	79,6±5,89
2	9,95±1,12	82,3±7,79
25	6,75±1,06	82,6±7,98
9	2,95±0,33	64,2±9,65
61	2,97±0,50	51,5±10,44
10	0,48±0,07	12,7±7,68
18	3,77±0,55	48,9±9,32
120	1,15±0,38	52,0±6,88
23	1,16±0,14	58,6±4,24
<i>E.coli</i> O157:H7 (Mcp.±m)	3,45±2,89	59,1±22,1

Таким образом результаты проведенного исследования позволили раскрыть еще один механизм защитного действия пробиотиков различных групп – адгезивную активность. Доказана большая вариабельность этого показателя у разных пробиотиков. Следовательно, свою активность *in vivo* препараты нормофлоры реализуют по-разному, то есть роль процесса адгезии в общем механизме защитного действия различна у разных пробиотиков. Препараты, обладающие высоким уровнем адгезивной активности (колибактерин, биоспорин, лактобактерин), а так же высоким К% могут конкурировать за рецепторы с патогенами. Следовательно, такие препараты могут оказаться эффективными для профилактики инфекций, вызванных патогенными эшерихиями, особенно штаммами *E.coli* O157:H7, поскольку эти штаммы проявили достаточно высокий уровень адгезивности ($3,45 \pm 2,89$), что позволяет предположить немаловажность фактора адгезии в развитии инфекционного процесса. Пробиотики, обладающие низким уровнем адгезивной активности могут оказаться эффективными в условиях *in vivo* за счет антагонистической активности (синтеза биологически активных веществ, изменения pH среды и т.д.), стимуляции иммунитета. Кроме того, препараты с низкой адгезивной активностью могут оказать более выраженное антагонистическое действие в разгар инфекционного процесса, то есть тогда, когда рецепторы макроорганизма заняты патогенами. В этих же условиях препараты, защитное действие которых реализуется во многом благодаря высокой адгезивной активности могут быть неэффективны из-за отсутствия субстратов связывания. Однако, окончательный вывод о защитном действии того или иного пробиотика можно сделать, только опираясь на результаты исследования *in vivo* и клинические испытания.

ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НА УРОВЕНЬ АДГЕЗИИ РАЗЛИЧНЫХ ШТАММОВ *E. coli* ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

Свойство адгезии у пробиотиков рассматривается, как правило, как желательный или необходимый фактор колонизационной активности. Напротив, для инфекционных агентов высокая адгезивная активность является фактором патогенности. Следовательно, блокирование процесса адгезии у патогенов может предотвратить развитие инфекции на раннем этапе или облегчить ее течение. Способность воздействовать на процесс адгезии веществ различных групп, биологических молекул, пробиотиков, физических факторов подтверждена работами разных авторов [91,110,121,122,123,139,277].

Возможность применения ферментов ASG и PPO в качестве ингибиторов процесса адгезии стала очевидна исходя из сведений о пространственной структуре около 200 углевод-связывающих протеинов в комплексе с их лигандами. Аспарагин и тирозин являются основными аминокислотами, через которые осуществляется связь лектина белкового происхождения с полисахаридным рецептором [6]. Р. Дойл с соавт. показал высокий эффект воздействия PPO на GBL и GTF *Streptococcus sobrinus* 6715 [110]. Однако воздействия ферментов на фимбриальные адгезины бактерий, в частности пили *E. coli*, не изучалось.

НИЛИ широко применяется для лечения инфекционных процессов, однако механизм действия НИЛИ на бактерию до конца не выяснен. Показано снижение хемотаксиса и адгезии некоторых госпитальных штаммов микроорганизмов, а также снижение персистентных свойств для *S. aureus* [110]. В литературе не обнаружено сведений о воздействии НИЛИ на адгезивные свойства *Escherichia coli*.

5.1. Влияние низкочастотного инфракрасного лазерного излучение на уровень адгезии патогенных *E. coli* к различным субстратам

5.1.1. Исследование влияния НИЛИ на уровень жизнеспособности *E. coli*

Для изучения влияния НИЛИ на уровень жизнеспособности бактерий было проведено исследование. Взвесь бактерий в концентрации доведенной до 10 единиц ОЕ обрабатывали НИЛИ 1000 Гц с экспозицией 1 и 10 мин с последующим 10-ти кратным титрованием в физиологическом растворе и рассевом на чашки Петри со средой Эндо. Посевы инкубировали в течение 12 часов при температуре 37 °C.

При исследовании воздействия НИЛИ на уровень жизнеспособности клинических штаммов *Escherichia coli* установлено, что лазер не оказывает статистически достоверного изменения количества живых бактерий в мл (табл. 18) как при экспозиции в течение 1 мин, так и течение 10 минут.

Таблица 18

Влияние различных условий обработки НИЛИ на уровень жизнеспособности *E.coli*

№ штамма <i>E.coli</i>	Концентрация бактерий (КОЕ*10 ⁹ /мл) при воздействии НИЛИ в течение		
	Контроль	1 мин	10 мин
225	5,3±1,4	5,75±1,62	6,0±0,81
629	7,5±2,4	7,5±1,1	6,0±2,4
723	4,76±0,85	5,387±0,77	6,05±0,21
380	3,55±0,21	2,6±0,14	2,55±0,7
407	6,9±0,28	6,7±0,14	6,27±0,33
88	4,6±0,424264	3,99±0,95	3,6±0,14
788	8,0±2,4	7,5±1,1	6,0±2,4
NU14	3,76±0,82	3,38±0,45	5,05±1,12

Примечание: Достоверность различий между выживаемостью без облучения и выживаемостью после обработки ($p>0,05$)

5.1.2. Влияние НИЛИ на уровень адгезии патогенных *E.coli* к эритроцитам

Исходя из результатов, полученных при исследовании влияния НИЛИ на выживаемость микроорганизмов, исследовано воздействие НИЛИ 1000 Гц 1 мин и 10 мин на адгезивность изучаемых штаммов. Показано, что все штаммы исходно обладают разным уровнем адгезивности (табл. 19 и рис. 10). Достоверно снижается уровень адгезивности у *Escherichia coli* при экспозиции 1 и 10 мин у штаммов NU14/pPKL9, 407, 88, JJF10, JJP160, причем время экспозиции на СПА не влияет ($p>0,05$). Исключение составили штаммы *E.coli* O157:H7 и 391, у которых при лазерной экспозиции адгезивность не снижалась ($p>0,05$). Различный уровень снижения адгезии у разных штаммов связан, вероятно, с присутствием различных типов адгезинов на поверхности клеток, более или менее чувствительных к воздействию ЛИ. Тот факт, что под действием НИЛИ не происходит снижения жизнеспособности микроорганизмов, однако, уменьшается величина адгезии,

говорит о воздействии НИЛИ на поверхностные структуры бактерий – адгезины. Из табл. видно, что не наблюдается существенного различия в изменении уровня адгезивной активности при лазерной экспозиции 1 мин и 10 мин. Поэтому в последующих экспериментах используется обработка 1000 Гц 1 мин. При анализе изменения К% установлено его достоверное снижение для штамма №407 ($p < 0.05$). Для остальных штаммов наблюдалось некоторое снижение К%, однако разница в показателях без обработки и под воздействием НИЛИ не достоверна ($p > 0.05$).

Таблица 19.

Адгезивность *E.coli* к эритроцитам до и после лазерной экспозиции

Штамм	До обработки		НИЛИ 1000 Гц 1 мин		НИЛИ 1000 Гц 10 мин	
	СПА	К%	СПА	К%	СПА	К%
NU14	0,95±0,06	62,5±5,98	0,9±0,04	65,5±4,76	0,9±0,04	65,5±4,76
NU14/pPKL9	5,97±0,95	98,7±9,7	4,4±0,60	100,0±8,7	4,5±0,16	100,0±8,7
407	2,90±0,11	89,7±7,46	1,7±0,22	59,7±8,54	1,4±0,13	59,7±8,54
88	2,51±0,12	47,9±8,78	0,6±0,19	40,3±7,88	0,4±0,03	40,3±7,88
JJF10	0,98±0,04	51,2±4,78	0,4±0,01	48,6±5,12	0,5±0,09	48,6±5,12
JJP160	0,92±0,16	50,0±6,54	0,7±0,07	49,9±9,56	0,7±0,07	49,9±9,56
391	0,83±0,13	54,8±7,84	0,9±0,08	61,5±7,65	1,0±0,08	61,5±7,65
O157:H7 (212)	1,94±0,32	79,6±5,89	1,6±0,14	70,3±8,48	2,1±0,14	70,3±8,48

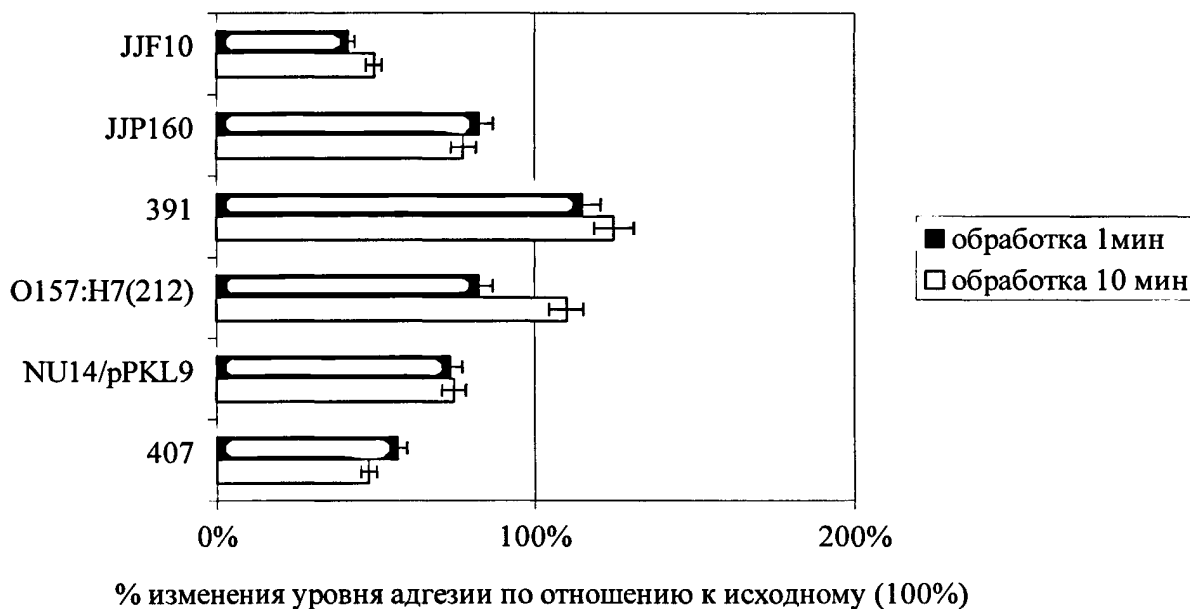


Рис.10. Изменение уровня адгезивности *E.coli* под воздействием НИЛИ 1000 Гц 1 мин и 10 мин

5.1.3. Изменение адгезии патогенных *E.coli* под влиянием обработки НИЛИ эритроцитов

Из литературы известно о влиянии НИЛИ на макроорганизм. Однако, данных о воздействии НИЛИ на рецепторы эукариотических клеток в литературе нет. В качестве объекта использовались эритроциты A/O (Rh+). Изучалось НИЛИ 1 и 10 мин. Было показано достоверное снижение уровня адгезии UPEC (рис. 11).

Таким образом, исследования выявили, что НИЛИ воздействует не только на адгезины микроорганизмов, но и на рецепторы - поверхностные структуры эритроцитов, являющиеся субстратами для адгезинов.

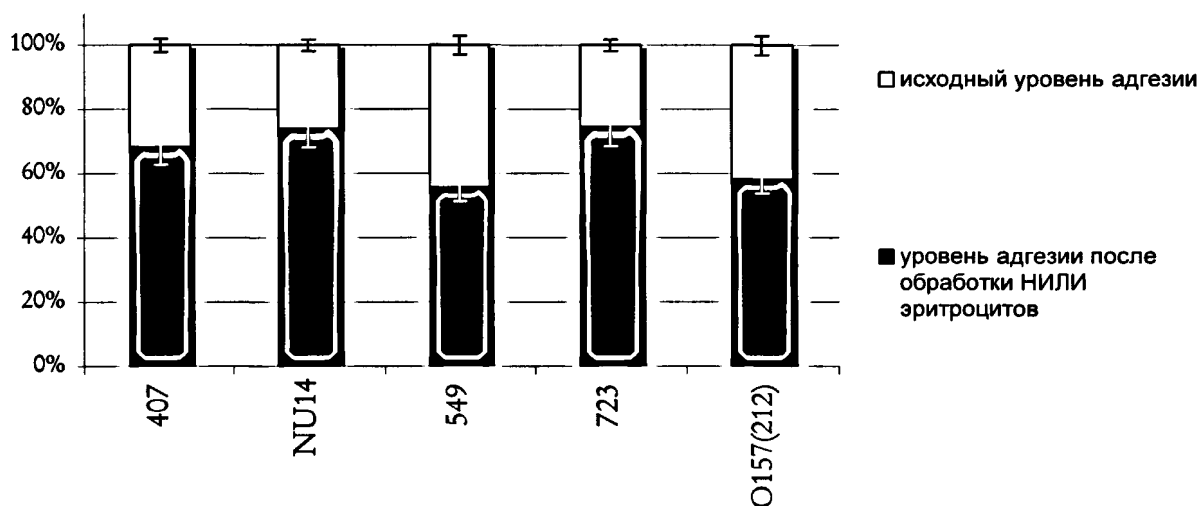


Рис 11. Влияние обработки эритроцитов низкочастотным инфракрасным лазерным излучением 1000 Гц 10 минут на уровень адгезии патогенных кишечных палочек

5.1.4. Влияние НИЛИ на уровень адгезии патогенных *E.coli* к клеткам защитного эпителия

В ряде случаев способность бактериальной клетки прикрепляться к тканевым культурам в условиях *in vitro* не коррелирует с их способностью связываться с эритроцитами [144]. Как правило, агглютинация эритроцитов ассоциирована с наличием у бактерии маннозочувствительных пилей, но для уропатогенных штаммов, характеризующихся разнообразием адгезинов, в том числе практически

обязательным присутствием маннозорезистентных пилий, корреляция между адгезивными свойствами и агглютинирующей способностью не обнаружена [162].

К клеткам ЗЭ прикрепляются большинство уropатогенных *E.coli* [20], следовательно, для этих штаммов модель ЗЭ может рассматриваться в качестве универсальной. При исследовании воздействия НИЛИ на адгезию *E.coli* к ЗЭ так же показано снижение адгезивности (рис. 12). Однако, в сравнении с результатами, полученными на модели эритроцитов, эффект ингибирования менее выражен (рис. 10). Вероятно, такой эффект связан с участием в адгезивном процессе различных типов пилий.

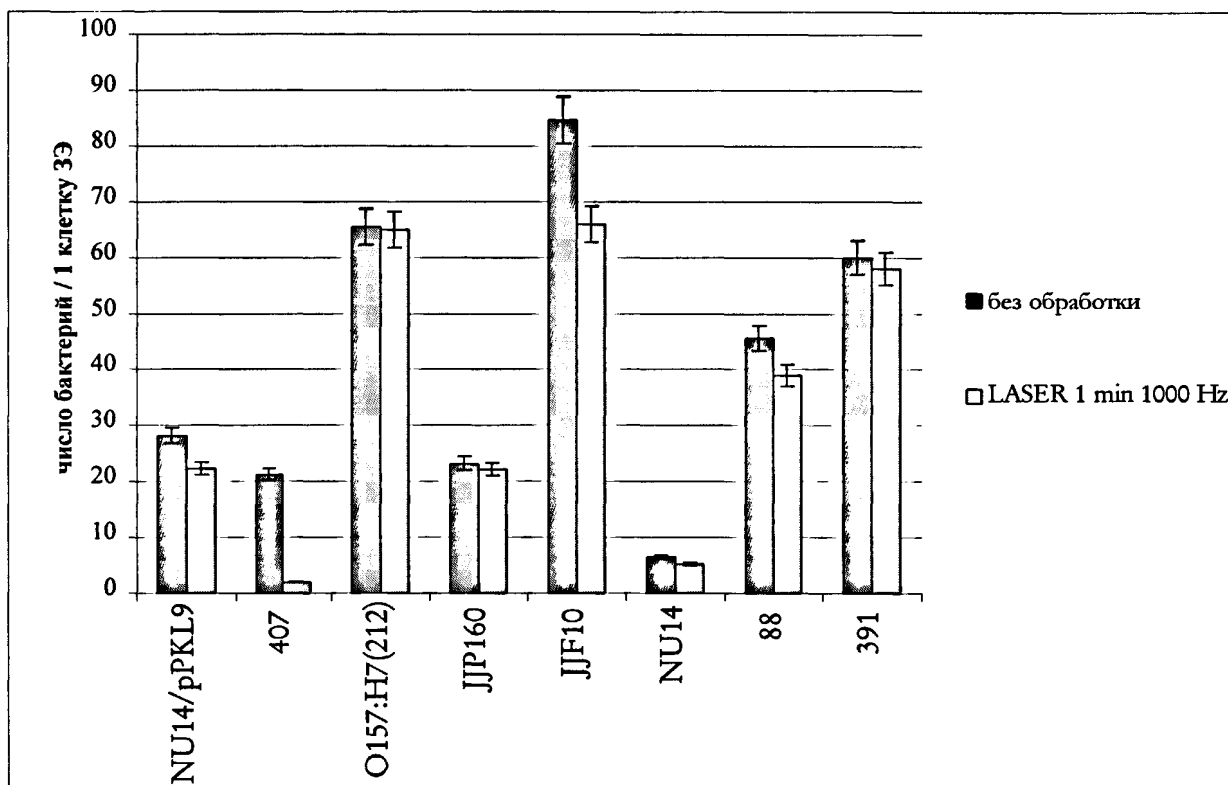


Рис 12. Влияние НИЛИ на адгезию *E.coli* к клеткам защитного эпителия

5.2. Влияние обработки ферментами L-Аспарагиназой и Полифенол оксидазой на уровень адгезии *E.coli* к различным субстратам

5.2.1. Определение бактерицидных свойств ферментов ASG и PPO

Для выявления способности ферментов ингибировать рост бактерий патогенные *E.coli* инкубировались с ферментами в различных концентрациях. Положительным контролем являлся ампициллин. Показано, что ни L-Аспарагиназа в

концентрациях от 0,31 до 120,0 ЕД/мл, ни Полифенол оксидаза в концентрациях от 17,5 до 1128,0 ЕД/мл не оказывают влияния на рост *E.coli*. В среде с добавлением ампициллина в концентрациях от 0,015 до 1,0 мг/мл бактериальный рост отсутствовал (табл. 20).

Табл. 20

Определение бактерицидного действия ASG и PPO

Штамм	Наличие/отсутствие роста																		
	Добавление веществ в концентрации (ЕД/мл)																		
	Контроль	ампиокс						PPO					ASG						
		0,015	0,03	0,12	0,24	0,48	1,0	17,5	32,0	64,0	160,0	320,0	1128,0	0,31	0,62	6,2	24,8	50,2	120,0
E.coli M-17	++++	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L.fermentum	++++	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
90-TS-4(21)	++++	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

5.2.2. Определение эффективной антиадгезивной концентрации ASG и PPO

Выявлено, что действие ASG на адгезию микроорганизмов подчинено закону протекания ферментативной реакции. Максимальный эффект ингибирующего действия L-Аспарагиназы приходится на концентрацию 6,0 ЕД/мл, а при увеличении концентрации ASG более, чем 6,0 ЕД/мл происходит обратный процесс – увеличения адгезии (рис.13). Вероятно, это может быть связано с тем, что высокие концентрации фермента при взаимодействии бактериальной клетки с мембраной клетки – хозяина влекут за собой образование оснований Шиффа за счет дополнительного включения в процесс протеинов мембраны клетки - хозяина. Эффективность антиадгезивного действия PPO повышалась с увеличением концентрации фермента, что является отступлением от классического уравнения ферментативной реакции, но может быть объяснено способностью PPO воздействовать на иной, возможно, более широкий спектр адгезинов. Оптимальной выбрана концентрация 400 ЕД/мл (рис.14).

