МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Матолыгина Дарья Андреевна

Бактериолитические свойства интерлейкина-2 человека

03.01.04 – биохимия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научные руководители:
доктор химических наук,
профессор А.В. Левашов
кандидат химических наук,
П.А. Левашов

Москва – 2019

Оглавление

1. Введение

Актуальность темы исследования. В последние годы в связи с появлением новых устойчивых к антибиотикам штаммов бактерий все острее встает вопрос о лечении инфекционных заболеваний, вызванных резистентными к антибиотикам бактериями. Ежегодно от бактериальных инфекций умирает порядка 0,7 миллиона человек, а к 2050 году при таких же темпах развития устойчивости к антибиотикам у бактерий эта цифра может составить до 10 миллионов смертей в год [1]. Всемирная организация здравоохранения составила список наиболее опасных бактерий, резистентных к широкому спектру антибиотиков. В такую группу бактерий входят: все виды, принадлежащие к семейству энтеробактерий (Enterobacteriaceae), а также представители других семейств *Acinetobacter baumanii, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Helicobacter pylori, Neisseria gonorrhoeae* [2; 3].

В качестве альтернативы антибиотикам в последние годы все чаще предлагают использовать различные бактериолитические факторы – ферменты, способные разрушать клеточную стенку бактерий и тем самым приводить к разрушению клетки или другими словами лизису клетки бактериальной клетки [4; 5]. Одним из самых известных бактериолитических факторов является куриный яичный лизоцим, который широко применяется в медицине [6; 7; 8].

В последнее время сообщается об открытии новых бактериолитических факторов. Так недавно была обнаружена бактериолитическая активность у выделенных из плазмы крови барана интерлейкина-2 и белка системы комплемента C2 [9]. Также было показано наличие бактериолитической активности у интерлейкина-2 человека (IL-2) [10]. IL-2 является одним из ключевых цитокинов иммунной системы человека, который отвечает за развитие иммунного ответа в организме. IL-2 в медицине используют при лечении сепсиса и раковых заболеваний в качестве иммуномодулирующего средства [11; 12].

Согласно литературным данным pH-зависимость для IL-2 имеет сходный характер с pH-зависимостью для известного бактериолитического фактора – лизоцима [10]. Бактериолитическая активность IL-2 уменьшается при увеличении ионной силы в реакционной смеси, аналогичное падение активности при увеличении ионной силы реакционной смеси наблюдается и для лизоцима. В связи со схожей картиной бактериолитического действия IL-2 и лизоцима, лизоцим был выбран в качестве модельного бактериолитического фактора для сравнения при изучении бактериолитической активности IL-2.

Отдельной методической задачей измерения бактериолитической активности является использование в качестве субстрата живых целых бактериальных клеток. Данные по бактериолитической активности, полученные на синтетических субстратах и на модельных препаратах клеточных стенок бактерий, не дают полноценного понимания особенностей действия бактериолитических факторов на бактериальные клетки в реальных условиях. Целью данной работы стало исследование активности бактериолитических факторов на живых бактериальных клетках.

Степень разработанности темы исследования. На момент предшествующий выполнению данной работы имелись литературные данные об обнаружении бактериолитической активности у IL-2 [10]. Было выявлено, что IL-2 активен по отношению к клеткам *Escherichia coli*. Также было показано, что IL-2 не проявляет активности в отношении *Micrococcus luteus* и *Bacillus subtilis*.

Цели и задачи работы. Целью данной работы стало изучение бактериолитических свойств IL-2 человека.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- обосновать правомерность использования метода турбидиметрии для изучения бактериолитической активности на живых бактериальных клетках;
- разработать единый подход к расчету скорости лизиса живых бактериальных клеточных субстратов в присутствии бактериолитических факторов турбидиметрическим методом;

- определить субстратную специфичность IL-2 человека на живых целых бактериях;
- выявить низкомолекулярные эффекторы, влияющие на активность IL-2 человека по отношению к живым целым бактериальным клеткам.

Научная новизна. В работе проведено изучение субстратной специфичности IL-2 человека и куриного яичного лизоцима в одинаковых условиях для широкого спектра бактерий (изучено влияние бактериолитических факторов на 36 видов живых бактерий). Впервые обнаружены низкомолекулярные вещества, способные существенно увеличивать бактериолитическую активность IL-2 человека и куриного яичного лизоцима по отношению к живым бактериям.

