6. Субботин, В.В. Основные элементы профилактики желудочно-кишечной патологии новорожденных животных // Ветеринария: стилистический научно-практический журнал. – М., 2004. – №1. – 3-6 с.

УДК 619:615.28:637.12.045

ИЗУЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА В СИСТЕМЕ IN VITRO

П.А. Красочко[1], Д.С. Борисовец[1], Г.Е. Толяронок[1], П.С. Чайковский[1], Я.П. Яромчик[2]

[1] – РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

[2] – УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

(Поступила в редакцию 16.07.2014 г.)

Аннотация. *Изучены антибактериальные свойства комплексных препаратов на основе рекомбинантного лактоферрина, наночастиц серебра и цинка в системе in vitro.*

Установлено, что разработанные препараты обладают антимикробной активностью в отношении штаммов бактерий Escherichia coli, Salmonella choleraesuis, Proteus mirabilis, Klebsiella pneumoniae и Pasteurella multocida. Антимикробная активность разработанных комплексных препаратов была выше на 14,38-33,89% в сравнении с рекомбинантным ЛФ, на 9,03-32,65% и 10,19-62,85% по сравнению с наночастицами серебра и цинка соответственно.

Summary. *The antibacterial properties of complex preparations based on recombinant lactoferrin, zinc and silver nanoparticles were studied in vitro.*

It has been established that designed preparations possess the antimicrobial activity against Escherichia coli, Salmonella choleraesuis, Proteus mirabilis, Klebsiella pneumoniae, and Pasteurella multocida strains. In comparison with the recombinant LF, silver and zinc nanoparticles, the antimicrobial activity of developed complex preparations was higher at 14.38-33.89%, 9.03-32.65% and 10.19-62.85%, respectively.

Введение. В последнее время большое внимание уделяется использованию в ветеринарной медицине биологически активных веществ природного происхождения, обладающих антимикробным и иммунопротективным действием. Данные соединения позволяют снизить количество применяемых хемотерапевтических средств и, тем самым повысить качество получаемой сельскохозяйственной продукции [1].

Одним из таких веществ является лактоферрин (ЛФ) – белок сыворотки молока млекопитающих, который представляет собой железосвязывающий, многодоменный, полифункциональный гликопротеид с молекулярной массой около 80 кДа, отнесенный к семейству белков трансферринов. Помимо молока он широко представлен в различных секреторных жидкостях организма, таких как слюна, слеза, секреты носовых желез. Кроме того, ЛФ обнаружен в плазме крови, однако в значительно меньшей концентрации [5].

Молекула ЛФ секретируется в свободной от железа форме (аполактоферрин) [9] и обладает чрезвычайно высокой аффинностью к 3-х валентному железу [2, 13].

ЛФ является едва ли не единственным примером белка с уникальным набором биологических свойств различного характера. Будучи трансферриновым белком, он не только регулирует концентрацию ионов железа в крови и секретах, но и обладает ярко выраженным антимикробным, антивирусным и противогрибковым действием. ЛФ считается одним из важнейших иммунных факторов молока. Он участвует в защитных реакциях организма и регулирует функции иммунокомпетентных клеток. Кроме того, установлены его противовоспалительные и противоопухолевые свойства [5].

Антибактериальная активность для этого белка была установлена в отношении ряда бактерий, включая патогенные для человека и животных штаммы Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Shigella dysenteriae, Listeria monocytogenes, Streptococcus spp., Vibrio cholerae, Klebsiella pneumoniae, Enterococcus spp., Bacillus subtilis [8, 10, 12, 14]. Было установлено, что бактериостатическая функция ЛФ определяется его способностью связывать железо из окружающей среды, что угнетает рост микроорганизмов.

Однако, по данным Rainard et al. (1986), наиболее чувствительными к его действию оказались штаммы Escherichia coli, а некоторые штаммы Staphylococcus aureus проявляли устойчивость к ЛФ [11]. Это заставило предполагать, что механизм антибактериального действия ЛФ сложнее, нежели простое удаление железа из среды. В дальнейшем было открыто множество противопатогенных активностей ЛФ, большинство из которых определяются прямым действием ЛФ на бактерию.