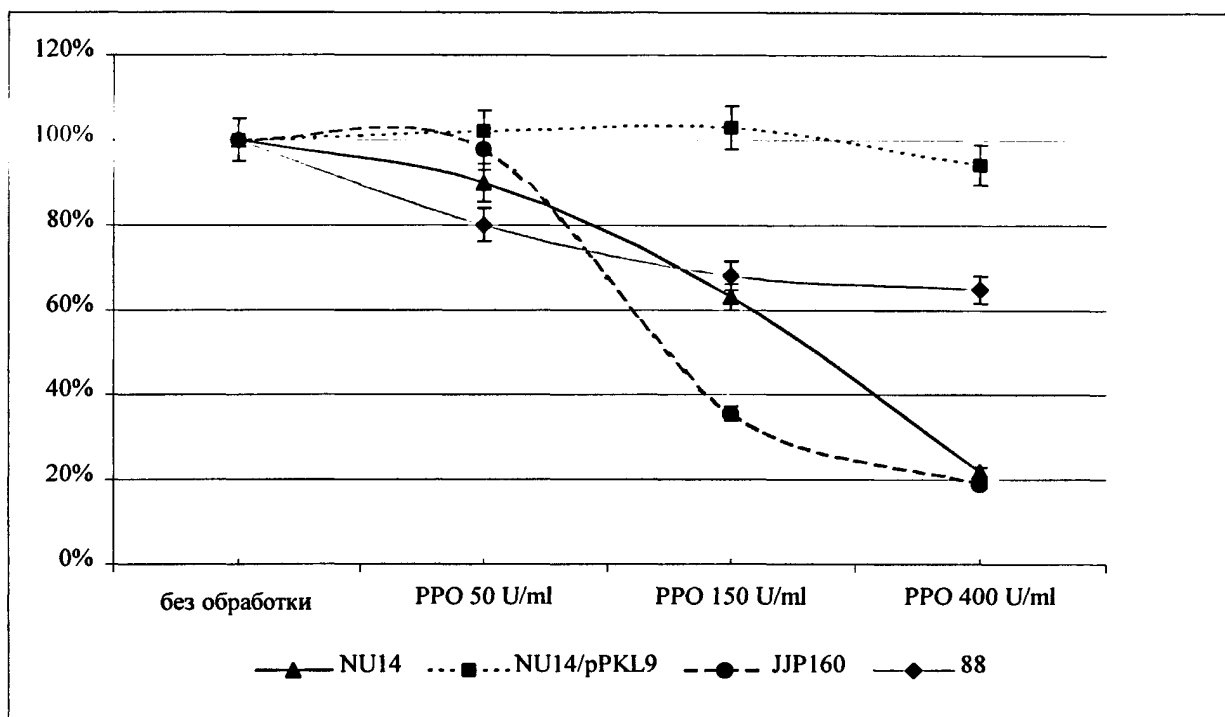


Рис. 13 . Влияние различных концентраций PPO на уровень адгезии *E.coli* к эритроцитам

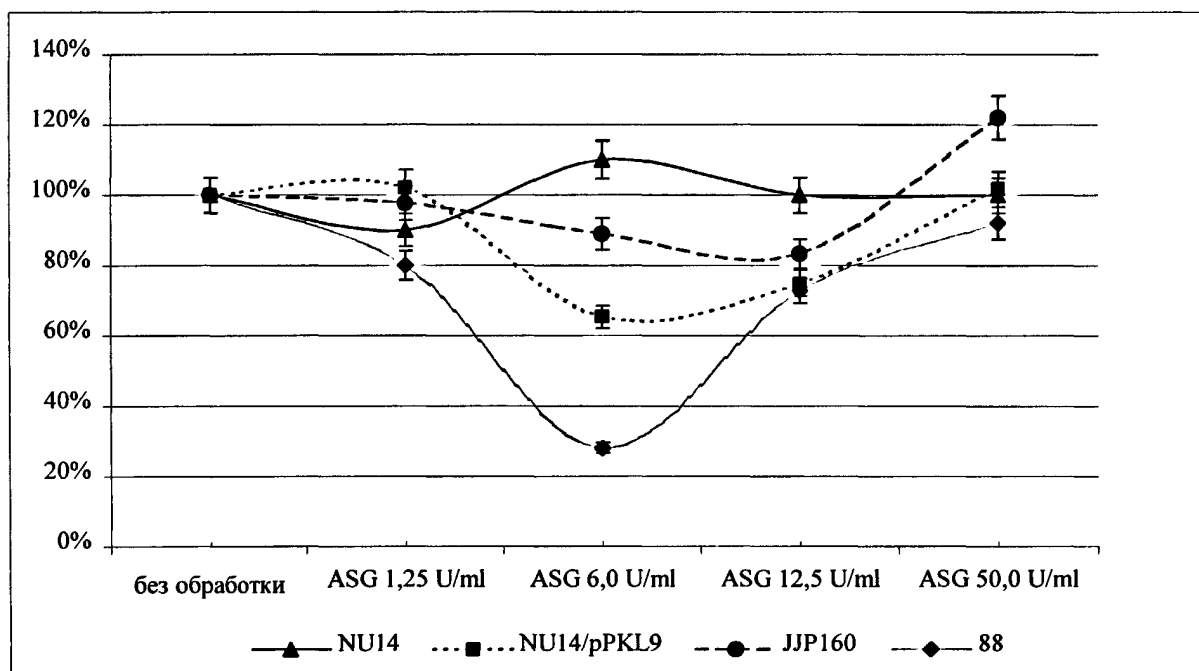


Рис. 14 Влияние различных концентраций ASG на уровень адгезии *E.coli* к эритроцитам

5.2.3. Исследование влияния ферментов *L*-Аспарагиназы и Полифенол оксидазы на адгезию патогенных *E.coli* к эритроцитам

Показано, что изучаемые ферменты по-разному воздействуют на адгезивность патогенных *E.coli* (табл. 21). При обработке ASG для всех штаммов отмечено снижение адгезии от 23% (штамм JJP160) до 71.9% (штамм 88). Штамм NU14 при обработке ASG увеличил уровень адгезивной активности на 15,8%; однако, вариант штамма NU14 с экспрессией синтеза пилий I типа NU14/pPKL9 снизил способность к адгезии на эритроцитах на 34,7%. PPO вызвала как снижение адгезивности (штаммы NU14, 88, JJP160, O157:H7 (212)) так и ее увеличение (штаммы 407, JJF10). Корреляции между действием обоих ферментов на штаммы не обнаруживается. ($r_s = -0.41$)

Таблица 21

Адгезивность *E.coli* к эритроцитам до и после обработки ферментами ASG и PPO

Штамм	До обработки		ASG 6 U/ml		PPO 400 U/ml	
	СПА	К%	СПА	К%	СПА	К%
NU14	0,95±0,06	62,5±5,98	1,1±0,03	68,5±4,56	0,2±0,02	59,5±5,46
NU14/pPKL9	5,97±0,95	98,7±9,72	3,9±0,41	96,0±4,72	5,7±0,20	95,4±7,74
407	2,90±0,11	89,7±7,46	1,7±0,22	69,7±8,48	5,2±0,12	69,7±6,79
88	2,51±0,12	47,9±8,78	0,7±0,20	38,3±6,56	1,6±0,12	42,4±6,78
JJF10	0,98±0,04	51,2±4,78	0,6±0,03	52,6±5,53	2,3±0,08	58,4±6,22
JJP160	0,92±0,16	50,0±6,54	0,8±0,08	52,3±7,48	0,2±0,09	69,9±9,76
391	0,83±0,13	54,8±7,84	0,7±0,06	52,5±6,65	1,0±0,07	51,5±9,05
O157:H7(212)	1,94±0,32	79,6±5,89	1,6±0,14	69,3±6,88	1,0±0,09	73,9±8,33

5.2.4. Исследование влияния ферментов ASG и PPO на адгезию патогенных *E.coli* к клеткам зашечного эпителия

На модели клеток зашечного эпителия так же показан неодинаковый уровень снижения адгезивной активности патогенных *E.coli* (табл. 22) под воздействием ASG и PPO ($r_s = 0.25$). При обработке ASG наибольший уровень снижения адгезии наблюдается у штамма 88, что совпадает в результатами, полученными на модели эритроцитов. Полифенол оксидаза оказывает меньший по сравнению с *L*-Аспарагиназой эффект снижения уровня адгезии на модели клеток зашечного эпителия. В целом результаты, описывающие процентное изменение уровня

адгезии микроорганизмов, сопоставимы для обеих моделей: модели эритроцитов и буккальных клеток, особенно для ASG ($r_s=0.80$ для ASG и $r_s=0.2$ для PPO). Полученные данные свидетельствуют об участии в процессе адгезии одинаковых адгезинов. Тот факт, что ферменты на модели буккальных клеток снижали уровень адгезии микроорганизмов в меньшей степени говорит, возможно, о вероятном участии в адгезивном процессе дополнительных механизмов (например, образовании оснований Шиффа).

Таблица 22

Адгезивность *E.coli* к клеткам защечного эпителия до и после обработки ферментами ASG и PPO

Штамм	До обработки		ASG 6 U/ml		PPO 400 U/ml	
	СПА	К%	СПА	К%	СПА	К%
NU14	6,4±1,45	63,5±3,54	6,0±2,03	65,5±3,89	6,12±1,52	60,1±3,78
NU14/pPKL9	28,2±2,95	98,4±8,56	16,0±2,56	94,0±5,98	27,0±2,22	97,3±6,45
407	21,2±2,15	92,5±4,52	17,5±3,55	89,5±3,88	38,1±4,21	98,9±3,45
88	45,6±3,21	98,9±3,45	20,0±2,25	92,1±5,02	40,2±4,15	97,8±6,04
JJF10	84,7±5,12	99,9±2,78	55,3±4,12	97,9±4,21	65,9±6,01	98,7±4,56
JJP160	23,2±3,76	92,5±5,52	18,5±2,48	89,9±5,78	24,9±3,18	87,8±6,15
391	60,0±4,15	99,9±3,45	58,0±3,78	99,8±4,01	58,0±3,00	99,9±3,98
O157:H7(212)	65,4±5,12	99,9±3,01	64,5±4,87	99,9±3,12	67,5±4,55	99,9±2,05

5.2.5. Исследование влияния ферментов ASG и PPO на адгезию *E.coli* к иммобилизированным субстратам

Тест «Исследование адгезии к иммобилизированным субстратам» проводился с целью выяснения способности ферментов ASG и PPO влиять на уровень адгезивности штаммов, имеющих различный FimH адгезивный фенотип. В опыте исследовались штаммы *E.coli* K12 (M^L), KB53 (MF), NU14 (M^H -коллаген связывающий), Foch (гибридные пили I и F1C типа), M-17 (M^H). ИР проводили по стандартной схеме. Штаммы трансформировались плазмидой pPKL9, несущей дополнительную копию регуляторного гена *fimB*. В качестве субстратов для адгезии использовали дрожжевой маннан (10 мкг/мл), РНКаза В (10 мкг/мл) и BSA (0,1 %) для определения уровня адгезии. Чтобы определить ингибирование адгезивной

активности микроорганизмов в определенные лунки добавляли 1% б-метил-мономаннозид (б-ММП). Время иммобилизации субстрата – 1 час, время инкубации с бактериальной суспензией – 40 минут, измерение оптической плотности через 2 часа 30 минут инкубации со средой. Обработку ферментами проводили на стадии адгезированной к субстрату бактериальной культуры, перед добавлением среды на последней стадии отмывали от фермента 2 раза, что бы полностью исключить бактериостатический эффект. Радионуклеидное исследование адгезии проводили по той же схеме, но 12 часовые бактериальные культуры выращивались на среде тимидином ^3H и на последней стадии следовали по методике, описанной в главе материалы и методы. Из таблицы 23 видно, что исследуемые штаммы имеют разные субклассы по адгезивности.

Таблица 23

Связывание штаммов *E.coli* с различными адгезивными фенотипами с три – и моно – маннозидными рецепторами

E.coli	Связывание с РНКазой В		Связывание с маннаном		Связывание с BSA		Фенотипический субкласс
	+б-		+б-		+б-		
	ММП		ММП		ММП		
K12	++++	-	+	-	-	-	M ^L
KB53	++++	-	+++	-	-	-	MF
NU14	++++	-	+++	-	-	-	M ^H -коллаген связывающий
Foch	+++	-	++++	-	-	-	гибридные пили I и F1C
							типа
M-17	++++	-	+++	-	-	-	M ^H

Примечание: все штаммы несли плазмиду pPKL9 (дополнительную копию гена fimB)

Штамм K-12 проявляет высокий уровень связывания с РНКазой В ((ман)₃BSA) и низкий с маннаном ((ман)BSA), что позволяет отнести его к M^L низкоадгезивному фенотипу. KB 53 – рекомбинантный вариант, несущий fimH кинического изолята при цистите CI 4, обладает высоким уровнем адгезии к РНКазе В и маннану, тот факт, что он проявляет умеренную способность связывания с фибронектином (в отличии от штаммов с M^H фенотипом, которые с фибронектином не связываются), характеризует его адгезивный фенотип как MF. Штамм NU14 – клинический изолят, выделенный у больных циститом имеет M^H адгезивный фенотип, но обладает выраженной способностью связываться к коллаген [146]. Штамм Foch обладает

гибридными пептидами I типа, в которых в 185 – 279 положениях FimH протеина аминокислоты заменены на соответствующие из гомологичного протеина FocH, структурной единицы FIC пилий. Штамм с таким фенотипом характеризуется сниженным уровнем триманнозной адгезии и увеличением мономаннозной [161]. Штамм M-17 обладает M^H адгезивным фенотипом [59].

Обработка ферментами микроорганизмов способствовала ингибированию или продуцированию адгезинов. Визуально это выражалось изменением количества бактерий, связавшихся с субстратами. Результаты, приведенные в таблице 24, показывают процент связавшихся бактерий относительно контрольного уровня (100%). Более эффективным ингибитором адгезии на этой модели проявила себя PPO в обеих концентрациях. Наиболее чувствительным к действию фермента оказался штамм Foch (> 50% снижения адгезии). Такая отличная от других штаммов реакция на действие PPO, вероятно, связана с гибридным строением адгезина Foch, заменой аминокислотных остатков в положении 185-279, что может свидетельствовать о важности именно этого участка (так называемого «мостика») в процессе связывания с маннозидами.

Таблица 24

Влияние ферментов ASG и PPO на связывание *E.coli* с три – и моно – маннозидами

E.coli субстрат		Процент клеток, связавшихся с субстратом							
		Исследование адгезии к иммоб. субстратам				Радионуклеидное исследование адгезии			
		PPO (ЕД/мл)		ASG (ЕД/мл)		PPO (ЕД/мл)		ASG (ЕД/мл)	
		50	400	1,5	12	50	400	1,5	12
M-17	РНКазаВ	87,8	100,0	84,3	75,0	98,4	100,0	103,0	99,5
	Маннан	90,3	100,0	86,4	80,0	ND	ND	103,0	106,3
K-12	РНКазаВ	62,7	89,1	91,0	78,4	98,5	88,5	86,6	75,7
	Маннан	83,2	70,1	102,0	103,0	100	85,6	107,0	105,6
KB53	РНКазаВ	105,0	ND	96,0	76,0	ND	ND	104,0	116,0
	Маннан	100,0	ND	102,0	85,5	ND	ND	95,7	100,0
Foch	РНКазаВ	58,0	42,0	119,0	116,0	94,1	97,1	92,6	101,6
	Маннан	60,2	54,3	105,0	110,0	ND	ND	108,0	110,3
NU14	РНКазаВ	88,8	86,1	102,5	91,7	103,0	98,3	100,0	100,0
	Маннан	95,4	89,3	100,0	97,3	101,0	103,0	84,3	105,0

Примечания: все штаммы несли плазмиду рPKL9 (дополнительную копию гена

fimB).

ND – нет данных

Тест радионуклеидного исследования адгезии показал себя менее чувствительным в данной серии экспериментов по сравнению с моделью «Исследования адгезии к иммобилизованным субстратам».

* * *

Приведенные в этой главе опыты характеризуют действие ферментов на процесс связывания пилий I типа с маннозидами. Наблюдается их значительно менее выраженный антиадгезивный эффект, нежели чем на модели эукариотических клеток. Вероятно, это связано со способностью штаммов связываться не только с маннозидами, но и с другими рецепторами, не имеющими терминальных маннозных остатков, такими, как коллаген, фибронектин и др., а так же наличием у штаммов маннозорезистентных типов пилий.

5.2.6. Исследование влияния ASG и PPO на величину связывания очищенного протеина FimH с пероксидазой хрена в реакции ELISA

Исследование влияния ASG и PPO на величину связывания очищенного протеина FimH с пероксидазой хрена проводили с использованием реакции ELISA в нашей модификации. В основу этого метода легло предположение о способности очищенного протеина FimH связываться не только с маннозидными и другими субстратами, но и непосредственно с ферментом – пероксидазой хрена. Исследования проводили по следующей схеме. На пластик адсорбировался протеин FimH, использовалась концентрация 20 мг/мл. Затем добавлялись ферменты и в каждый второй ряд б-ММП. После отмывания добавлялся конъюгат (с пероксидазой хрена HRP) в разведении 1/500. Испытывались различные концентрации конъюгата (от 1/10000 до 1/10), однако оптимальной оказалась концентрация 1/500. Затем добавлялся субстрат-хромоген для пероксидазы хрена. Результаты оценивали по интенсивности окрашивания на ФЭКе. Результаты показывают, что преинкубация адсорбированного на пластике FimH протеина с ASG 1.5 и 12 ЕД/мл вызвала уменьшение его способности связываться с HRP на 28 и 40% соответственно; преинкубация с PPO в концентрации 50 и 400 ЕД/мл вызвала уменьшение связывания на 57 и 48,5% соответственно (табл. 25). Эта реакция характеризует способность ферментов препятствовать образованию связей между FimH протеином (компонентом пилий I типа) и неманнозилированным субстратом (HRP). В образовании таких связей, по-видимому, принимает участие иной домен

протеина FimH, нежели при связи с маннозидными рецепторами и этот домен более чувствителен к ингибирующему действию ферментов PPO и ASG.

Таблица 25

Влияние ферментов PPO и ASG на величину связывания очищенного протеина FimH с пероксидазой хрена

Без обработки	Обработка			
	PPO (ЕД/мл)		ASG (ЕД/мл)	
	50	400	1,5	12
Снижения уровня связывания Fim H с относительно контроля (100 %)				
100%	43%	51,5%	72%	60%

5.3. Влияние комплексного воздействия НИЛИ и ферментов ASG и PPO на уровень адгезии *E.coli*

На первой стадии исследования охарактеризована эффективная последовательность воздействия НИЛИ и фермента на штаммы патогенных *E.coli*. В качестве субстрата использовались эритроциты. Доказано, что почти во всех случаях (5 из 8) больший уровень снижения адгезии наблюдался при комплексной обработке сначала НИЛИ, затем ферментов (использовали ASG в концентрации 6 ЕД/мл). При последовательности обработки фермент – НИЛИ эффект снижения адгезии приблизительно равен таковому при монообработке ферментом и НИЛИ, в ряде случаев несколько выше (JJF10) ($p < 0.05$) или ниже (407) ($p < 0.05$) (Рис.15). К% достоверно не изменялся при обработке в обеих последовательностях ($p > 0.05$) почти для всех штаммов. Возможно, это связано с тем, что предшествующая лазерная обработка меняет конформацию адгезина, делая остатки аспарагина более доступными для действия фермента.

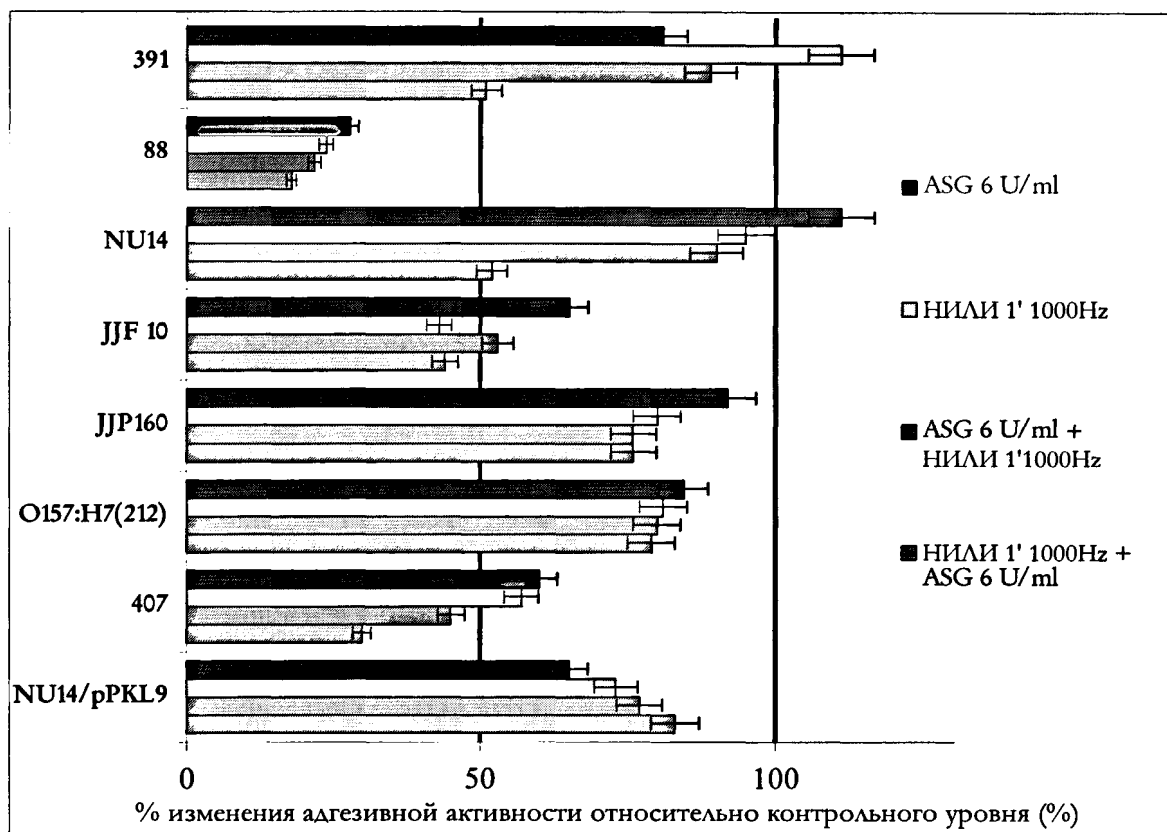


Рис. 15 Снижение адгезивной активности *E.coli* к эритроцитам при комплексной обработке НИЛИ и ASG

Комплексное воздействие НИЛИ и ASG исследовалось и на модели клеток зашечного эпителия. На рис показан эффект комплексного воздействия по сравнению с монообработкой НИЛИ и ASG (% адгезированных микроорганизмов по сравнению с исходным уровнем). Видно более выраженное снижение адгезивности при комплексной обработке, причем данные полученные на клеток ЗЭ умеренно коррелируют с полученными на модели эритроцитов ($r_s=0,49$) (рис.16).

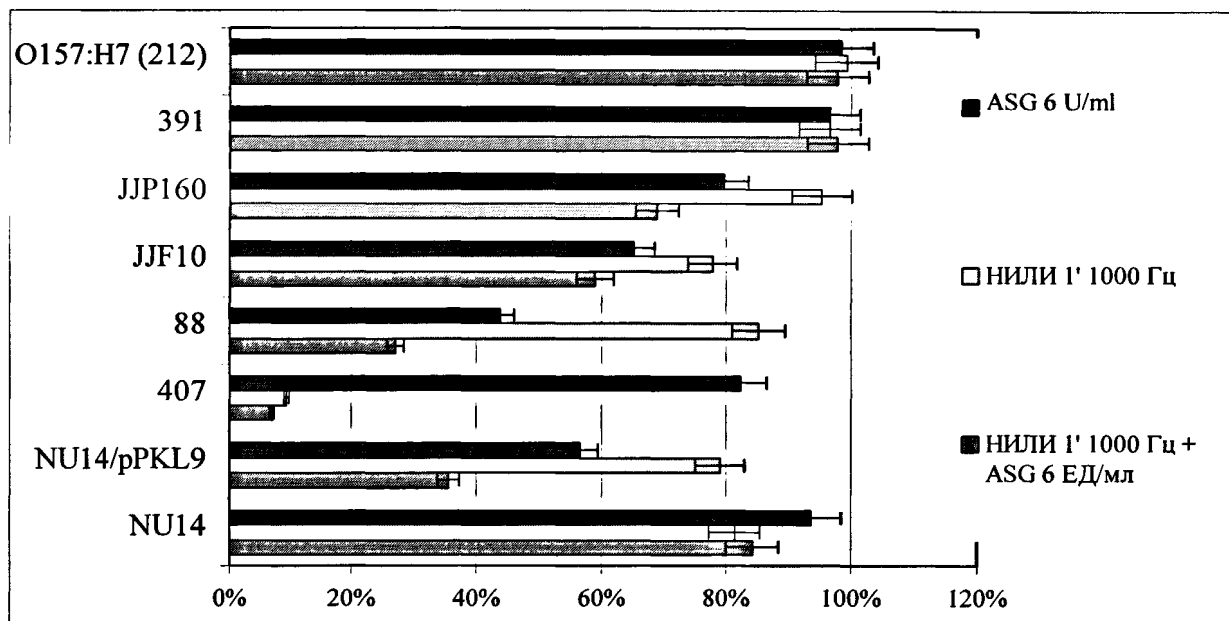


Рис 16. Влияние комплексной обработки НИЛИ и ASG на адгезию *E.coli* к клеткам защечного эпителия

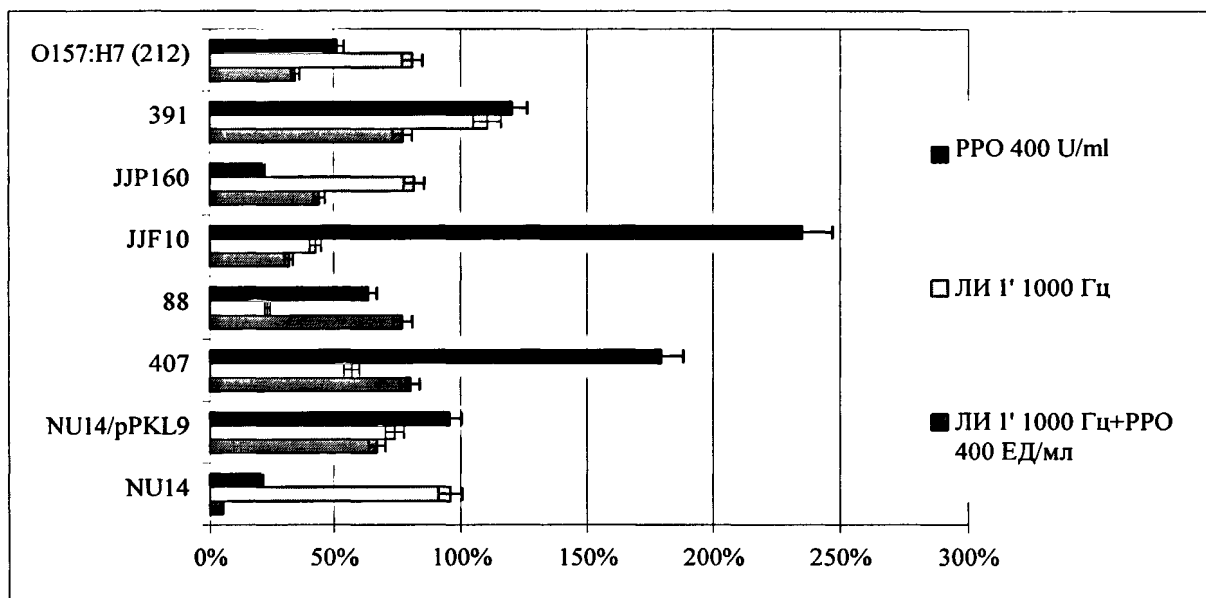


Рис. 17. Снижение адгезивной активности *E.coli* к эритроцитам при комплексной обработке НИЛИ и РРО

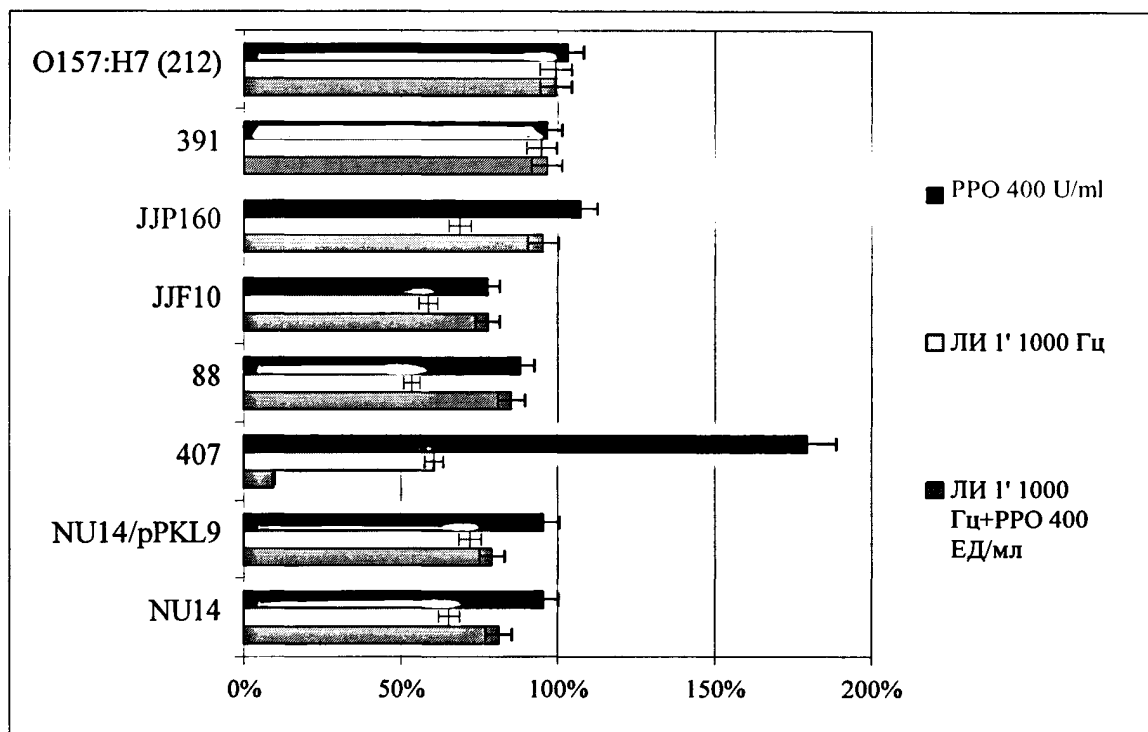


Рис. 18. Влияние комплексной обработки НИЛИ и РРО на адгезию *E.coli* к клеткам защежного эпителия

При исследовании влияния РРО на уровень адгезии патогенных кишечных палочек так же установлено, что фермент обладает более выраженной способностью снижать данный показатель на модели адгезии к эритроцитам (рис. 17 и 18).

5.4. Влияние НИЛИ и ферментов РРО и ASG на адгезивную активность пробиотиков

В качестве пробиотиков использовались штаммы *E.coli*: M-17, M-17/pColap, M-17 fimH::ntp, M-17 fimH::ntp/pColap [59], M-17/ pCollacZ, M-17 fimH::ntp/ pCollacZ; *Lactobacillus fermentum* 90-TS-4(21) [Рожкова И.Ю., 1998]. Исследование влияния ферментов и НИЛИ проводилось на модели эритроцитов и модели клеток защежного эпителия. Контроль за экспрессией синтеза пилий I типа для штаммов *E.coli* проводили, используя тест агрегации дрожжей. Показано, что штаммы *E.coli* M-17, M-17/ pColap, M-17/ pCollacZ вызывают агглютинацию дрожжей до разведения 1:64, тогда, как штаммы M-17 fimH::ntp/ pCollacZ, M-17 fimH::ntp, M-17 fimH::ntp/pColap дрожжи не агглютинируют. В присутствии б-ММП происходит блокирование агглютинации. Это характеризует штаммы по

маннозочувствительным пилим I типа. Результаты, приведенные в табл. 26 показывают значительно меньший эффект, оказываемый НИЛИ и ферментами на адгезию штаммов-пробиотиков по сравнению со штаммами патогенных *E.coli*. Причем, штаммы, экспрессирующие пили I типа, практически не изменяют уровень адгезии при обработке НИЛИ и ферментами, у штаммов с дефектным геном синтеза пилий I типа и *Lactobacterium fermentum* 90-TS-4(21) наблюдается некоторое увеличение адгезии к эритроцитам и клеткам защежного эпителия. Эти результаты позволяют предположить возможное использование ферментов и НИЛИ одновременно с пробиотиками для профилактики и/или лечения инфекций, вызванных чувствительными к ферментам и НИЛИ микроорганизмами.

Таблица 26.

Влияние воздействия НИЛИ и ферментов на адгезивную активность пробиотиков

Штамм	Число бактерий на 1 клетку			
	Без обработки	НИЛИ	ASG 6.0 ЕД	РРО 400 ЕД
Эритроциты				
<i>E. coli</i> M-17	2,2±0,32	2,5±0,20	2,0±0,15	2,3±0,24
<i>E. coli</i> M-17 pColap	3,0±0,25	2,8±0,20	2,8±0,40	2,5±0,14
<i>E. coli</i> M-17 fimH::ntp/pColap	0,8±0,10	1,0±0,14	0,9±0,13	0,9±0,18
<i>E. coli</i> M-17 fimH::ntp	0,8±0,10	1,2±0,12	0,7±0,14	1,4±0,22
<i>E. coli</i> M-17 fimH::ntp/pCollacZ	1,1±0,21	1,5±0,20	1,2±0,13	2,0±0,17
<i>E. coli</i> M-17 pCollacZ	3,1±0,19	3,0±0,17	3,1±0,16	2,7±0,21
<i>L.fermentum</i> 90-TS-4(21)	3,8±0,22	2,0±0,10	1,5±0,32	3,5±0,27
Клетки 3Э				
<i>E. coli</i> M-17	8,1±0,31	7,9±0,32	7,8±0,40	9,8±0,60
<i>E. coli</i> M-17 pColap	6,9±0,42	-	6,9±0,33	6,9±0,42
<i>E. coli</i> M-17 fimH::ntp/pColap	3,8±0,21	-	4,3±0,40	3,6±0,33
<i>E. coli</i> M-17 fimH::ntp	4,0±0,18	3,9±0,21	4,0±0,31	5,7±0,29
<i>E. coli</i> M-17 fimH::ntp/pCollacZ	3,6±0,19	4,0±1,13	3,9±0,33	3,5±0,41
<i>E. coli</i> M-17 pCollacZ	7,2±0,38	6,8±0,20	7,0±0,40	6,9±0,44
<i>L.fermentum</i> 90-TS-4(21)	10,2±0,41	9,0±1,1	13,3±0,62	10,2±0,45

ГЛАВА 6. ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРОБИОТИКОВ НА МОДЕЛИ IN VIVO

6.1. Отработка модели дисбактериоза на мышах

В литературе описаны различные подходы к моделированию дисбактериоза у животных. Известны модели дисбактериозы, вызванные голоданием, тотальной кровопотерей, радиационным облучением, введением антибиотиков [5]. В наших исследованиях мы использовали методику интрагастрального введения антибиотика - ампиокса. Доказано, что введение мышам больших доз ампиокса сопровождается значительным снижением клеточного и гуморального антиэндоксинного иммунитета [28,34,60]. Параллельно мы исследовали изменение состава нормофлоры при однократном введении доксициклина в дозе 0,2 мг. Количество микроорганизмов выражали в lg КОЕ/г фекалий.

После однократного введения доксициклина (табл. 27 и рис 19) наблюдались следующие изменения в составе фекальной микрофлоры: увеличение количества грибов рода *Candida* (на 2 lg) и снижение количества лактозопозитивных *E.coli* (на 4 lg). При этом все животные выглядели удовлетворительно.

Таблица 27

Изменение количественного состава фекальной микрофлоры беспородных мышей после обработки доксициклином (0,2 мг/ 1 сутки)

микроорганизм	lg КОЕ/ г	
	До обработки	После обработки
<i>Bifidobacterium</i> spp.	9.0±1.8	9.0±1.5
<i>Lactobacillus</i> spp.	8.8±2.2	8.0±1.9
<i>E.coli</i> (лак.позит.)	7,3±2,0	3,0±1,4
<i>E.coli</i> (лак.негат.)	-	-
<i>Proteus</i> spp.	2.0±0.5	2.0±0.5
<i>Candida</i> spp.	0.0±0.5	2.0±1.0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4.0±0.0	4.0±0.5

*В таблице приведены средние данные 2 экспериментов; в каждой группе было по 10 животных.

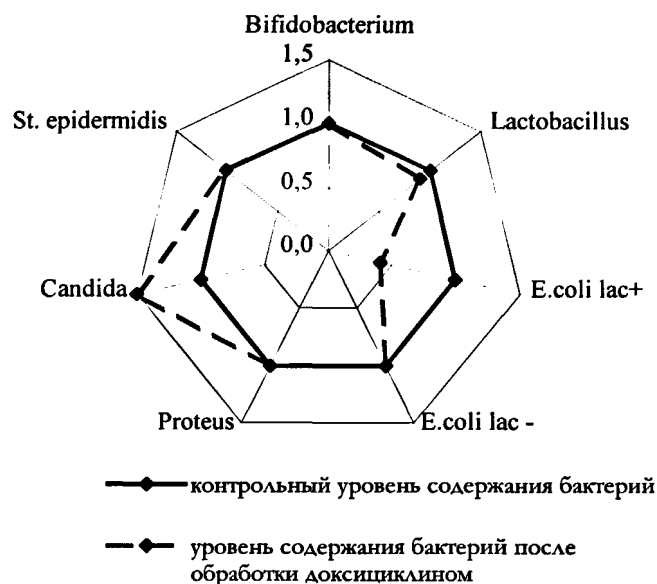


Рис. 19. Изменение состава микрофлоры мышей в % относительно контрольного уровня под воздействием доксициклина 0,2 мг однократно

При изучении влияния ампиокса на состав микрофлоры показано более резкое изменение состава микрофлоры (рис. 20 и табл. 28). Так увеличивалось количество лактозонегативных *E. coli* (более чем на 5,0 lg), умеренно (примерно на 2,0 lg) росло содержание лактозопозитивных кишечных палочек и грибов рода *Candida* (на 2,0 lg), резко увеличивалось содержание *Proteus* spp. (более чем на 5,0 lg). На 1,0 lg увеличивалось содержание *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* и *Enterococcus* sp. При этом содержание молочнокислых бактерий (*Bifidobacterium* и *Lactobacillus*) и бактерий рода *Clostridium* не изменялось. Вследствие более глубоких изменений состава кишечной микрофлоры в последующих экспериментах использовался ампиокс. (рис. 20 и табл. 28).

Из литературных данных известно, что маркером нарушения КР у животных, получавших ампиокс, помимо изменений в составе фекальной микрофлоры, служит транслокация кишечной флоры во внутренние органы. Исследовались мыши линии C57Bl, получавшие ампиокс 4 мг/сутки в течение 10 дней (количество животных каждой группы – 10). Наблюдалась транслокация лактозонегативной кишечной флоры (*E. coli*, *Proteus*) в легкие, почки, тимус и печень, селезенка и кровь оставались стерильны. В контрольной группе животных (не получавших ампиокс) все органы и кровь оставались стерильны. Полученные результаты коррелируют с литературными данными о том, что наибольшим уровнем транслокации обладает

кишечная палочка [41,90,186], и о том, что одним из пусковых механизмов транслокации служит чрезмерный рост кишечной флоры [115].