Молекулярный механизм бактерицидной активности ЛФ для Грам- и Грам+ микроорганизмов сходен и в обоих случаях вызывает разрушение бактериальной мембраны. Для грамнегативных бактерий установлено, что ЛФ связывается с так называемыми порinами, которые находятся на внешней мембране микроорганизмов [3], и индуцирует быстрое освобождение липополисахаридов. Это приводит к повышенной осмо-

чувствительности клетки микроорганизма, доступности к лизоциму и др. антибактериальным факторам, и, как следствие, гибели бактерии [7].

Таким образом, на этом механизме может быть основано применение комплексных противобактериальных препаратов на основе рекомбинантного ЛФ в сочетании с различными антимикробными препаратами, проникновение которых в микробную клетку будет происходить более эффективно в связи с нарушением целостности наружной мембраны в результате воздействия на нее ЛФ. Это, в свою очередь, может приводить к синергичному бактерицидному эффекту.

Цель работы – изучить антибактериальные свойства комплексных препаратов на основе рекомбинантного ЛФ, наночастиц серебра и цинка в системе in vitro.

Материал и методика исследований. Исследования проводились в отделе вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Изготовление комплексных препаратов проводилось с использованием ЛФ рекомбинантного, изготовитель УО «Белорусский государственный университет»; препаратов наноразмерных частиц серебра «Наноарговир» и оксида цинка «Иммунонаноцинк», изготовитель РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Концентрация ЛФ рекомбинантного в препаратах составляла 10 мг/мл; наноразмерные частицы серебра использовали в разведении 1:10, цинка – 1:320. Соотношения компонентов в препаратах (ЛФ:наночастицы серебра; ЛФ:наночастицы цинка) составляли 1:1.

Для проведения исследований изготовлено два комплексных препарата: один – на основе ЛФ рекомбинантного и наночастиц серебра, второй – с использованием рекомбинантного ЛФ и наноразмерных частиц цинка.

В качестве тест-культур для определения антимикробной активности комплексных препаратов использовали штаммы Escherichia coli КМИЭВ-39А, Salmonella choleraesuis КМИЭВ-В131, Proteus mirabilis КМИЭВ-44, Klebsiella pneumoniae КМИЭВ-В106, Pasteurella multocida КМИЭВ-95, депонированные в коллекции микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Тест-культуры бактериальных штаммов выращивали на мясопептонном агаре при температуре 37°С в течение 24 часов. Концентрацию бактериальных клеток тест-культур доводили 0,85%-м раствором хлористого натрия до 20 единиц МОС.

Для постановки реакции в опытные пробирки с 4,5 $см^3$ мясопептонного бульона вносили по 1,0 $см^3$ испытуемого препарата, а затем по 0,1 $см^3$ взвеси тест-культуры. В контрольные пробирки с мясо-

пептонным бульоном добавляли по 0,1 $см^3$ тест-культур и определяли положительный контроль оптической плотности содержимого опытных пробирок. Для постановки отрицательного контроля в пробирки с мясо-пептонным бульоном вносили по 1,0 $см^3$ каждого образца препарата. После перемешивания содержимого опытных и контрольных пробирок, из каждой пробирки отбирали по 2,0 $см^3$ ее содержимого, которое вносили в кюветы с рабочей длиной (10,0±0,1) мм и измеряли оптическую плотность с помощью спектрофотометра «Metertech SP-8001 UV-VIS» при длине волны 590 нм, оставшееся содержимое в опытных и контрольных пробирках выдерживали в термостате при температуре 37°С в течение 3 часов, а затем проводили три последовательных измерения оптической плотности его содержимого.

Антимикробную активность препаратов в отношении к штаммам бактерий определяли по формуле:

$$ААП = 100 - \frac{(Д_2 - Д_1) - (Д_{2пр} - Д_{1пр})}{Д_4 - Д_3} \times 100\%,$$

где: ААП – антимикробная активность препарата;

$Д_1$ – оптическая плотность содержимого опытных пробирок в начале опыта;

$Д_2$ – оптическая плотность содержимого опытных пробирок через 3 часа термостатирования;

$Д_{1пр}$ – оптическая плотность содержимого пробирки отрицательного контроля в начале опыта;

$Д_{2пр}$ – оптическая плотность содержимого пробирки отрицательного контроля через 3 часа термостатирования;

$Д_3$ – оптическая плотность содержимого пробирки положительного контроля в начале опыта;

$Д_4$ – оптическая плотность содержимого пробирки положительного контроля через 3 часа после термостатирования;

100 – максимально допустимое значение активности препарата, %.