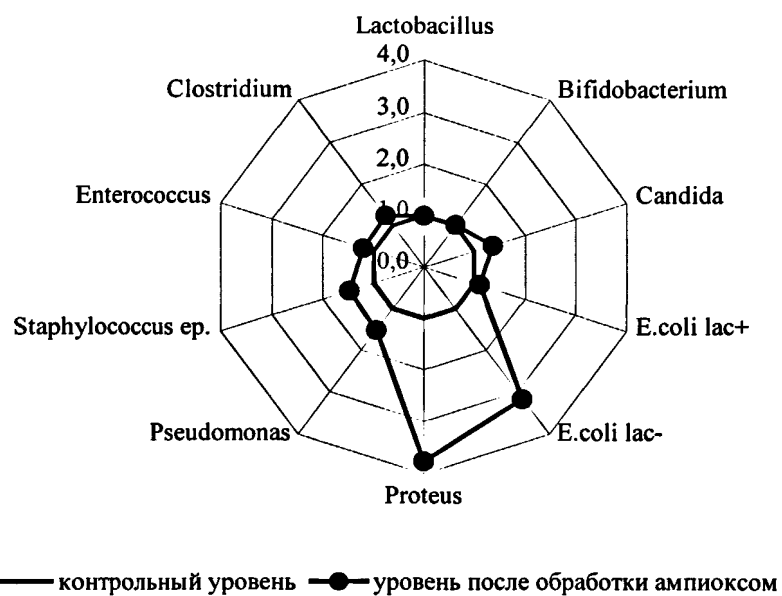


Рис. 20. Изменение состава микрофлоры мышей в % относительно контрольного уровня под воздействием ампиокса 4 мг/ сутки в течение 10 суток

Таблица 28.

Изменение количественного состава фекальной микрофлоры мышей линии С57В1 после обработки ампиоксом

(4 мг/сутки 10 дней)

группа	№ животного		Lactobacillus spp.		Bifidobacterium spp.		Candida spp.		E.coli (lac+)		E.coli (lac-)		Proteus spp.		Pseudomonas aeruginosa		S.epidermidis		Enterococcus faecium		Clostridium spp.	
	0 сутки	10 сутки	0 сутки	10 сутки	0 сутки	10 сутки	0 сутки	10 сутки	0 сутки	10 сутки	0 сутки	10 сутки	0 сутки	10 сутки	0 сутки	10 сутки	0 сутки	10 сутки	0 сутки	10 сутки	0 сутки	10 сутки
Экспериментальная группа	1	6,0	6,1	9,3	ND	6,0	8,0	5,5	7,4	5,2	8,1	4,0	9,0	3,0	4,0	2,1	0	4,2	3,0	5,0	6,0	
	2	7,3	7,2	9,5	7,3	6,2	8,1	5,2	7,2	5,2	9,1	4,0	9,0	3,0	5,0	0	0	4,3	5,8	7,0	4,0	
	3	6,9	6,8	10,0	11,2	5,6	7,3	7,5	9,2	0	0	0	2,0	3,0	5,0	2,3	4,0	0	2,6	3,0	3,0	
	4	6,2	6,1	9,2	9,2	6,0	8,3	6,6	7,1	0	7,5	0	2,0	4,0	6,0	2,2	5,0	5,2	5,6	4,0	4,0	
	5	6,3	6,4	8,2	9,0	5,8	8,2	ND	8,5	0	7,9	0	2,0	4,0	5,0	2,4	5,8	5,3	6,4	4,0	4,0	
Контрольная группа	6	7,0	7,1	10,2	11,0	5,3	7,3	ND	8,3	7,5	8,3	0	0	3,0	5,0	2,1	4,0	4,1	ND	4,0	4,0	
	7	6,7	6,7	10,4	10,8	5,3	ND	ND	7,9	0	6,8	0	0	4,0	5,0	0	0	0	2,7	3,0	4,0	
	8	7,1	7,1	9,2	9,0	6,2	8,0	ND	7,4	0	7,0	0	0	3,0	5,0	0	0	5,0	5,2	0	4,0	
	9	6,6	6,5	9,8	10,6	5,7	7,8	ND	8,0	0	7,3	0	3,0	3,0	5,0	2,1	0	5,0	5,1	0	ND	
	10	6,2	6,3	9,5	8,9	6,0	8,1	ND	ND	0	ND	0	ND	3,0	ND	2,1	ND	3,5	3,4	0	0	
Контрольная группа	11	6,9	6,8	10,3	11,0	6,2	6,1	6,0	7,0	0	0	4,0	1,0	2,0	3,0	3,5	3,5	5,5	5,2	6,0	4,0	
	12	6,5	6,5	10,3	10,2	5,0	5,0	7,9	7,6	0	0	0	0	3,0	3,0	1,4	1,0	4,2	4,2	0	4,0	
	13	7,0	7,2	10,1	10,0	6,5	7,0	ND	7,0	0	0	0	0	4,0	5,0	2,3	3,5	5,3	5,1	7,0	5,0	
	14	7,0	7,0	10,2	9,0	6,2	5,9	ND	5,0	0	0	0	0	3,0	4,0	2,1	2,0	4,9	4,2	4,0	4,0	
	15	7,0	7,0	10,6	9,5	5,7	7,2	ND	7,4	0	0	0	0	3,0	4,0	2,1	1,0	4,8	2,1	6,0	4,0	

Примечание: ND – нет данных

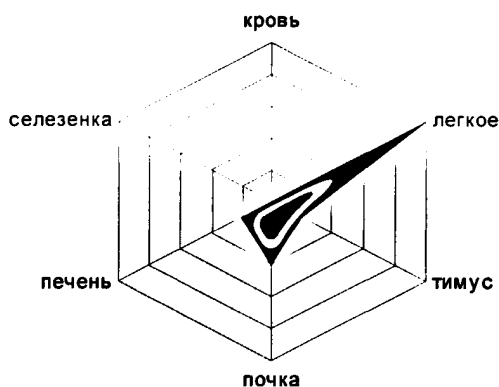


Рис. 19. Органо-тканевая транслокация лактозонегативной кишечной флоры у мышей с дисбактериозом

6.2. Моделирование инфекционного процесса, вызванного *E.coli* O157:H7

В качестве заражающих агентов использовались штаммы *E.coli* O157:H7 №23 и 212, так как при использовании этих штаммов и только на фоне дисбактериоза удалось получить LD₅₀ для *E.coli* O157:H7. Модельные животные – б/п мыши, в каждой группе не менее 5 животных. Животные были разделены на группы в зависимости от:

- длительности предварительной обработки ампиоксом (без обработки/обработкой в течение 5 дней/обработкой в течение 10 дней),
- способа заражения (per os/ внутрибрюшинно),
- инфицирующего штамма (23/212),
- жизнеспособности вводимой культуры (живая культура *E.coli* O157:H7/ убитая культура *E.coli* O157:H7 (прогретая при 70 °C в течение 30 мин),
- инфицирующей дозы.

Результаты оценивали по количеству павших животных в течение 5 суток. Результаты, представленные в таблице 29 показывают количество выживших животных (в % по отношению к исходному количеству). Показано, что пероральное заражение *E.coli* O157:H7 не вызывает гибели животных как в группе интактных мышей, так и группах, обработанных ампиоксом. При внутрибрюшинном заражении уже через 12 часов наблюдается развитие инфекции: животные становятся вялыми, шерсть всклокоченная. Убитая культура штамма 23 обладала значительно большей токсичностью, вызывая гибель до 100% животных, тогда, как штамма 212 при прогревании снижал патогенность. Вероятно, это связано с большим или меньшим

вкладом в патогенез инфекции эндо- и экзотоксинов. Известно, что экзотоксины, являясь сложными белками, разрушаются при нагревании, тогда, как эндотоксины, имеющие липополисахаридную природу, устойчивы к нагреванию. Таким образом, предположительно, для штамма 212 основная роль в развитии инфекции принадлежит экзотоксинам, для штамма 23 – эндотоксинам. Поскольку считается, что в развитии HUS основная роль принадлежит веротоксинам (экзотоксины), то для моделирования инфекции в дальнейших исследованиях использовали штамм 212 [27,92,109,155,193].

В дальнейших экспериментах была использована инфицирующая доза *E.coli* O157:H7 составляющая 1 млрд (10^9) КОЕ. Было показано, что инфекция моделируется лишь на животных с дисбактериозом, вызванным введением ампиокса в течение 10 суток).

Таблица 29.

Эффект заражения *E.coli* O157:H7 на выживаемость мышей (б/п) в эксперименте

Длительность приема антибиотика	№ штамма	Путь введения	Количество выживших животных (%) после заражения					
			Живой культурой <i>E.coli</i> O157:H7			Убитой культурой <i>E.coli</i> O157:H7		
			500 млн	1 млрд	2 млрд	500 млн	1 млрд	2 млрд
Ампиокс 5 суток	23	Per os	100	100	100	100	100	100
		В/бр.	60	80	40	40	0	0
	212	Per os	100	100	100	100	100	100
		В/бр.	100	80	0	100	100	60
Ампиокс 10 суток	23	Per os	100	100	100	100	100	100
		В/бр.	60	60	30	0	60	0
	23	Per os	10	100	100	100	100	100
		В/бр.	0	67	0	0	0	67
Без обработки (физ.р-р)	212	Per os	100	100	100	100	100	100
		В/бр.	50	30	0	100	100	100

6.3. Использование пробиотиков для профилактики и лечения инфекции, вызванной *E.coli* O157:H7

Инфекцию моделировали как описано в предыдущем разделе. В каждой группе было 10 животных (использовались беспородные мыши). Введение антибиотика прекращали за 1 сут до введения культуры штамма *E.coli* O157:H7 № 212. В качестве пробиотиков использовали Колибактерин, Биоспорин, Лактобактерин, Биофлор и генноинженерные варианты штамма *E.coli* M-17, M 17 fimH::ntp/pCillacZ. *Колибактерин* - одна доза (человеческая, ч.д.) содержит $1,2 \times 10^{10}$ КОЕ/0,5 мл; доза мышиная (м.д.) - $1,2 \times 10^7$ КОЕ/0,5 мл. *Лактобактерин* - одна человеческая доза (ч.д.) содержит 5×10^9 КОЕ/0,5 мл; доза мышиная (м.д.) - 5×10^6

КОЕ/0,5 мл. *Биоспорин* - 1×10^9 КОЕ/0,5 мл (человеческая доза - ч.д.); доза мышиная (м.д.)- 1×10^6 КОЕ/0,5 мл. *Биофлор* - одна доза (человеческая, ч.д.) препарата содержит не менее 3×10^6 КОЕ/0,5 мл; доза мышиная (м.д.)- $2,2 \times 10^3$ КОЕ/0,5 мл. Генноинженерные варианты использовались в концентрациях 1×10^{10} (ч.д.) и 1×10^7 КОЕ (м.д.).

Препараты использовали в виде растворов из лиофильно-высушенного состояния, кроме биофлора, представляющего собой суспензию. Генноинженерные штаммы выращивали при 37°C в течение 18 часов на чашках со средой МПА, причем посев производили на целлофан, положенный на твердую питательную среду. Такой способ позволяет использовать наращенную бактериальную массу, поскольку все биологически активные молекулы, продуцируемые штаммом не переходят в агар, а остаются на пленке.

Животные были поделены на группы (рис. 22):

1 группа начала получать пробиотик *рег ос* в двух дозировках (ч. д. и м. д.) 1 раз в сутки параллельно с антибиотиком за 5 дней до заражения;

2 группа начала получать пробиотик *рег ос* в двух дозировках (ч. д. и м. д.) 1 раз в сутки за два дня до заражения и получала его в течение 5 дней, т. е., 3 дня после заражения;

3 группа начала получать пробиотик *рег ос* в одной (человеческой) дозировке 1 раз в сутки через 1 день после заражения в течение 4 дней;

1 контрольная группа животные до заражения получали только антибиотик *рег ос*;

2 контрольная группа животные до и после заражения не получали ни каких препаратов. Данные исследований представлены на рис. 22.

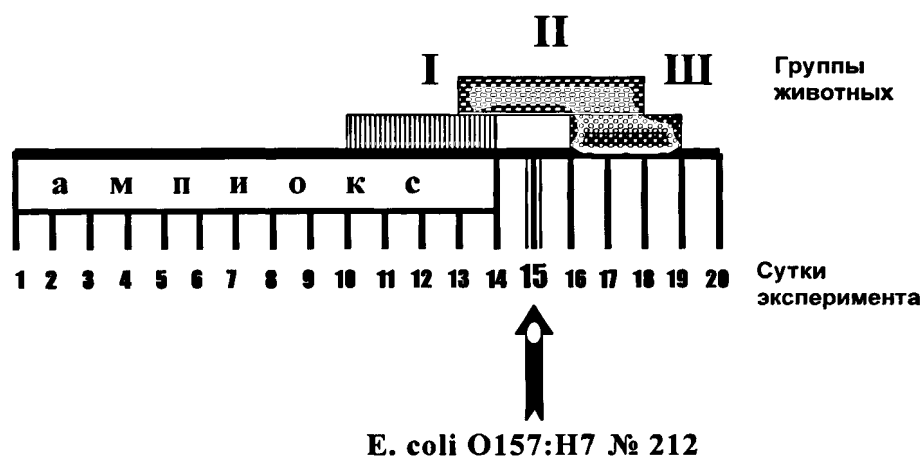


Рис. 22. Схема эксперимента по определению защитного действия пробиотиков

На следующие сутки после заражения все выжившие животные были вялыми, со включенной шерстью, наблюдалась диарея.

На вторые сутки у животных, получавших биофлор и биоспорин, отмечалась положительная динамика: мыши более активные, однако, шерсть включена, диарея продолжалась. В 1 и 2 контрольных группах животные чувствовали себя плохо (были вялыми, шерсть включена, диарея).

На третьи сутки животные, получавшие биофлор и биоспорин, чувствовали себя хорошо, в других группах у животных отмечалось улучшение состояния (диарея прекратилась, мыши более активные), кроме 1-й контрольной группы (диарея продолжается, мыши более активные, шерсть еще неопрятна).

На четвертые и пятые сутки животные, получавшие пробиотики, и животные 2 контрольной группы были практически здоровыми.

Из полученных данных видно, что у животных, получавших биофлор и биоспорин, быстрее наступало уменьшение выраженности симптомов инфекции, в связи с чем не исключено, что данные пробиотические препараты обладают антитоксической эффективностью.

Показан профилактический и лечебный эффект генноинженерных штаммов, а также ПБ различных групп (рис. 23). В первой группе животных наблюдалось выраженное профилактическое действие, наиболее четкий эффект был отмечен при приеме генноинженерных вариантов штамма *E.coli* M-17, колисодержащих препаратов (колибактерин и биофлор) и, а так же лактобактерина и биоспорина. Отмечено, что генноинженерные штаммы проявили выраженный защитный эффект как в “человеческой”, так и в “мышинной” дозах, колисодержащие ПБ оказывали профилактическое действие в “человеческой” дозе (10^9 КОЕ, 10^6 КОЕ для биофлора), а лактобактерин и биоспорин – в “мышинной” дозе (10^6 КОЕ). Во второй группе животных наблюдался выраженный протективный эффект при применении “мышинных” дозировок генноинженерного штамма *E.coli* M-17 fimH::npt/pCollacZ и биофлора, тогда как “мышинная” дозировка колибактерина оказалась неэффективной, высокое защитное действие проявил биоспорин в “человеческой” дозировке. В третьей группе все исследованные пробиотики проявили примерно равную (40-60%) протективную активность в “человеческой” дозировке. Животные контрольной группы, получавшие до заражения физиологический раствор (контроль 2) выжили в 80% случаев, тогда как в группе животных, получавших ампиокс *per os* (контроль 1), летальность составила 90%.

Следует отметить, что количество живых микробов в человеческой дозе биофлора на 4 порядка ниже, чем в колибактерине, при этом “мышинная” доза колибактерина превосходила человеческую биофлора на порядок. Следовательно, возможно экстракты растительных веществ, входящие в состав биофлора, стимулируют выработку *E.coli* M-17 антибиотических веществ против патогенных *E.coli* O157:H7.

Факт, что наибольший процент выживших животных приходился на 1 группу подтверждает ранее полученные результаты, свидетельствующие о том что развитие инфекции O157 с тяжелым характером течения происходит лишь на фоне сниженной КР организма, восстановление же флоры, даже только в течение 5 дней приводит к значительному увеличению сопротивляемости инфекции.

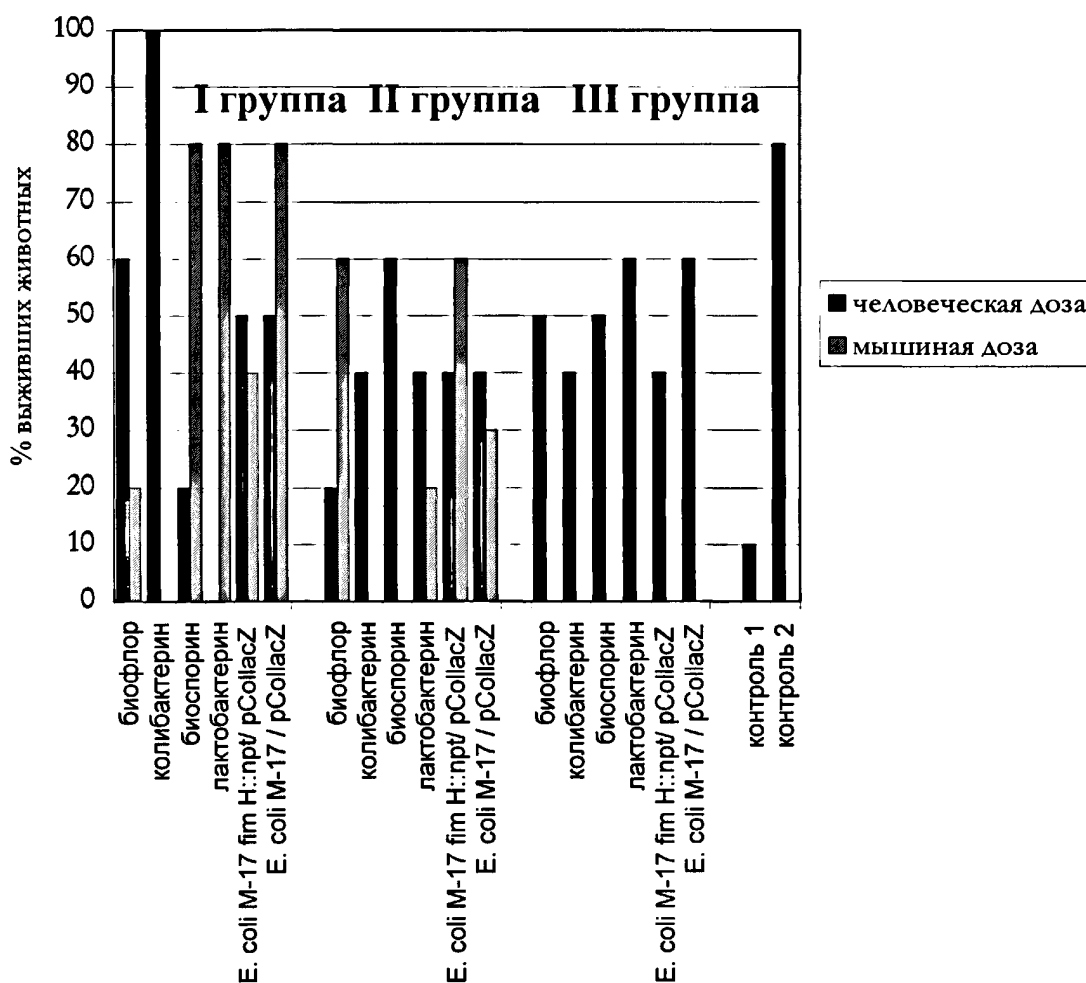


Рис. 23. Защитное действие пробиотиков против инфекции, вызванной *E.coli* O157:H7

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нормальная микрофлора обеспечивает колонизационную резистентность (КР) пищеварительного тракта, то есть устойчивость к колонизации условнопатогенными или патогенными бактериями [88]. В обычных условиях поддержание КР микрофлорой осуществляется за счет продукции антибиотических веществ, конкуренции за места адгезии, подавления адгезии условнопатогенных бактерий и ряда опосредованных механизмов [14,194]. Снижение КР микроорганизмов влечет за собой цепь неблагоприятных последствий, основное из которых – развитие дисбиоза, который во многих случаях является пусковым механизмом для развития инфекционных процессов различной этиологии [4,14,29,63].

Любой колонизационный процесс – колонизация пробиотиков, инфекция, - реализуется только при наличии комплекса факторов, характеризующих микро и макроорганизм. Для микроорганизма эти факторы включают в себя адгезивную активность, которую можно рассматривать как начальный этап любого колонизационного процесса, специфическую активность, реализуемую за счет высокой ферментативной деятельности, продукции антибиотических веществ, бактериоцинов и колицинов, способности изменять pH, и пр.; для патогенных микроорганизмов важную роль в процессе колонизации играет так же токсинопродукция, гемолитическая активность, выработка ферментов агрессии (гиалуронидаза, лецитиназы, протеиназы и др.).

Пробиотики давно и повсеместно применяют при дисбактериозах, кишечных инфекциях, таких, как шигеллез, дизентерия, сальмонеллез, инфекции вирусной этиологии и др.

Одним из первых отечественных ПБ является колибактерин. Штамм *E.coli* А. Ниссле [Перетц Л.Г., 1955], входивший в состав колибактерина, за годы эксплуатации утратил плазмиду, детерминирующую колициногенность, в связи с чем снизил антагонистическую активность в отношении ряда бактерий, чувствительных к действию колицина [Юхименко Л.Н. с соавт., 1968]. Таким образом, настоящая работа преследовала цель получить и исследовать новые рекомбинантные варианты производственного штамма М-17 способные к продукции колицина Е1 и обладающие вследствие этого повышенной антагонистической активностью.

В работе использован штамм *E.coli* M17 и его низкоадгезивный вариант *E.coli* M-17 *fimH::npt*, охарактеризованный Чесноковой В.Л. (1998) в качестве более подходящего для колонизации кишечника. Штаммам было придано свойство колициногенности с целью усиления их антагонистической активности. Колициногенность изначально была присуща пробиотическому *E.coli* M-17, однако, в процессе культивирования была утрачена. Возможное объяснение этому – наличие в плазмиде ColE1 области *mob*, определяющей способность плазмиды к коинтеграции с другими, в том числе конъюгативными плазмидами. В результате коинтеграции образуются гибридные плазмиды, которые, с одной стороны несут фактор колициногенности (*cea*) и устойчивости к нему (*imm*), с другой – содержат область *tra*, определяющую способность к конъюгативному переносу. Результатом конъюгативного переноса может быть, во-первых, приобретение другими бактериями, в том числе патогенными и условно патогенными, способности к синтезу колицина и устойчивости к нему, а во-вторых, потеря плазмиды и вследствие этого снижение антагонистической активности штамма – пробиотика. Таким образом, целью работы было получение колициногенной плазмиды, лишенной *mob* области. Для создания такой плазмиды, способной стабильно сохраняться в пробиотических штаммах *E.coli*, было использовано два подхода:

- удаление *mob* области родительской плазмиды ColE1 с помощью эндонуклеазы рестрикции BspLU11.I и лигирования полученных липких концов друг на друга;
- удаление *mob* области плазмиды ColE1 и вставка гена *lacZ* из плазмиды pUC19. Таким образом, получены две плазмиды, обозначенные как pCollacZ и ColДmob.

Полученные плазмиды были трансформированы в штамм TG1. Селекция велась путем отбора колоний устойчивых к колицину (для плазмид pCollacZ и ColДmob) или путем отбора синих колоний на среде, содержащей IPTG/ X-Gal. Отбор трансформантов штаммов *E.coli* M-17 и *E.coli* M-17 *fimH::npt* проводился на среде, содержащей колицин. Было показано, что через 10, 20 100 генераций при культивировании в среде, не содержащей селективного маркера, 100% исследованных клеток сохраняли полученные плазмиды. Все проверенные клетки несли признаки, детерминированные данными плазмидами. Доказано, что сконструированные плазмиды не мобилизуются, что устраняет опасность переноса плазмиды в патогенные и условно патогенные бактерии.

Таким образом, было подтверждено, что генетической основой нестабильности плазмиды и штамма ее содержащего, является область *mob*.

Далее исследовалась антагонистическая активность полученных рекомбинантных штаммов и ПБ различных групп в отношении *E.coli* O157:H7 и уropатогенных *E.coli* (UPEC) по методике отсроченного антагонизма.

Большинство исследованных пробиотиков обладали более выраженным антагонизмом по отношению к *Escherichia coli* O157:H7. Средний показатель антагонизма колисодержащих пробиотиков против *E.coli* O157:H7 составил $(23,5 \pm 1,9 - 31,3 \pm 0,55)$ мм, что достоверно выше, чем в отношении UPEC ($17,1 \pm 1,2 - 19,6 \pm 1,58$) мм.

Доказана высокая антагонистическая активность генноинженерных штаммов *E.coli* (*E.coli* M17/ pColap, *E.coli* M17 fimH::npt/ pColap, *E.coli* M17/ pCollacZ, *E.coli* M17/ ColДmob), колисодержащих ПБ (колибактерин, производственный штамм *E.coli* M-17 биофлор), а так же средняя - биоспорина и лактобактерина.

Пробиотики, обладающие наибольшим уровнем антагонистической активности к исследуемым патогенам, были выбраны для дальнейшего изучения в качестве средств профилактики и лечения заболеваний, вызванных патогенными *E.coli* O157:H7 и UPEC.

Важным показателем колонизационной активности является адгезивная активность. Для ПБ показатель адгезивной активности наряду с показателем антагонистической активности может служить характеристикой их терапевтической эффективности.

В качестве модели для сравнительного исследования адгезивности различных групп ПБ выбраны человеческие эритроциты В/II (Rh+). Эритроциты являются универсальной моделью для изучения адгезии разных микроорганизмов, так как имеют на своей поверхности гликофорин - гликопротеин, идентичный гликокаликсу эпителиальных клеток.

При исследовании адгезии определяли средний показатель адгезии (СПА), равный среднему количеству бактерий, прикрепившихся к одной эукариотической клетке, а так же показатель адгезии (К%), показывающий количество эукариотических клеток (%), несущих на своей поверхности адгезированные микроорганизмы. Уровень адгезивности различен у разных ПБ. Среди колисодержащих ПБ наибольший СПА характерен для колибактерина ($2,5 \pm 0,40$), производственного штамма *E.coli* M-17 ($2,2 \pm 0,30$) и варианта *E. coli* M-17 pCollacZ

(3.2 ± 0.25). Таким образом, показано, что введение сконструированных плазмид в штамм *E.coli* M-17 увеличивает его адгезивность к эритроцитам. Варианты *E. coli* M-17 *fimH::npt/pCollacZ* и *E. coli* M-17 *fimH::npt* обладают значительно более низким уровнем адгезивной активности (0.7 ± 0.10 и 0.6 ± 0.10) ($p < 0.05$) вследствие отсутствия гена синтеза пилей I типа *fimH*. Средний уровень адгезивности наблюдается у лактобактерина (3.2 ± 0.50) и бифидобактерина (1.7 ± 0.20). Среди споровых ПБ наибольшим уровнем адгезивности обладает биоспорин (2.6 ± 0.10), тогда, как СПА у бактиспорина и бактисубтила низок (0.4 ± 0.15 и 0.1 ± 0.10 соответственно). Низкий уровень адгезивности зафиксирован у энтерола (0.3 ± 0.15) и ацилакта (0.3 ± 0.10). Показатели К% у исследованных ПБ так же различались. Высокий К% показан у кишечных палочек с “включенным” геном синтеза адгезина *FimH*, лактобактерина, биоспорина, средний – у бактиспорина. Низкий К% проявляли кишечные палочки с дефектным геном синтеза пилей I типа *fimH*, бактисубтил, энтерол, ацилакт и бифидумбактерин. Известно, что показатель К% прямо зависит от количества рецепторов для адгезинов микроорганизмов. Таким образом, показано, что для колисодержащих ПБ адгезия играет важную роль при реализации колонизационной активности, тогда как для споровых ПБ, лактосодержащих ПБ и энтерола процесс адгезии менее значим.

Параллельно проводилось исследование адгезивной активности патогенных *E.coli* (O157:H7 [n=9] и уропатогенных кишечных палочек (UPEC) [n=14]). Все штаммы UPEC проявляют разный уровень адгезивности, который колеблется от 0.60 ± 0.16 до 2.89 ± 1.24 . СПА к эритроцитам у UPEC составляет 1.83 ± 1.20 . Штаммы *E.coli* O157:H7 также обладают различным уровнем адгезивной активности к эритроцитам. При этом СПА колеблется в более широком по сравнению с UPEC интервале: от 0.48 ± 0.23 до 9.95 ± 2.30 . Из данных литературы известно, что все исследованные штаммы *E.coli* O157:H7 одинаково патогенны и вызывали эпидемии в разных префектурах Японии (Armstrong G.D. et al., 1995, 1996; Isawa M. et al., 1999 и др.). Следовательно, для группы *E.coli* O157:H7 адгезивность не коррелирует с патогенностью. Однако, СПА для всей группы штаммов *E.coli* O157:H7 достаточно высок и составляет 3.45 ± 2.89 .

В обеих группах патогенных *E.coli* отмечен средний или высокий показатель К%. Следует отметить, что К% выше в группе UPEC, тогда как СПА выше в группе O157:H7. Это свидетельствует о том, что для UPEC, так же как и для нормальной кишечной палочки M-17 существует больше рецепторов на мембране эритроцитов.

Следовательно, возможна выраженная конкуренция между нормальными *E.coli* и UPEC, и, как следствие, возникает возможность применения колисодержащих ПБ для профилактики и лечения заболеваний, вызванных UPEC.

При дисбиозах одной из важнейших задач коррекции является удаление патогенов из экониш, одним из способов которого служит блокирование их адгезии к субстратам связывания. Исходя из механизма адгезии, ее можно блокировать либо угнетением бактериальных адгезинов, либо воздействием на рецепторные свойства клеток макроорганизма. Известно множество субстанций, обладающих способностью блокировать адгезию микроорганизмов. Но если блокирование адгезии патогенов целесообразно, то снижение адгезивности нормальной флоры нежелательно. Следовательно, возникает целесообразность поиска агентов, способных ингибировать адгезивность патогенов, при этом незначительно воздействуя на нормофлору.

Исследовалось воздействие ферментов ASG и PPO на адгезивную активность микроорганизмов. Показано, что данные ферменты вызывают изменение адгезивности микроорганизмов. На модели адгезии к эритроцитам показано, что ферменты по-разному воздействуют на адгезивность патогенных *E.coli*.

При обработке ASG для всех штаммов отмечено снижение уровня адгезии от 23% до 71.9%. PPO вызвала как снижение адгезивности, так и ее увеличение. Корреляции между действием обоих ферментов на штаммы не обнаруживается. ($r_s = -0.41$)

На модели клеток щечного эпителия также показан неодинаковый уровень снижения адгезивной активности патогенных *E.coli* под воздействием ASG и PPO ($r_s = 0.25$). Полифенол оксидаза оказывает меньший по сравнению с L-Аспарагиназой эффект снижения уровня адгезии на модели клеток щечного эпителия. В целом процентное изменение уровня адгезии микроорганизмов сопоставимо для обеих моделей, особенно для ASG ($r_s = 0.80$ для ASG и $r_s = 0.20$ для PPO). Полученные данные свидетельствуют об участии в процессе адгезии одинаковых адгезинов. Тот факт, что ферменты на модели буккальных клеток снижали уровень адгезии микроорганизмов в меньшей степени может свидетельствовать об участии в адгезивном процессе дополнительных механизмов (например, образовании оснований Шиффа) или других типов адгезинов.

Положительный опыт применения низкочастотного импульсного лазерного излучения (НИЛИ) в различных областях медицины, в частности в урологии для

лечения инфекционно-воспалительных заболеваний свидетельствует о влиянии НИЛИ не только на организм человека и отдельные субпопуляции его клеток, но и о воздействии на микроорганизмы, в частности на их адгезивные свойства. В модельных опытах показано, что терапевтическая частота (5 – 5000 Гц) и время (1 – 10 мин) лазерной обработки не оказывает бактерицидного действия, но почти во всех случаях снижает адгезию уропатогенных *E.coli*. Это было показано в опытах исследования адгезии с использованием эритроцитов и буккальных клеток. Причем на модели буккальных клеток, в сравнении с результатами, полученными на модели эритроцитов, эффект ингибирования менее выражен. Вероятно, это объясняется участием в адгезивном процессе различных типов пилий. Что касается штаммов – пробиотиков *E.coli*, то при обработке НИЛИ не наблюдалось снижения адгезивности ни на модели эритроцитов, ни на модели буккальных клеток.

Механизм воздействия НИЛИ на адгезивный процесс до конца не исследован. Возможно, в этом случае имеет место как модификация структуры фимбрий, так и изменение рецепторов макроорганизма. Мы показали это в серии экспериментов, в которых подвергали лазерной обработке не бактериальные клетки, а клетки макроорганизма – эритроциты. В этом случае также показано снижение адгезии UPEC и *E.coli* O157:H7. Этот факт подтверждает целесообразность применения НИЛИ для лечения нефрологических больных, у которых причиной заболевания служит кишечная палочка.

На следующем этапе работы исследовано комплексное воздействие ферментов (ASG, PPO) и НИЛИ на адгезивные свойства микроорганизмов. На первой стадии исследования охарактеризована последовательность действия НИЛИ и фермента. Обработывали штаммы патогенных *E.coli*. В качестве субстрата использовались эритроциты. Доказано, что в большинстве случаев (5 из 8) больший уровень снижения адгезии наблюдается при комплексной обработке сначала НИЛИ, затем ферментами (использовали ASG в концентрации 6 ЕД/мл). При обработке последовательно ферментом, затем НИЛИ эффект снижения адгезии приблизительно равен таковому при монообработке ферментом или НИЛИ. Результаты выводились, исходя из СПА штаммов, К% достоверно не изменяется при разных способах обработки ($p > 0,05$) практически для всех штаммов. Возможно, это связано с тем, что предшествующая лазерная обработка меняет конформацию адгезина, делая остатки аспарагина в субстратсвязывающих сайтах более “доступными” для действия фермента.

Комплексное воздействие НИЛИ и ASG исследовалось также и на модели клеток защечного эпителия. Результаты, полученные на модели клеток ЗЭ, умеренно коррелируют с полученными на модели эритроцитов ($r_s=0,49$).

Далее было исследовано влияние ферментов ASG и PPO, а так же НИЛИ на адгезивную активность ПБ. В качестве ПБ использовались штаммы *E.coli*: M-17, M-17/pColap, M-17 fimH::npt, M-17 fimH::npt/pColap, M-17/ pCollacZ, M-17 fimH::npt/pCollacZ; *Lactobacillus fermentum* 90-TS-4(21). Моделью служили эритроциты и клетки защечного эпителия. Полученные результаты свидетельствуют о значительно меньшем эффекте, оказываемом НИЛИ и ферментами, на адгезию штаммов-пробиотиков по сравнению со штаммами патогенных *E.coli*. Причем штаммы, экспрессирующие пили I типа, практически не изменяют уровень адгезии при обработке НИЛИ и ферментами, у штаммов с дефектным геном синтеза пилий I типа и *Lactobacillus fermentum* 90-TS-4(21) наблюдается некоторое увеличение адгезии к эритроцитам и клеткам защечного эпителия. Эти результаты позволяют предположить возможное использование ферментов и НИЛИ одновременно с ПБ для профилактики и/ или лечения инфекций, вызванных чувствительными к ферментам и НИЛИ микроорганизмами.

Таким образом, в экспериментах *in vitro* показано, что полученные рекомбинантные штаммы за счет плазмиды, детерминирующей синтез колицина, обладают выраженной антагонистической активностью по отношению к патогенным штаммам, выделенным при дисбиозах у пациентов с урологическими заболеваниями и гемолитико-уремическим синдромом. При этом сконструированные штаммы наряду с колибактерином обладают высокой адгезивной активностью и практически не чувствительны к воздействию ферментов ASG и PPO, что делает их перспективными для использования, в том числе в комплексе с изученным физико-химическим воздействием, для лечения и профилактики колонизации изученных патогенов в организме.

Окончательный вывод об эффективности ПБ можно сделать лишь на основе экспериментов *in vivo*. Экспериментальный дисбактериоз вызывается посредством кровопотери, голодания, стрессовых ситуаций, радиационного облучения, приема антибиотиков (Бонд В.М. с соавт., 1992 и др.). Однако, до настоящего времени отсутствует эффективная экспериментальная модель дисбактериоза на животных.

Дисбактериоз у мышей вызывали посредством интрагастрального введения антибиотиков: ампиокса в суточной дозе 4 мг в течение 14 суток или доксициклина в

дозе 0,2 мг однократно. Дисбактериоз диагностировали по изменению состава фекальной микрофлоры. Количество микроорганизмов выражали в lg КОЕ/г фекалий. После однократного введения доксициклина наблюдались следующие изменения в составе фекальной микрофлоры: увеличивалось количество грибов рода *Candida* (на 2,0 lg) и снижалось количество лактозопозитивных *E.coli* (на 4,0 lg). При этом внешне все животные выглядели удовлетворительно.

При изучении влияния ампиокса на состав микрофлоры показано более резкое изменение состава микрофлоры. Так увеличивалось количество лактозонегативных *E.coli* (более чем на 5,0 lg), умеренно (примерно на 2,0 lg) росло содержание лактозопозитивных кишечных палочек и грибов рода *Candida* (на 2,0 lg), резко увеличивалось содержание *Proteus* spp. (более чем на 5,0 lg). На 1,0 lg увеличивалось содержание *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* и *Enterococcus* sp. При этом содержание молочнокислых бактерий (*Bifidobacterium* и *Lactobacillus*) и бактерий рода *Clostridium* не изменялось. Вследствие более глубоких изменений состава кишечной микрофлоры в последующих экспериментах использовался ампиокс.

В предварительных опытах отобран штамм *E.coli* O157:H7 №212, так как у здоровых животных он не вызывал заболевания, и только при экспериментальном дисбактериозе было возможно определить LD₅₀, которая составила 10⁹ КОЕ.

Известно, что при дисбактериозе кишечника происходит транслокация условно патогенных бактерий в несвойственные им биотопы, провоцируя различные инфекционно-воспалительные заболевания, такие, как пиелонефрит, бактериальный вагиноз и проч. Было проведено изучение транслокации кишечной флоры во внутренние органы в норме и при экспериментальном дисбактериозе, вызванном введением ампиокса. Наблюдалась транслокация лактозонегативной флоры (*E.coli*, *Proteus*) в легкие, почки, тимус и печень, при этом селезенка и кровь оставались стерильны. В контрольной группе животных (получавших *per os* физиологический раствор) все органы и кровь были стерильны. Следует отметить, что лактозопозитивная кишечная флора не транслоцировалась. Транслокация условно патогенной флоры при дисбактериозе объясняется значительным количественным ее увеличением, что, в свою очередь приводит к массовому выбросу в кровь эндотоксинов и параллельному снижению как клеточного, так и гуморального антиэндотоксинового иммунитета. Таким образом, полученные результаты коррелируют с данными литературы о том, что наибольшим уровнем

транслокации обладает кишечная палочка, а также о том, что одним из пусковых механизмов транслокации служит чрезмерное увеличение количества кишечной флоры.