Затем определяли среднее арифметическое значение величины антимикробной активности препаратов, посредством статистической обработки полученных результатов с использованием компьютерных программ StatBiom 2720 и MS Office Excel 2010.

Результаты исследований и их обсуждение. С помощью метода определения изменений оптической плотности тест-культур микроорганизмов был установлен уровень антимикробной активности двух комплексных препаратов на основе рекомбинантного ЛФ и наноразмерных частиц цинка препарата, рекомбинантного ЛФ и наночастиц

серебра в сравнении с монокомпонентами сконструированных препаратов (таблица).

Таблица – Антимикробная активность комплексных препаратов на основе рекомбинантного ЛФ и наночастиц биоэлементов

Тест-культура	Антимикробная активность препарата, %				
	ЛФ+Zn	ЛФ+Ag	ЛФ	Zn	Ag
Escherichia coli	84,26±1,26	83,35±0,54	83,61±1,78	63,31±1,75	70,86±0,53
Salmonella choleraesuis	73,38±0,55	21,95±0,32	20,66±1,22	10,53±1,4	8,99±1,43
Proteus mirabilis	83,05±1,78	89,32±1,76	82,73±1,06	62,86±1,16	72,52±1,7
Klebsiella pneumoniae	92,68±1,24	82,07±0,55	76,48±0,34	66,22±1,34	83,65±0,55
Pasteurella multocida	82,32±1,12	86,6±1,73	27,92±0,33	33,3±1,12	53,95±1,24

Проведенные нами исследования показали, что исследуемые препараты обладали выраженными антимикробными свойствами в отношении используемых тест-культур микроорганизмов.

Наиболее высокая антибактериальная активность рекомбинантного ЛФ и наночастиц биоэлементов отмечалась в отношении тест-культур микроорганизмов Escherichia coli, Proteus mirabilis и Klebsiella pneumoniae, которая колебалась в пределах 62,86-83,65%. В то же время указанные препараты характеризовались сравнительно низкой антимикробной активностью к тест-культурам бактериальных штаммов Salmonella choleraesuis и Pasteurella multocida, диапазон значений которой составлял от 8,99 до 53,95%.

При совместном использовании рекомбинантного ЛФ с наночастицами биоэлементов в виде комплексных препаратов отмечен выраженный синергидный эффект, характеризующийся более высокими показателями антимикробной активности в сравнении с монокомпонентами. Так, при исследовании сочетания препарата рекомбинантного ЛФ с наночастицами серебра, антимикробная активность в сравнении с наночастицами серебра была выше в отношении к Escherichia coli на 12,49%, к Proteus mirabilis на 10,53%, Klebsiella pneumoniae на 9,03%, к Salmonella choleraesuis на 12,96% и Pasteurella multocida на 32,65%. Антимикробная активность указанного комплексного препарата была выше рекомбинантного ЛФ в среднем на 14,38±11,15%, достигая в некоторых случаях (в отношении Pasteurella multocida) 58,68%.

При изучении антимикробной активности комплексного препарата на основе рекомбинантного ЛФ и наночастиц цинка показатели в сравнении с наночастицами цинка были выше на 20,95% к Escherichia coli, на 62,85% к Salmonella choleraesuis, на 10,19% к Proteus mirabilis, на 26,46% к Klebsiella pneumonia и на 49,02% к Pasteurella multocida.

В сравнении с рекомбинантным ЛФ антимикробная активность сконструированного комплексного препарата была выше в среднем на 33,89±9,62%.

Сравнивая между собой два комплексных препарата, необходимо отметить более выраженный антибактериальный эффект образца препарата, сконструированного на основе рекомбинантного ЛФ и наночастиц цинка, который превышает данный показатель второго образца (ЛФ+Ag) в среднем на 10,48%, особенно в отношении тест-культуры Salmonella choleraesuis, где показатель антимикробной активности был выше на 51,43%.

Таким образом, на основании полученных данных можно утверждать, что взаимодействие рекомбинантного ЛФ и наноразмерных частиц цинка и серебра в составе комплекных препаратов носит синергический характер, что сопровождается увеличением антимикробной активности обоих компонентов в отношении тест-культур штаммов бактерий.