ПБ в медицинской практике применяются для лечения и профилактики дисбактериозов. На основании этого в эксперимент были взяты три группы животных. Первая группа получала ПБ *per os* в двух дозировках (“человеческой” дозе (ч.д.), т. е. дозе равной разовой дозе, применяемой у человека, и “мышинной” дозе (м.д.), т. е. дозе ПБ в пересчете на массу мыши.) 1 раз в сутки параллельно с ампиоксом за 5 дней до заражения; вторая группа получала пробиотик *per os* в двух дозировках (ч.д. и м.д.) 1 раз в сутки за два дня до заражения и получала его в течение 5 дней, т. е., 3 дня после заражения; третья группа начала получать пробиотик *per os* в одной ч.д. 1 раз в сутки через 1 день после заражения в течение 4 дней; 1 контрольная группа животных до заражения получала только ампиокс *per os*; 2 контрольная группа животных до и после заражения не получала ни каких препаратов.

Показан профилактический и лечебный эффект генноинженерных штаммов, а также ПБ различных групп. В первой группе животных наблюдалось выраженное профилактическое действие, наиболее четкий эффект был отмечен при приеме генноинженерных вариантов штамма *E.coli* M-17, колисодержащих препаратов (колибактерин и биофлор) и, а так же лактобактерина и биоспорина. Отмечено, что генноинженерные штаммы проявили выраженный защитный эффект как в “человеческой”, так и в “мышинной” дозах, колисодержащие ПБ оказывали профилактическое действие в “человеческой” дозе (10^9 КОЕ, 10^6 КОЕ для биофлора), а лактобактерин и биоспорин – в “мышинной” дозе (10^6 КОЕ). Во второй группе животных наблюдался выраженный протективный эффект при применении “мышинных” дозировок генноинженерного штамма *E.coli* M-17 *fimH::npt/pCollacZ* и биофлора, тогда как “мышинная” дозировка колибактерина оказалась неэффективной, высокое защитное действие проявил биоспорин в “человеческой” дозировке. В третьей группе все исследованные пробиотики проявили примерно равную (40-60%) протективную активность в “человеческой” дозировке. Животные контрольной группы, получавшие до заражения физиологический раствор (контроль 2) выжили в 80% случаев, тогда как в группе животных, получавших ампиокс *per os* (контроль 1), летальность составила 90%.

Таким образом, результаты экспериментов *in vitro*, доказывающие эффективность использования ПБ против патогенов, выделенных при дисбиозах у пациентов с заболеваниями мочевыводящего тракта, подтверждены на модели *in vivo*. При этом показана высокая активность сконструированных генноинженерных вариантов *E.coli* M-17: *E.coli* M-17/pCollacZ, M-17 fimH::npt/pCollacZ, M-17/ColДmob, M-17 fimH::npt/ColДmob.

Выводы:

- 1) На базе известной плазмиды ColE1 сконструированы гибридные плазмиды pCollacZ и ColДmob, несущие детерминанту синтеза колицина E1 (ген *cea*), ген устойчивости к нему (*imm*) и лишенные генов *mob*, контролирующих конъюгативную мобилизацию плазмиды.
- 2) Получены штаммы *E.coli*, производные производственного штамма *E.coli* M-17 и его варианта *E.coli* M-17 fimH::npt, несущие плазмиды pCollacZ и ColДmob. Штаммы проявляют повышенную антагонистическую активность в условиях *in vitro* и *in vivo*.
- 3) Разработана модель дисбактериоза на животных, позволяющая изучить эффективность пробиотиков *in vivo*. Показано, что пероральное введение ампиокса вызывает выраженное изменение состава микрофлоры, сопровождающаяся транслокацией лактозонегативной флоры из кишечника в легкие, почки, печень и тимус.
- 4) На модели экспериментального дисбактериоза впервые показан протективный эффект пробиотиков в отношении клинического штамма *E.coli* O157:H7. При этом достигалось 100% профилактическое и 60% лечебное действие пробиотиков.
- 5) Выявлен разный уровень антагонизма различных пробиотиков в отношении клинических штаммов патогенных *E.coli*, выделенных от больных с дисбиозами. Колисодержащие пробиотики и полученные рекомбинантные штаммы проявляют высокий уровень антагонистической активности (от 23,5±1,9 до 31,3±0,55 мм в отношении *E.coli* O157:H7 и от 17,1±1,2 до 19,6±1,58 мм в отношении UPEC), тогда как споровые пробиотики и энтерол обладают низким уровнем антагонизма в отношении изучаемых штаммов (споровые: от 0 до 13, 5±0,7 в отношении *E.coli* O157:H7 и от 0 до 7,5±0,5 мм в отношении UPEC, энтерол: 0 мм в отношении *E.coli* O157:H7 и 1,2±0,2 мм в отношении UPEC).

- 6) При сравнительном изучении адгезивной активности пробиотиков и клинических штаммов патогенных *E.coli*, выделенных от больных с дисбиозами, установлено, что колисодержащие пробиотики и полученные рекомбинантные штаммы обладают наибольшим уровнем адгезивной активности (от $2,2 \pm 0,30$ до $3,2 \pm 0,25$) и могут конкурировать с патогенными *E.coli* за сайты связывания.
- 7) В опытах *in vitro* показано, что воздействие низкочастотного импульсного лазерного излучения (НИЛИ) блокирует адгезины уropатогенных *E.coli*, и тем препятствует колонизации бактерий в организме. Обработка эритроцитов НИЛИ приводит к ингибированию рецепторов, что также выражается в снижении адгезии. Патогенные *E.coli* в значительной мере более чувствительны к воздействию НИЛИ, чем пробиотики.
- 8) Впервые установлена способность ферментов L-аспарагиназы и Полифенол оксидазы снижать адгезивность патогенных *E.coli* на различных моделях *in vitro*. Показано, что пробиотики значительно менее чувствительны к действию ферментов по сравнению с патогенными *E.coli*.
- 9) Полученные данные о высокой колонизационной способности новых рекомбинантных штаммов *E.coli*: M-17/pCollacZ, M-17 fimH::npt/pCollacZ, M-17/ColДmob, M-17 fimH::npt/ColДmob следует рассматривать как экспериментальное обоснование их использования для коррекции дисбактериозов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдошин В. П. Неспецифические воспалительные заболевания почек, мочевыводящих путей и половых органов у мужчин. Гл. 15, с. 406-423, из книги Низкоинтенсивная лазерная терапия. Под ред. Москвина С. В., М., 2000
2. Азизов И. С., Тургунов Е. М. Влияние электроимпульсной обработки органов брюшной полости на гистотаксис и адгезию госпитальных штаммов микроорганизмов// www.antismed.ru
3. Балтрашевич АК, Подопригора ГИ, Комаровская ТП. Влияние метронидазола на КР кишечника мышей к сальмонеллам// Антибиотики и микроэкология человека и животных (труды института), с 94-98, М. 1988
4. Блохина И.Н., Дорофейчук В.Г. Дисбактериозы// Л., 1979
5. Бонд ВМ, Горская ЕМ. Новые подходы к моделированию, диагностике и лечению дисбактериозов кишечника//Мед аспекты микробной экологии, вып 6, с 23-26, 1992
6. Бондаренко ВМ. Факторы патогенности бактерий и их роль в развитии инфекционного процесса// ЖМЭИ «5 с 34-39, 1999
7. Бондаренко ВМ и др. Адгезивная активность клинических штаммов клебсиелл// ЖМЭИ №2, с 104-109, 1996
8. Бочков ИА, Трофимов ОД, Дарбеева ОС и др. Упрощенная методика подсчета микроорганизмов при изучении аутофлоры человека// Лаб Делоб с 43-47, 1988
9. Бриллис ВИ, Брилене ТА, Тюваева РФ и др. О возможности воздействия на цитоадгезию микроорганизмов// Антибиотики и колонизационная резистентность. Труды института НИИ Антибиотиков, с 147, М. 1990
10. Бриллис ВИ, Брилене ТА, Лейнцер ХП и др. Антибиотики и адгезивная активность микроорганизмов// Антибиотики и микроэкология. Труды института НИИ Антибиотиков, с 147, М. 1988
11. Брилис В.И., Брилене Т.А., Ленцнер Х.Б., Ленцнер А.А. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов //Лаб. Дело. № 4. -с.210-212, 1986
12. Буглова С.Е. с соавт. Применение лазерного облучения в нефрологической практике. – Урология и нефрология, 1994, № 4, с. 27-30
13. Вомышев АВ, Елагина НН, Кириллов ВА, Кириллов ДА, Бухарин ОВ. Влияние бифидобактерий на антилизоцимную активность энтеробактерий// ЖМЭИ, №4, с 77-80, 2000

14. Воробьев АА, Пак СГ. Дисбактериозы у детей// М. 1998
15. Воробьев АА, Лыкова ЕА. Бактерии нормальной микрофлоры. Биологические свойства и защитные функции// ЖМЭИ, №6, с 102-105, 1999
16. Воробьев АА, Несвижский ЮВ, Зуденков АЕ, Буданова ЕВ. Сравнительное изучение пристеночной и просветной микрофлоры толстой кишки в эксперименте на мышах// ЖМЭИ, №1, с 62-67, 2001
17. Воробьев АА, Несвижский ЮВ, Липницкий ЕМ, Алленов МН и др. Исследование пристеночной микрофлоры кишечника человека// ЖМЭИ №1, с 60-63, 2003
18. Горская Е.М. Механизмы развития микробиологических нарушений в кишечнике и новые подходы к их коррекции. Автореф. дис. д-ра мед.наук. –М., 1994
19. Гриценко В. А., Бухарин О. В. Экологические и медицинские аспекты симбиоза *Escherichia coli* и человека. ЖМЭИ, с. 92-99, № 3, 2000
20. Езепчук Ю.В. Патогенность как функция биомолекул// «Медицина» М., 1985
21. Интизаров ЛМ. Оценка СПФ-мышей, полученных с помощью деконтаминации антибиотиками и другими средствами, по результатам биомедицинских исследований, проводимых на них в течение 5 лет// Антибиотики и пр, вып XIX, с 62-67, М. 1990
22. Козель А. И., Попов Г. К. Механизм действия лазерного облучения на тканевом и клеточном уровне. Вестник Российской Академии Медицинских Наук, с. 41-43, № 2, 2000
23. Колганова Т, Ермолаев А., Дойл Р. Влияние ферментов аспарагиназы и полифенолоксидазы на адгезивные свойства микроранзимов// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2002, 1, с. 71-74
24. Колганова Т., Ватанабэ Х., с соавт. К вопросу о механизме защитного действия пробиотиков// Сб. Биомедицинские технологии, 2001, вып. 16, с. 23-29
25. Колганова Т.В., Джарадат Т., Ермолаев А.В., Осипова И.Г., Васильева Е.А., Далин М.В., Дойл Р.Дж. К вопросу о комплексном воздействии импульсного инфракрасного лазерного излучения и аспарагиназы на штаммы *Escherichia coli*, выделенные при заболеваниях мочевыделительной системы// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. Т. 6, с. 681-683, 2002
26. Коршунов ВМ, Ефимов БА, Пикина АП. Характеристика биологических препаратов и пищевых добавок для функционального питания и коррекции микрофлоры кишечника// ЖМЭИ №3, с 86-91, 2000

27. Косяков ИН. Иммунология изоантигенов и изоантител// М., Медицина, с 149-154, 1965
28. Кочурко ЛИ, Лиходед ВГ, Лобова ЕА. Показатели иммунитета к эндотоксину грамотрицательных бактерий при кишечных дисбактериозах// ЖМЭИ №5, с 25-27, 1998
29. Крылов ВП, Кроличенко, Малышева ТВ и др. Новый вариант рабочей классификации дисбактериоза микрофлоры в просвете толстого кишечника// ЖМЭИ №3, с 103-104, 1997
30. Куравлев ПП, Чернова ОЛ, Гиргизова СБ. Взаимодействие окситоцина, лазерного и электромагнитного излучения на персистентные свойства *S.aureus*// ЖМЭИ, 4, с 62-64, 2000
31. Курлаев П. П., Чернова О. Л., Киргизова С. Б. Взаимодействие окситоцина, лазерного и электромагнитного излучения на персистентные свойства *Staphylococcus aureus*. ЖМЭИ, с. 62-64, № 4, 2000
32. Ларченко НТ, Златкина АР. Комплексная терапия при заболеваниях органов пищеварения// М., Медицина, с 162-166, 1977
33. Лизько НН. Дисбактериозы экстремальных состояний// Антибиотики и медицинская биотехнология №3, 1987
34. Лиходед В. Г., Яковлев М. Ю, Лиходед Н. В. с соавт. Состояние антиэндотоксинового иммунитета при экспериментальном кишечном дисбактериозе у мышей.//ЖМЭИ.-1998.- №4.- с. 14-16
35. Малик НИ, Панин АН, Вершинина ИЮ. Пробиотики: теоретические и практические аспекты// Био №3(18), март 2002
36. Медицинская газета, №61, с 2, 1996
37. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике// Мир, с183-189, М.1978
38. Митрохин С.Д. Метаболиты нормальной микрофлоры человека в экспресс - диагностике и контроле лечения дисбиоза толстой кишки// Автореф.дис.докт.мед.наук. 37 с. 1998
39. Москвин СВ, Буйлин ВА. Низкоинтенсивная лазерная терапия// М., ТОО Фирма Техника, 2000
40. Мухина ЮГ. Диагностика и коррекция дисбактериоза у детей// РМЖ, Том 7 № 11, 1999
41. Никитенко ВИ, Захаров ВВ, Бородин АВ и др. Роль транслокации бактерий в патогенезе хирургических инфекций// Хирургия, №2, с 63-66, 2001

42. Осипова И.Г. Некоторые аспекты механизма защитного действия колибактерина и споровых эубиотиков и новые методы их контроля.// Автореф.дис...канд.биол.наук.- М., 25 с. 1997
43. Палий ГК, Виевский АН. Биологические свойства некоторых энтеробактерий, устойчивых к антибактериальным препаратам// Антибиотики и КР. Труды НИИ АБ, с 67, М. 1990
44. Парфенов АИ, Калоев ЮК. Дисбактериоз кишечника// Молск мед журн, 1, с 12-18, 1998
45. Перетц ЛГ. Значение нормальной микрофлоры для организма человека: об использовании микробов нормальной микрофлоры в терапии и профилактике// Гл IX, М. 1955
46. Петровская ВГ, Давыдова НВ. Экспериментальное получение поликолициногенных штаммов *E.coli* с широким спектром ингибиторного действия// Вестник АМН СССР, №2, с 83-87, 1986
47. Петровская ВГ, Марко ОП. Микрофлора человека в норме и патологии// М. 1976
48. Покровский ВИ, Поздеев ОК. Медицинская микробиология: факультативные грамотрицательные палочки семейства *Enterobacteriaceae*// Гл 12, с 344-416, М. 1999
49. Применение бактериальных биологических препаратов в практике лечения больных кишечными инфекциями. Диагностика и лечение дисбактериозов кишечника. Методические рекомендации. - 23 с. М. 1986
50. Пяткин ҚД, Кривошеин ЮС. Микробиология// с 255-259, М. 1980
51. Ратинер ЮА, Бондаренко ВМ. Энтерогеморрагические кишечные палочки и вызываемые ими заболевания// ЖМЭИ, №5, с 87-96, 1998
52. Савицкая КИ, Русаенова ЕВ, Нехорошева АГ и др. Микрофлора толстой кишки больных с длительно текущей уроинфекцией// Мед аспекты микробной экологии, вып 7/8, с 173-175, 1993/1994
53. Селиверстов ВВ. Методические рекомендации по подготовке препаратов для изучения степени адгезии микроорганизмов с клетками животных в световом и сканирующем электронном микроскопе № 13-7-2/4 от 16 Февраля 1999 г.
54. Смирнов ВВ, Резник СР, Василевская ИА. Спорообразующие аэробные бактерии —продуценты биологически активных веществ// Киев.Наукова думка. 278 С, 1983

55. Сорокулова ИБ. Теоретическое обоснование и практика применения бактерий рода *Bacillus* для конструирования новых пробиотиков// Дисс на соиск уч степ дбн, Киев 1999
56. Тарасенко ВС, Никитенко ВИ, Кубышкин ВА. Острый панкреатит и транслокация бактерий// Вестник хирургии, с 86-89, 2000
57. Хейфец Ю.Б. Методические рекомендации по применению магнитно-инфракрасно-лазерного аппарата квантовой терапии. – Москва, ПКП ГИТ, 1999
58. Хопельман А, Гирлингс с. Инфекции мочевыводящих путей при сахарном диабете// КМАХ, том 2, №2, 2000
59. Чеснокова ВЛ. Варианты штамма *E.coli* M17, перспективные для получения эубиотиков// Дисс на соиск уч ст кмн, М. 1998
60. Чхаидзе И. Г., Лиходед В. Г., Лиходед М. В. с соавт. Корректирующее действие антител при экспериментальном кишечном дисбактериозе.//ЖМЭИ.- 1998.- №14. С. 12-14
61. Шендеров Б.А. Значение колонизационной резистентности в патогенезе инфекционных заболеваний // Иммунология инфекционного процесса. М., С. 112-121, 1994
62. Шендеров БА. Медицинская микробная экология и функциональное питание// 1, с 38-39, М. Грантъ, 1998
63. Шептулин АА. Синдром избыточного роста бактерий и «дисбактериоз кишечника»: их место в современной гастроэнтерологии// Росс Журнал гастроэнтерол гепатол колопроктол, №3, с. 51-54, 1999
64. Юхименко ЛН, Завгородняя ЕФ, Троп ИЕ, Бондаренко АП. Определение колициногенности микрофлоры кишечника при отсутствии приживаемости штаммов *E.coli* М-17 и безуспешного лечебного применения колибактерина.// Хабаровск. –1979
65. Ющук НД, Бродов ЛЕ. Лечение острых кишечных инфекций// М. 1998
66. Acheson DW, Levine MM, Kaper JB, Keusch GT. Protective immunity to Shiga-like toxin I following oral immunization with Shiga-like toxin I subunit-producing *Vibrio cholerae* CVD 103-HgR// Infect. Immun., 64:355-357, 1996
67. Adams MR. Safety of industrial lactic acid bacteria// J Biotechnol Feb 19;68(2-3):171-8, 1999

68. Adleberth I, Ahrne S, Johansson ML et al. A mannose-specific adherence mechanism in *L.plantarum* conferring binding to the human colonic cell line HT-29// *Appl.Environ.Microbiol.*, 62(7):2244-2251, Jul 1996
69. Akao T, Mizuki E, Yamashita S, Kim HS, Lee DW. Specificity of lectin activity of bacillus thuringiensis parasporal inclusion proteins// *J.Basic.Microbiol.*, 41(1):3-6, 2001
70. Alvarez-Olmos MI, Oberhelman RA. Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy// *Clin Infect Dis*, 1, 32 (11), 1567-76, Jun 2001
71. Ammon A, Petersoen LR, Kareh H. A large outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by an unusual sorbitol-fermenting strain of *E.coli* O157:H-// *J. Infect. Dis.*, 179 (5): 1274-1277, May 1999
72. Andersson B. Attachment of *Streptococcus pneumoniae* to human pharyngeal epithelial cells// *Lang and Respir.*, 5, #1, p. 13-14, 1988
73. Apostolou E, Kirjavainen PV, Saxelin M, Ruatelin H, Valtonen V, Salminen SJ, Ouwehand AC. Good adhesion properties of probiotics: a potential risk for bacteremia// *FEMS Immunol Med Microbiol*, 31(1), 35-39, Jul 2001
74. Armstrong GD, Rowe PC, Goodyer P, Orrbine E, Klassen TP, Wells G. A phase I study of chemically synthesized verotoxin (shiga-like toxin) P^k-trisaccharide receptors attached to chromosorb for preventing hemolytic uremic syndrome// *J.Infect.Dis*, 171:1042-1045, 1995
75. Armstrong GL, Hollingsworth J, Morris JG. Emerging food borne pathogens: *E.coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world// *Epidemiol. Rev.* 18:29-51,1996
76. Arne P, Marc D, Bree A et al. Increase tracheal colonization in chicken without impairing pathogenic properties of avian pathogenic *E.coli* MT78 with a fimH deletion// *Avian Diseases*, 44(2): 343-355, Apr-Jun 2000
77. Aronson M, Medalia O, Schori L, Millerman D et al. Prevention of colonization of the urinary tract of mice with *E.coli* by blocking of bacterial adherence with methyl 6-D-mannopyranoside// *J Infect Dis*, v 139, p329, 1979
78. Asahara T, Nomoto K, Watamiki M et al. Antimicrobial activity of intraureally administrated probiotic *L.casei* in a murine model of *E.coli* UTI// *J.Antimicrob.Agents.Chemother.*, 45(6):1751-1760, Jun 2001

79. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA. Short Protocols in Molecular Biology, 4th edition, A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons Inc., New York. 1999
80. Avlami A, Kordossis T, Vrizidis N, Sipsas NV. Lactobacillus rhamnosus endocarditis complicating colonoscopy// J.Infect, 42(4):283-285, May 2001
81. Bai X, Liu X, Su Y. Inhibitory effects of intestinal mucus on bacterial adherence cells after surface burns// Clin. Med. J., May, 113(5):449-450, 2000
82. Bailey MT, Coe CL. Maternal separation disrupts the integrity of the intestinal microflora in infant rhesus monkeys// Dev Psychobiol Sep;35(2):146-55, 1999
83. Bakaletz LO, White GJ, Post JC, Ehrlich GD. Blinded Multiplex PCR Analyses of Middle Ear and Nasopharyngeal Fluids from Chinchilla Models of Single- and Mixed-Pathogen-Induced Otitis Media// Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, March, p. 219-224, Vol. 5, No. 2, 1998
84. Barbes C, Boris S. Potential role of lactobacilli as prophylactic agents against genital pathogens// AIDS Patient Care STDS, 13(12):747-751, Dec 1999
85. Bautista-Garfias CR et al. Effect of viable or dead Lactobacillus casei organisms administered orally to mice on resistance against Trichinella spiralis infection// Parasite 8, S226-8, Jun 2001
86. Bell PB et al. A multistate outbreak of E.coli O157:H7-associated bloody Diarrhea and hemolytic Uremic Syndrome from hamburgers// JAMA, 272:1349-1353, 1994
87. Benenson AS. Control of communicable disease manual// 16^{ed} Washington: American Public Health Association, 141-144, 1995
88. Bengmark S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora// Gut Jan;42(1):2-7, 1998
89. Berdgy's Manual of Systematic bacteriology// vol. 3, Ed. JT Staley-1010
90. Berg RD. Bacterial translocation from the intestines// Jikken Dobutsu, 34:1:1-16, 1985
91. Beuth J, Ko HL, Shroten H et al. Lectin mediated adhesion of Streptococcus pneumoniae and its specific inhibition in vitro and in vivo// Zbl.Bakt.Hyg., 265, 160-168, 1987
92. Blackwell CC, Dundas S, James VS, Mackenzie DA, Braun JM, Alkout AM, Todd WT, Elton RA, Weir DM. Blood Group and Susceptibility to Disease Caused by Escherichia coli O157// J Infect Dis Feb 1;185(3):393-6, 2002
93. Blanc-Pottard AB, Solomon F, Kayser J, Groisman EA// J. Bacteriol., v.181, p. 998-1004, 1999

94. Boedeker EC. Adherent bacteria: breaching the mucosal barrier?// *Gastroenterology* Jan;106(1):255-7, 1994
95. Bourdaillez B, Berquin P, Mariani-Kurjian P, Bef D, Cuvelier B, Capek J. Possible person-to-person transmission of E.coli O111-associated hemolytic uremic syndrome// *Pediatr.Nephrol.*, 11:36-39, 1997
96. Boyd AC, Archer JA, Sherratt DJ. Characterization of the Col E1 mobilization region and its protein products// *Mol.Gen.Genet.*, v.217, p. 488-498, 1989
97. Bradley DE. Colicinogeny of O157:H7 enterohemorrhagic E.coli and the shielding of colicin abd phage receptors by their O-antigenic side chain// *Can.J.Microbiol.*, 37:97-104, 1991
98. Bricon TL. [Laboratory identification and measurement of urinary proteins]//*Ann Biol Clin (Paris)* Sep-Oct;60(5):525-40, 2002
99. Broda P. Plasmids// Oxford San Francisco: Freeman and Co., p. 188, 1989
100. Brook J. Isolation of non-sporing anaerobic rods from infection in children// *J.Clin.Microbiol.*, 45:21-26, 1996
101. Cangemi R, Santos V et al. Protective effect of intranasally inoculated *Lactobacillus fermentum* against *Streptococcus pneumoniae* challenge on the mouse respiratory tract// *FEMS Immunol Med Microbiol*, 31(3):187-95, Oct 2001
102. Caprioli A, Luzzi J, Rosmini F, Resti C et al. Community wide outbreak of hemolytic-uremic syndrome associated with non O157 verotoxin-producing E.coli// *J Infect Dis*, 169:208-211, 1994
103. Chan PT, Ohmori H, Tomizawa J, Lebowitz J. Nucleotid sequence and gene organization of Col E1 DNA// *J Biol Chem*, v 260, p 8925-8935, 1985
104. Charatan F. New York outbreak of E coli poisoning affects 1000 and kills two// *BMJ*;319:873, 2 October, 1999
105. Chart H, Scotland S, Rowe B. Serum antibodies to E.coli serotype O157:H7 in patients with hemolytic uremic syndrome// *J Clin Microbiol* 27-285-290, 1989
106. Chick S, Harber MJ, Mackenzie R, Asscher AW. Modified method for studying bacterial adhesion to isolated uroepithelial cells and uromucoid// *Infect Immun* Oct;34(1):256-61, 1981
107. Coad NAG, Marchall T, Rowe B, Taylor CM. Changes in the post-enteropathie form of the haemolytic-uremic syndrome in children// *Clin Nephrol*; 35:10-6, 1991
108. Cohen PS, Laux DC. Bacterial adhesion to and penetration of intestinal mucus in vitro// *Methods Enzymol*;253:309-14, 1995

109. Comit  de malaies infectieuses d'immunisation, SCP. L'escherichia coli O157:H7, les autres colibacilles verotoxinogenes et le syndrome hemolitique et uremique chez l'enfant// No de reference: ID95 03
110. Cowan MM, Horst EA, Luengpailin S, Doyle RJ. Inhibitory Effects of Plant Polyphenoloxidase on Colonization Factors of Streptococcus sobrinus 6715// Antimicrobial agents and chemotherapy, Vol. 44, No. 9, p. 2578–2580, 2000
111. Cowden JM. Scottish outbreak of E.coli O157: November-December 1996// Eurosurveillance, 2:1, 1997
112. Cray CW. Experimental infection of calves and adult cattle with E.coli O157:H7// Appl Environ Microbiol 61:1585-1590, 1995
113. Darouich RO, Hull RA. Bacterial interference for prevention of UTI// J Spinal Cord Med, 23(2):136-141, Summer 2000
114. Davidson GP, Butler RN. Probiotics in pediatric gastrointestinal disorders// Curr Opin Pediatr Oct;12(5):477-81, 2000
115. Davidson GP, Butler RN. Probiotics in pediatric gastrointestinal disorders// Curr Opin Pediatr, 12(5):477-481, Oct 2000
116. Davidson VL, Cramer WA, Brunden KR, Cohen FS. Studies of the mechanism of action of channel-forming colicins using artificial membranes// J Membr Biol, v 79, p 105-118, 1984
117. Die van I, Kramer C, Hacker J, Bergmans H, Jongen W, Hoekstra W. Nucleotide sequence of the genes coding for minor fimbrial subunits of the F1C fimbriae of Escherichia coli// Res Microbiol Jul-Aug;142(6):653-8, 1991
118. Donnenberg MS, Tzipoli S, McKee ML, O'Brien AD et al. the role of the eae gene of Enterohemorrhagic E.coli in intimate attachment in vitro and in a porcine model// J Clin Invest, 92:1418-1424, 1993
119. Dougan G, Saul M, Warren G, Sherratt G. A functional map of plasmid ColE1// Mol Gen Genet, v 158, p325-327, No 3, 1978
120. Doyle MP, Zhao T, Harmon BG, Brown CA.: Control of enterohemorrhagic E. coli O157:H7 in cattle by probiotic bacteria and specific strains of E. coli// US5965128
121. Doyle RJ. Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection// Microbes and Infection, Apr.;2(4):391-400, 2000
122. Drago L, Gismondo MR, Lombardi A et al. Inhibition of in vitro growth of enteropathogen by new lactobacillus isolates of human intestinal origin// FEMS microbial Lett, 15:153(2):455-463, 15 Aug 1997

123. Duncan SH, Doherty CJ, Govan JRW, Neogrady S et al. Characteristic of sheep-rumen isolates of *Pseudomonas aeruginosa* inhibitory to the growth of *E. coli* O157// FEMS Microbiology letters, v180, No2, 15 November 1999
124. Ebina Y, Takahara Y, Kishi Y et al. Lex A protein is a repressor of the colicin E1 gene// J Biol Chem v 258, p 13258-13261, 1983
125. Elliott SJ, Krejany EO, Mellies JL, Robins_Browne RM et al. Esp G, a novel type III system-secreted protein from Enteropathogenic *Escherichia coli* with similarities to VirA of *Shigella flexneri*// Infect Immun, Jun, 69(6):4027-4033, 2001
126. Farina C, Arosio M, Mangia M, Moioli F. *Lactobacillus casei* subsp. *rhannosus* sepsis in a patient with ulcerative colitis// J Clin Gastroenterol, Sept, 33(3):251-2, 2001
127. Fitzpatrick M. Haemolytic uraemic syndrome and *E. coli* O157// BMJ, p. 684-685, v. 318 13 March 1999
128. Fitzpatrick MM, Shan VS, Trompeter RS, Dillon MJ et al. Long term renal outcome of childhood haemolytic uraemic syndrome// BMJ, 303:489-492, 1991
129. Flores FX, Jabs K, Thorne GM, Jaeger J, Linshaw MA, Somers MJG. Immune response to *Escherichia coli* O157:H7 in hemolytic uraemic syndrome following salmonellosis// Pediatr Nephrol 11: 488– 490, 1997
130. Fowler JE, Mariano M, Lau JL. Interaction of urinary Tamm-Horsfall protein with transitional cells and transitional epithelium// J Urol Aug;138(2):446-8, 1987
131. Fuller R. Probiotics in human medicine.// Gut. 32 №4. -p.439-42, 1991
132. Fuller R. Probiotics in man and animals.// J. Appl. Bacter. 66 №5. -p.365-70, 1989
133. Fung D, Kang D// Pat No WO 1999US0018524 USA 24 Feb 2000
134. Geerlings SE, Meiland R, van Lith EC, Brouwer EC, Gastra W, Hoepelman AI. Adherence of type 1-fimbriated *Escherichia coli* to uroepithelial cells: more in diabetic women than in control subjects// Diabetes Care Aug;25(8):1405-9, 2002
135. Gentilini M. Mēdecine tropicale// France, Paris, p 790-804, 1993
136. Genyo M, Torao M. Health beverage containing wasabia japonica or western mustard// Pat of Jap, 1998
137. Gianantonio C, Vitaceo M, Mendilaharsu F et al. The hemolytic-uremic syndrome// Nephrol, 11:174-193, 1973
138. Gibson G.R., Beaumont A. An overview of human colonic bacteriology in health and disease// Gut flora and health - past, present and future. - London, New York: Royal Society of Medicine Press Limited, P. 3-12, 1996

139. Goh C, Taweechaisupapong S, Taylor KG, Doyle RJ. Polycarboxylates inhibit the glucan-binding lectin of *Streptococcus sobrinus*// *Biochimica et Biophysica ACTA*, Sep. 1, 1519(1):111-6, 2000
140. Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infections caused by *E.coli*, and the associated hemolytic-uremic syndrome// *Epidemiol Rev*, 13:60-98, 1991
141. Hammermuller JD, Gyles CL. Recent advances in verotoxin-producing *E.coli* infections// Elsevier Sci. BV, p113-116, 1994
142. Hazes B, Sastry PA, Hayakawa K, Read RJ, Irvin RT. Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilin suggests a main-chain-dominated mode of receptor binding// *J Mol Biol* Jun 16;299(4):1005-17, 2000
143. Isawa M, Makimo S, Asakura H, Kobori H, Morimoto Y. Detection of *E.coli* O157:H7 from *Musca domestica* at a cattle farm in Japan// *J Med Entomol*, 36(1):108-112, Jan 1999
144. Jann K, Schmidt G, Blumenstock E, Vosbeck K. *Escherichia coli* adhesion to *Saccharomyces cerevisiae* and mammalian cells: role of piliation and surface hydrophobicity// *Infect Immun* May;32(2):484-9, 1981
145. JASR. Verotoxin-producing *E.coli*, January 1991 – November 1995, Japan// v 17, No 1, Jan 1996
146. Johnson J., Weissman S., Steel A. et al. Clonal and Pathotypic Analysis of Archetypal *Escherichia coli* Cystitis Isolate NU14// *The Journal of Infectious Diseases*, 184, p. 900-908, 2001
147. Jones R, Ellbogen M, Dunlay R. *Lactobacillus* allograft pyelonephritis and bacteremia// *Nephron*, 86(4):502, Dec 2000
148. Jshibashi N, Yamazaki S. Probiotic and safety// *Am J Clin Nutr*, 73 (suppl), p 4659-4709, 2001
149. Kakkos SK et al. Nonabsorbable antibiotics reduce bacterial and endotoxin translocation in hepatectomised rats HPB// *Surg*, 10:5:283-289-291, 1997
150. Kano H, Kaneko T, Kaminogawa S. Oral intake of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* OLL1073R-1 prevents collagen-induced arthritis in mice// *J Food Prot* 65(1):153-60, Jan 2002
151. Kaplan BS, Cleary TG, Obrig TG. Recent advances in understanding the pathogenesis of the hemolytic-uremic syndromes// *Pediatr nephrol*, 4, 276-283, 1990
152. Karch H, Schubert S, Zhang D, Zhang W, Schmidt T, Llschldger T, Hacker J. A Genomic Island, Termed High-Pathogenicity Island, Is Present in Certain Non-O157

- Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Clonal Lineages// *Infection and Immunity*, November, p. 5994-6001, Vol. 67, No. 11, 1999
153. Karch H, Heesemann J, Laufs R, O'Brien AD et al. A plasmid of enterohemorrhagic *E. coli* O157-H7 is required for expression of a new fimbrial antigen and for epithelial cells// *Infect Immun*, 55, 455-461, 1996
 154. Karmali MA. Infection by verotoxin-producing *E. coli*// *Clin microbial Rev*, 2:15-38, 1989
 155. Kasai K, Galton J, Terasaki PI et al. Tissue distribution of the P^k antigen as determined by a monoclonal antibody// *J Immunogenet*, 12:213-220, 1985
 156. Kaur IP, Chopra K, Saini A. Probiotics: potential pharmaceutical application// *Eur J Pharm Sci*, 15(1):1-9R, Feb 2002
 157. Kirjavainen PV, Ouwehand AC, Isolauri E, Salminen SJ. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus// *FEMS Microbiol Lett* Oct 15;167(2):185-9, 1998
 158. Klaasen H.L., Van der Heijden F.J., Stok W. et al. Apathogenic, intestinal, segmented, filamentous bacteria stimulate the mucosal immune system of mice// *Infect. Immun.* 61, N 1. P. 303-306, 1993
 159. Klein G, Hallmann C, Casas IA, Abad J, Louwers J, Reuter G. Exclusion of vanA, vanB and vanC type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods// *Appl Microbiol Nov*;89(5):815-24, 2000
 160. Klemm P, Krogfelt K. Type I fimbriae of *E. coli*// In: *Fimbriae, Adhesion, Genetics, Biogenesis and vaccines* (Klemm P Ed.) CRC Press Boca Raton, FL. P. 9-26, 1994
 161. Knudsen TB, Klemm P. Probing the receptor recognition site of the FimH adhesin by fimbriae-displayed FimH-FocH hybrids// *Microbiology Jul*;144 (Pt 7):1919-29, 1998
 162. Korhonen T. K., Leffler H., Svanborg C. et al. Binding specificity of palliated strains of *E. coli* and *S. typhimurium* to epithelial cells, *Saccharomyces cerevisiae* cells, and erythrocytes// *Infect. Immun.*, vol. 82, p. 796-804, 1981
 163. Kornegay E.T., Thomas H.R. Bacterial and yeast preparations for starter and grower rations // Virginia polytechnic Institute and State University, Research Division Report, N 151. - Blacksburg, Virginia, USA, 1973
 164. Lilly D.M., Stillwell R.H. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms// *Science* 147.- P.747-748, 1965
 165. Linwood CA, Law H, Richardson S et al. Glycopeptid binding of purified and recombinant *E. coli* produced verotoxin in vitro// *J Biol Chem*, 262, 8834-8839, 1987

166. Litalien C, Proulx F, Mariscalco MM, Robitaille P, Turgeon JP, Orrbine E, Rowe PC, McLaine PN, Seidman E. Circulating inflammatory cytokine levels in hemolytic uremic syndrome// *Pediatr Nephrol* 13:840–845, 1999
167. Ludwig K, Bitzan M, Zimmermann S, Kloth M, Ruder H, M ller-Wiefel DE. Immune response to non-O157 vero toxin-producing E.coli in patients with hemolytic-uremic syndrome// *J Infect Dis*, 174:1028-1039, 1996
168. Mack DR, Michail S, Wei S, McDougall L, Hollingsworth MA. Probiotics inhibit enteropathogenic E. coli adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression// *Am J Physiol* Apr;276 (4 Pt 1):G941-50, 1999
169. Madsen KL. The use of probiotics in gastrointestinal disease// *Can J Gastroenterol*, 15(12):817-22, Dec 2001
170. Mark DR, Michail S, Wei S, Mc Dougall L. Probiotics inhibit enteropathogenic E.coli adherence in vitro by including intestinal mucin gene expression// *Am J Physiol*, 276(4 Pt 1): G 941-50, Apr 1999
171. Matsumoto M, Tani H, Ono H, Ohishi H, Bonno Y. Adhesive property of bifidobacterium lactis LKM 512 and predominant bacteria of intestinal microflora to human intestinal mucin// *Curr Microbiol*, 44(3), 212-215, March, 2002
172. Matsumura A, Saito T, Arakuni M, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T. New binding assay and preparative trial of cell-surface lectin from *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria// *J Dairy Sci* Dec;82(12):2525-9, 1999
173. Matsuzaki T, Chin J. Modulating immune response with probiotic bacteria// *Immunol Cell Biol*, 78(1):67-73, Feb 2000
174. Matsuzaki T, Chin J. Modulating immune responses with probiotic bacteria// *Immunol Cell Biol* Feb;78(1):67-73, 2000
175. Mc Cormick BA, Franklin DP, Laux DC, Cohen PC. Type I pili are not necessary for colonization of the streptomycin-treated mouse large intestine by type I –piliated E.coli F-18 and E.coli K-12// *Infect Immun*, v 57, p3022-3029, 1989
176. McInnes C, Engel D, Martin RW. Fimbriae damage and removal of adherent bacteria after exposure to acoustic energy// *Oral Microbiol Immunol*, 8(5):277-282, Oct, 1993
177. Meng J et al. Competitive exclusion as a method of prevent colonization of E.coli O157:H7 in cattle// *Society for Industrial Microbiology Ann Meeting*, Jul 1996
178. Menozzi FD, Debie AS, Tissier JP, Loch C, Pethe K, Raze D. Interaction of human Tamm-Horsfall glycoprotein with *Bordetella pertussis* toxin// *Microbiology* Apr;148(Pt 4):1193-201, 2002