Возможным механизмом синергического эффекта сконструированных комплексных препаратов является независимое воздействие антимикробных веществ на различные бактериальные мишени, совокупное поражение которых имеет для бактерии критические последствия. В случае грамотрицательных бактерий одной из таких мишеней, как правило, является наружная мембрана.

Так, синергический эффект кооперативной системы, состоящей из ЛФ и наночастиц биоэлементов, на грамотрицательные бактерии объясняется известной способностью ЛФ выщеплять липополисахарид из наружной мембраны этих микроорганизмов [4, 6]. ЛФ в такой системе может нарушать структурно-функциональную целостность клеточной оболочки бактерий, что в свою очередь позволит ускорить процесс окислительного стресса в бактериальной клетке под действием наночастиц биоэлементов.

Заключение. Таким образом, сконструированные образцы комплексных препаратов на основе рекомбинантного ЛФ наноразмерных частиц серебра и цинка характеризуются синергическим эффектом компонентов, входящих в их состав, и более высокой антимикробной активностью, которая была выше на 14,38-33,89% в сравнении с рекомбинантным ЛФ, на 9,03-32,65% наноразмерных частиц серебра и на 10,19-62,85% по сравнению с наночастицами цинка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Изучение влияния протеолитических компонентов лактоферрина на иммунную систему лабораторных животных / С.А. Староверов [и др.] // Ветеринарная медицина XXI века. Инновации, обмен опытом и перспективы развития: материалы Междунар. науч.-

практ. конф., Саратов, 2012 г. / ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ»; редкол.: А.А. Волков [и др.]. – Саратов, 2012. – 298-299 с.
2. Baker, H.M. Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects of binding and release / H.M. Baker, E.N. Baker // Biometals. – 2004. – Vol. 17. – 209-216 p.
3. Correlation between human lactoferrin binding and colicin susceptibility in Escherichia coli / I. Gado [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. – 1991. – Vol. 35. – 2538-2543 p.
4. Ellison, R.T. Damage to the outer membrane of enteric Gram-negative bacteria by lactoferrin and transferring / R.T. Ellison, T.J. Giehl, F.M. LaForce // Infect. Immun. – 1988. – Vol. 56. – 2774–2781 p.
5. Gonzalez-Chavez, S.A. Lactoferrin: structure, function and applications / S.A. Gonzalez-Chavez, S. Arevalo-Gallegos, Q. Rascon-Cruz // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2009. – Vol. 33. – 301 p.e1-301.e8.
6. Lactoferrin inhibits the endotoxin interaction with CD14 by competition with the lipopolysaccharide-binding protein / E. Elass-Rochard [et al.] // Infect. Immun. – 1998. – Vol. 66. – 486–491 p.
7. Leitch, E.C. Synergic antistaphylococcal properties of lactoferrin and lysozyme / E.C. Leitch, M.D. Willcox // J. Med. Microbiol. – 1998. – Vol. 47. – 837-842 p.
8. Lonnerdal, B. Lactoferrin: molecular structure and biological function / B. Lonnerdal, S. Iyer // Annu. Rev. Nutr. – 1995. – Vol. 15. – 93-110 p.
9. Makino, Y. High-performance liquid chromatographic separation of human apolactoferrin and monoferric and diferric lactoferrins / Y. Makino, S. Nishimura // J. Chromatogr. – 1992. – Vol. 579. – 346-349 p.
10. Pakkanen, R. Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrums / R. Pakkanen, J. Aalto // Int. Dairy J. – 1997. – Vol. 7. – 285-297 p.
11. Rainard, P. Bacteriostatic activity of bovine milk lactoferrin against mastitic bacteria / P. Rainard // Vet. Microbiol. – 1986. – Vol. 11. – 387-392 p.
12. Susceptibilities against bovine lactoferrin with microorganisms isolated from mastitic milk / N.Y. Lee [et al.] // J. Vet. Med. Sci. – 2004. – Vol. 66. – 1267-1269 p.
13. Ward, P.P. Cooperative interactions between the amino- and carboxyl-terminal lobes contribute to the unique iron-binding stability of lactoferrin / P.P. Ward, X. Zhou, O.M. Conneely // J. Biol. Chem. – 1996. – Vol. 271. – 12790-12794 p.
14. Weinberg, E.D. Human lactoferrin: a novel therapeutic with broad spectrum potential / E.D. Weinberg // J. Pharm. Pharmacol. – 2001. – Vol. 53. – 1303-1310 p.