179. Mitchel AR, Hayek LJ. *Lactobacillus* endocarditis// J Infect, 38(3):200-201, May 1999
180. Mitsuoka T. Intestinal flora and host // Asian Med. J. 31, N 7. P. 400-409, 1988
181. Mobasseleh M, Keusch GT, Seall E. Recent advances in verotoxin-producing *E.coli* infections// Elsevier Sci BV, p 159-162, 1994
182. Mombelli B, Gimondo MR. The use of probiotics in medicinal practice// Int J Antimicrob Agents 16 (4):531-6, Dec 2000
183. Mukai T, Asasaka T, Sato E et al. Inhibition of binding of *Helicobacter pylori* to the glycolipid receptors by probiotic *Lactobacillus reuteri*// FEMS Immunol Med Microbiol, 32(2):105-110, 14 Jan 2002
184. Murinda SE. Evaluation of colicins for inhibitory activity against diarrhegenic *E.coli* starins, including serotype O157:H7// Appl Environ Microbiol, 62:3196-3202, 1996
185. Myron M et al. A DNA probe to identify Enterohemorrhagic *E.coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic-uremic syndrome// J of Inf Dis, v 156, No1, p 175-182, July 1987
186. Nakayama M, Itoh K, Takabashi E. Cyclophosphamid induced bacterial translocation in *E.coli* C25-monoassociated specific pathogen-free mice// Microbiol Immunol, 41:8:587-593, 1997
187. Nataro JP, Kaper JB. Diarrhegenic *E.coli*// Clin Microbiol Rev, 11, 142-201, 1998
188. Neeser JR, Granato D, Rouvet M, Servin A, Teneberg S, Karlsson KA. *Lactobacillus johnsonii* La1 shares carbohydrate-binding specificities with several enteropathogenic bacteria// Glycobiology Nov;10(11):1193-9, 2000
189. Neeser JR, Granato D, Rouvet M, Servin A, Teneberg S. *Lactobacillus johnsonii* La1 shares carbohydrate-binding specificities with several enteropathogenic bacteria// Glycobiology, 10(11):1193-1199, Nov 2000
190. Neill MA, Christye DL, Tarr PI et al. Subclinical hemolytic uremic syndrome in causes of hemorrhagic colitis with *E.coli* O157:H7// Int Symposium and workshop on verotoxin-producing *E.coli* infections. Toronto: Jul 1987
191. Netherwood T, Bowden R, Harrison P, O'Donnell AG, Parker DS, Gilbert HJ. Gene Transfer in the Gastrointestinal Tract// Applied and Environmental Microbiology, November, p. 5139-5141, Vol. 65, No. 11, 1999
192. Netherwood T, Bowden R, Harrison P, O'Donnell AG et al. Gene transfer in the gastrointestinal tract// Appl Env Microbiol, v 65, No 11, p 5139-5141, Nov 1999

193. Newburg DS, Chaturvedi P, Lopez EL et al. Susceptibility to hemolytic-uremic syndrome relates to erythrocyte glycopospholipid patterns// *J Infect Dis*, 168:476-9, 1993
194. Nieuwenhuijs VB et al. The role of interdigestive small bowel motility in the regulation of gut microflora, bacterial overgrowth, and bacterial translocation in rats// *Ann Surg*, 228:2:188-193, 1998
195. O'Brien AD, Tesh VL, Donohue-Rolfe A et al. Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of actions, and role in pathogenesis// *Curr Topics Microbiol. Immunol.*, 180:65-94, 1992
196. Obrig TG. Pathogenesis of Shiga toxin (verotoxin)-induced endothelial cell injury// In: Kaplan BS, Trompeter RS, Moake JL, eds. Hemolytic-uremic syndrome and thrombocytopenic purpura. New York: Marcel Dekker, Inc, p 405-419, 1992
197. Oh S, Kim SH, Worobo RW. Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC// *J Dairy Sci* Dec;83(12):2747-52, 2000
198. Osset J, Barlotome RM, Garcia E, Andreu A. Assessment of the capacity of *Lactobacillus* to inhibit the growth of uropathogens and block their adhesion to vaginal epithelial cells// *J Infect Dis*, 183(3):485-491, 1 Feb 2001
199. Ostroff SM, Kobayashi JM, Lewis JH. Infections with *E.coli* O 157:H7 in Washington state: the first year of state wide disease surveillance// *JAMA*, 262, 355-359, 1989
200. Ouwehand AC, Kirjavainen PV, GroKnlund MM, Isolauri E, Salminen SJ. Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus// *International Dairy Journal* 9, 623-630, 1999
201. Ouwehand AC, Niemi P, Salminen SJ. The normal faecal microflora does not affect the adhesion of probiotic bacteria in vitro// *FEMS Microbiol Lett* Aug 1;177(1):35-8, 1999
202. Ouwehand AC, Tolkko S, Kulmala J, Salminen S, Salminen E. Adhesion of inactivated probiotic strains to intestinal mucus// *Lett Appl Microbiol* Jul;31(1):82-6, 2000
203. Ouwehand AC, Tuomola EM, Tolkko S, Salminen S. Assensment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus// *Int J Food Microbiol*, 64(1-2):119-26, 28 Feb 2001
204. Owens WE, Berg RD. Deviation of a breeding colony of germ-free athymic mice by cesarean section and faster nursing// *J Immunol Methods*, 42:1:115-119, 1981

- 205.Pai CH, Gordon R. Sporadic cases of hemorrhagic colitis associated with E.coli O157:H7// *Ann Intern Med*, 101:738-42, 1984
- 206.Pak J, Pu Y, Zhang ZT et al. Tamm-Horsfall protein binds to type I fimbriated E.coli and prevents E.coli from binding to uroplakin Ia and Ib receptors// *J Biol Chem*, 276(13):9924-3, Mar 2001
- 207.Parker R.B. Probiotics, the other half of the antibiotics story// *Animal Nutrition and Health*. 29. - P.4-8, 1974
- 208.Pat No 10147536 (1998). Agent for disease caused by bacterial toxin
- 209.Pat No 10265394 (1998) JN. Medicine for preventing and treating enterohemorrhagic E.coli infected disease
- 210.Pat No 10287521 (1998) O157 bactericine and its production
- 211.Pat No 10298105 (1998). Preventing and curing agent for infectious disease caused by enterohemorrhagic E.coli
- 212.Pat No 10330267 (1998). Verotoxin-neutralizing agent
- 213.Pat No 5747293 (05.05.98) GB. Intimin-like proteins of E.coli
- 214.Pat No 5750118 (12.05.1998) France. Vaccine method against swine dysentery
- 215.Pat No 9805329 (29.10.99) France. Sequence nucleotidique pour la detection de E.coli enterohemorrhagique (EHEC)
- 216.Pat No JP 11009281 (1999). Oligonucleotide for detecting bacteria and process utilizing the same
- 217.Pat No US 5798260 (25.08.98) USA. E.coli O157:H7 epithelial adhesin
- 218.Rasavi B, Shilling M. Chondritis attributable to *Lactobacillus* after ear piercing//*Diagn Microbiol Infect Dis*, 37(1):75-76, May 2000
- 219.Regan S, Chesney RW, Kaplan BS et al. Red cell membrane phospholipid abnormalities in the hemolytic-uremic syndrome// *Clin Nephrol*, 15:14-17, 1980
- 220.Reid G. probiotic agents to protect the urogenital tract against infection// *Am J Clin Nutr*, 73 (suppl), 437s-443s, 2001
- 221.Reid G. Probiotic Therapy and Functional Foods for Prevention of Urinary Tract Infections: State of the Art and Science// *Curr Infect Dis Rep* Dec;2(6):518-522, 2000
- 222.Riley LW, Remis RS. Hemorrhagic colitis associated with a rare E.coli serotype// *N Eng J Med*, 308:681-5, 1983
- 223.Riley MA, Wertz JE. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives// *Biochimie* 84, 357-364, 2002

224. Rocha F, Laughlin R, Musch MW et al. Surgical stress shifts the intestinal E.coli population to that of a more adherent phenotype: role in barrier regulation// *Surgery* 2001, 130(1):65-73, Jul 2001
225. Rogers A.L. and Kennedy M.J. Opportunistic Hyaline Hyphomycetes. In the book "Manual of Clinical Microbiology", 8 Ed. // American Soc.for Microbiology, Washington, D.C.-1991.-P.659-673
226. Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP et al. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections// *J Clin Microbiol*, 39(9):3282-9, Sep 2001
227. Sakagami Y; Ichise R; Kajimura K; Yokoyama H. Inhibitory effect of creosote and its main components on production of verotoxin of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7// *Lett Appl Microbiol*, 28(2):118-20, Feb 1999
228. Salminen S, Isolauri E, Salminen E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges// *Antonie Van Leeuwenhoek Oct*;70(2-4):347-58 1996
229. Salminen S, von Wright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D, de Vos WM, Fonden R, Saxelin M, Collins K, Mogensen G, Birkeland SE, Mattila-Sandholm T. Demonstration of safety of probiotics // *Int J Food Microbiol Oct* 20;44(1-2):93-106, 1998
230. Salmon RL. Outbreaks of E coli// *BMJ*;314:241 (25 January), 1997
231. Sanders TAB. Food production and food safety// *BMJ*;318:1689-1693 (19 June), 1999
232. Santé publique. Une nouvelle source d'infection par Escherichia coli// *CMAJ*;156(3):402, 1997
233. Savage D.C. Microorganisms associated with epithelial surfaces and stability of the indigenous gastrointestinal microflora // *Nahrung*. 31, N 5-6. - P. 383-395, 1987
234. Saxelin M., Elo S., Salminen S., Vapaatalo H. Dose response colonization of faeces after oral administration of Lactobacillus casei strain GG// *Ecol. Health and Disease Roczniakowa B., Kujawa K. Lactobacillus acidophilus w profilaktyce i leczeniu zaburzen trawiennych u zwierzgt* // *Prz. hodow.* - 1987. - 55, N 3. - P. 5-7 4, N 4. - P.209-214, 1991
235. Schaechter M., Medoff G., Eisenstein B.I.//*Mechanisms of Microbioal Disease –2 nd ED. – Baltimore, 1991*
236. Schembri M, Hasman H, Klemm P. Expression and purification of the mannose recognition domain of the FimH adhesin / *FEMS Microbiology Letters* ,v.188 p147, 2000

237. Schembri M., Hasman H., Klemm P. / Expression and purification of the mannose recognition domain of the FimH adhesin / FEMS Microbiology Letters, 2000, v.188 p147.
238. Sekiya J. Escherichia coli O157:H7 chez les animaux de rente au Japon// Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 16 (2), 391-394, 1997
239. Sonnenborn U et al. Antagonismus von E.coli gegen andere Mikroorganismen// In Beziehungen zwischen Wirtsorganismus und Darmflora, 2nd Ed. Stuttgart-NY, p55-69, 1991
240. Spencer RJ, Chesson A. The effect of Lactobacillus spp. on the attachment of enterotoxigenic Escherichia coli to isolated porcine enterocytes// J Appl Bacteriol 1994 Aug;77(2):215-20
241. Suzuki K, Bakaletz LO. Synergistic effect of adenovirus type 1 and nontypeable Haemophilus influenzae in a chinchilla model of experimental otitis media// Infect. Immun., May, 1710-1718, Vol 62, No. 5, 1994
242. Tachikawa T, Seo G, Nakazawa M, Sueyoshi M, Ohishi T, Joh K. Estimation of probiotics by infection model of infant rabbit with enterohemorrhagic E.coli O157:H7// Kansenshogaku Zasshi, 72(12):1300-1305, Dec 1998
243. Tachikawa T, Seo G, Nakazawa M, Sueyoshi M, Ohishi T, Joh K. [Estimation of probiotics by infection model of infant rabbit with enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7]// Kansenshogaku Zasshi, 72(12):1300-5, Dec 1998
244. Takahashi M, Taguchi H, Yamaguchi H, Osaki T, Sakazaki R et al. Antagonistic interaction between Clostridium butyricum and Enterohemorrhagic E.coli O157:H7// Kansenshogaku Zasshi, 73(1):7-14, Jan 1999
245. Takahashi M, Taguchi H, Yamaguchi H, Osaki T, Sakazaki R, Kamiya S. [Antagonistic interaction between Clostridium butyricum and enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7]// Kansenshogaku Zasshi, 73(1):7-14 Jan 1999
246. Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. The microbiology of primary dental caries in humans// J Dent Educ, 65(10):1028-37, Oct 2001
247. Tarr P, Bilge SS, Besser TE, Vary JrC. Escherichia coli O157:H7 epithelial adhesin// US5798260
248. Tarr P, Fouser LS, Stapleton AE et al. Hemolytic uremic syndrome in a six-year old girl after an urinary tract infection with shiga-toxin-producing E.coli O193:H2// N Eng J Med, 335:635-638, 1996

249. Tarr P, Neill MA, Clausen CR et al. E coli O157:H7 and the hemolytic uremic syndrome: importance of early cultures in establishing the etiology// *J Infect Dis*, 162:553-556, 1990
250. Taylor CM, Milford DV, Rose PE et al. The expression of blood group P1 in post enteropathic hemolytic-uremic syndrome// *Pediatr Nephrol*, 4:59-61, 1990
251. Thompson C, McCarter YS, Krause PJ et al. Lactobacillus acidophilus sepsis in neonate. *J Perinatol*, 21(4):258-260, Jun 2001
252. Tiina I. Karu TI, Pyatibrat LV, Ryabykh TP. Nonmonotonic behavior of the dose dependence of the radiation effect on cells in vitro exposed to pulsed laser radiation at $\lambda = 820$ nm// *Lasers in Surgery and Medicine*, Volume 21, Issue 5, p 485-492, 1999
253. Tuomola EM, Ouwehand AC, Salminen SJ. Chemical, physical and enzymatic pre-treatments of probiotic lactobacilli alter their adhesion to human intestinal mucus glycoproteins// *Int J Food Microbiol* Sep 15;60(1):75-81, 2000
254. Tuomola EM, Ouwehand AC, Salminen SJ. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus// *FEMS Immunol Med Microbiol* Nov;26(2):137-42, 1999
255. Tuomola EM, Salminen SJ. Adhesion of some probiotic and dairy Lactobacillus strains to Caco-2 cell cultures// *Int J Food Microbiol* May 5;41(1):45-51, 1998
256. Tuttle J, Gomez PM, Doyle MP et al. Lesson from a large outbreak contamination of hamburger patties// *Epidemiol and Infect*, 122 No 2, p 185-192, 1999
257. Vernozy-Rozand C. Les Escherichia coli vřrotoxiques (VTEC) et Escherichia coli O157:H7 en clinique et en agro-alimentaire// *ABC –Annales de Biology Clinique*, Numřro 5 - Septembre - Octobre 1999
258. Verweyen HM, Allerberger HK, Zimmerhackl FLB. Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) in Pediatric Hemolytic-Uremic Syndrome: a Prospective Study in Germany and Austria// *Infection* 27, No.6, 341-348, 1999
259. Verweyen HM, Karch H, Allerberger F et al. Enterohemorrhagic E.coli (EHEC) in pediatric hemolytic-uremic syndrome: a prospective study in Germany and Austria// *Infection* No 6, p 341-347, 1999
260. Vilpponen-Salmela T, Alander M, Satokari R, Bjorkman P, Kontula P, Korpela R, Saxelin M, Mattila-Sandholm T, von Wright A. Probiotic bacteria and intestinal health: new methods of investigation// *J Physiol Paris* Mar-Apr;94(2):157-8, 2000
261. Virkola R, Westerlund B, Holthuffer H et al. Binding Characteristics of E.coli adhesions in human Urinary bladder// *Inf Imm*, p 2615-2622, Oct 1988

262. Virkola R., Westerlund B., Holthofer H. et al. Binding Characteristics of Escherichia coli Adhesins in Human Urinary Bladder// *Infection and Immunity*, Oct., Vol.56, No. 10, p. 2615-2622, 1988
263. Waddell T, Head S, Petric M et al. Globotriosil ceramide is specifically recognized by the E.coli verotoxin 2// *Biochem Biophys Res Commun*, 15:674-679, 1988
264. Walterspiel JN, Ashkenazi S, Morrow AL et al. Effect of subinhibitory concentration of antibiotics on extracellular Shiga-like toxin I// *Infection*, 20:25-29, 1992
265. Watanabe H, Akito W, Yoshishige Inagaki et al. Outbreak of enterohemorrhagic E.coli O157:H7 infection by two different genotype strains in Japan, 1996// *The Lancet*, v 348, 21 Sept 1996
266. Watanabe Y, Ozasa K, Mermin JH, Griffin PM, Masuda K, Imashuku S, Sawada T. Factory outbreak of Escherichia coli O157:H7 infection in Japan// *Emerg Infect Dis*, 5(3):424-8 May-Jun 1999
267. Wetscherek W. Milchsäurebakterien statt antibiotika in der Kalbermast// *Forderungsdienst* 35, N 1. - P. 19-21, 1987
268. Wolska-Duda I, Dulawa J, Kokot F. [Urinary excretion of Tamm-Horsfall protein, albumin and beta-2 microglobulin in children with recurrent urinary tract infection]// *Pol Merkuriusz Lek* Jul;11(61):36-9, 2001
269. Wright von A, Salminen S. Probiotics: established effects and open questions// *Eur J Gastroenterol Hepatol* Nov;11(11):1195-8, 1999
270. Wu C, Li Z, Xiong D. Relationship between enteric microecologic disbiosis and bacterial translocation in acute necrotizing pancreatitis// *World J Gastroenterol*, 4(3) 242-245, Jun 1998
271. Wu C, Li Z. The pathogenesis of infection complicated by acute necrotizing pancreatitis: an experimental study// *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 36(4):230-233, Apr 1998
272. Wu Q, Wang Q, Taylor KG, Doyle RJ. Subinhibitory concentrations of antibiotics affect cell surface properties of *Streptococcus sobrinus*// *Journal of Bacteriology*, Mar.;177(5):1399-401, 1995
273. Yamamoto T, Fujita K, Yokota T. Adherence characteristics to Human small intestine mucosa of E.coli isolated from patients with diarrhea or urinary tract infections// *JID*, 162:896-908, 1990
274. Young J. European market developments in prebiotic- and probiotic-containing foodstuffs// *Br J Nutr* Oct;80(4):S231-3, 1998

275. Yu J, Kaper JB. Cloning and characterization of the eae gene of enterohemorrhagic *E.coli* O157:H7// *Mol Microbiol*, 6:411-417, 1992
276. Zhanel GG, Nicolle LE. Effect of subinhibitory antimicrobial concentration (sub MIC) on in vitro bacterial adherence to uroepithelial cells// *J Antimicrob Chemother*, 29(6):617-27, Jun 1992
277. Zhang X, Rosenberg HM, Doyle RJ. Inhibition of the cooperative adhesion of *Streptococcus sanguis* to hydroxylapatite// *FEMS*, Sep. 15; 59(3):315-8, 1990
278. Zhao T, Doyle MP, Harmon BG, Brown CA et al. Reduction of Carriage of enterohemorrhagic *E.coli* O157:H7 in cattle by inoculation with probiotic bacteria// *J of Clin Microbiol*, v 36, No 3, p 641-647, March 1998
279. Zhou JS, Shu Q, Rutherford KJ, Prasad J, Birtles MJ, Gopal PK, Gill HS. Safety assessment of potential probiotic lactic acid bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lb. acidophilus* HN017, and *Bifidobacterium lactis* HN019 in BALB/c mice// *Int J Food Microbiol* May 25;56(1):87-96, 2000

В заключении считаю своим долгом выразить
благодарность н.б.н. Осиповой Ирике Григорьевне и
н.м.н. Васильевой Елене Александровне за научное
руководство, а так же профессору Далику Михаилу
Викторовичу и профессору Уткесу Александру
Вениаминовичу за неоценимую помощь в написании
работы, терпение и доброту.