Теоретическая и практическая значимость работы. Определение бактериолитической активности IL-2 и лизоцима на различных живых бактериальных клетках необходимо для понимания эффективности действия бактериолитических факторов в реальных условиях. Обнаружение низкомолекулярных эффекторов, усиливающих действие IL-2 и лизоцима на живых бактериальных клетках, позволит разработать новые высокоэффективные лекарственные средства, основанные как на создании новых композиций бактериолитических факторов с эффекторами, увеличивающими активность бактериолитических факторов, так и на создании лекарственных средств, содержащих активирующие эффекторы, которые способны влиять на внутренние бактериолитические факторы организма.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработанный единый подход расчета скорости лизиса живых бактериальных клеточных субстратов в присутствии бактериолитических факторов позволяет количественно измерять скорость лизиса бактериальных субстратов с помощью метода турбидиметрии.
2. IL-2 лизирует (разрушает) бактерии семейств энтеробактерий, бацилл и лактобацилл. Лизоцим, в отличие от IL-2, обладает более широкой субстратной специфичностью.

3. Бактериолитическая активность IL-2 человека увеличивается в присутствии глутамата, аргинина, тирамина, триптамина, милдроната, полимиксина и бацитрацина. Бактериолитическая активность лизоцима увеличивается в присутствии глицина, лизина, глутамата, аргинина, полимиксина и бацитрацина.

Личный вклад автора. Представленные в работе данные получены лично автором или при непосредственном участии автора на всех этапах исследований. Автор самостоятельно изучил современные литературные данные по теме исследования и на основании изученных работ составил литературный обзор. Также автор самостоятельно собрал, обработал и проанализировал полученные результаты.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов обеспечена проведением экспериментов с помощью современных инструментальных методов анализа и статистической оценкой погрешностей результатов.

Результаты настоящей работы были представлены на следующих всероссийских и международных научных конференциях: International Conference of Biocatalysis 2015: Fundamentals and Applications, Московская область, Россия, 2015; Шестая Международная научная конференция «Термодинамика и кинетика», Тверь, Россия, 2016; V съезд физиологов СНГ, V съезд биохимиков России, Сочи, Россия, 2016; IX International congress «Biotechnology: state of the art and perspectives», Москва, Россия, 2017; Третий междисциплинарный симпозиум по медицинской, органической и биологической химии и фармацевтике – 2017 (МОБИ-ХимФарма 2017), Севастополь, Россия, 2017; Седьмая международная научная конференция «Химическая термодинамика и кинетика», Великий Новгород, Россия, 2017; Biocatalysis-2017: Fundamentals and Applications, Московская область, Россия, 2017; 42nd FEBS Congress «From molecules to cells and back», Иерусалим, Израиль, 2017; XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова, VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды», Москва, Россия, 2017; Восьмая международная научная конференция

«Химическая термодинамика и кинетика», Тверь, Россия, 2018; III Всероссийская научная конференция «Актуальные проблемы теории и практики гетерогенных катализаторов и адсорбентов», Иваново, Россия, 2018; Международная научно-практическая конференция «Состояние и перспективы разработки, использования биологически активных соединений в научной и практической деятельности», Брест, Беларусь, 2018.

Публикации. По результатам выполнения диссертационной работы опубликовано 6 статей в журналах, которые индексируются в Web of Science.

Связь работы с государственными программами. Работа выполнена при поддержке РНФ (проект №15-14-00012 «Исследование бактериолитической активности интерлейкина-2 человека»); ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» по теме «Создание новых медицинских сорбционных материалов для экстракорпоральных методов лечения сепсиса, сочетающих противомикробное действие и способность к сорбции бактериальных токсинов» (шифр заявки 2017-14-576-0053-142; уникальный идентификатор проекта RFMEF157417X0181; соглашение №14.574.21.0181).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, обсуждения полученных результатов, выводов и списка цитируемой литературы, состоящего из 414 ссылок. Диссертация изложена на 145 страницах и включает 39 рисунков и 7 таблиц.

2. Обзор литературы

2.1. Бактериолитические факторы

Бактериолитические факторы или ферменты – это высокомолекулярные вещества чаще всего белковой природы, способные вызывать лизис (разрушение) клеточной стенки бактерий. Многие природные бактериолитические факторы являются ферментами-гидролазами различной специфичности [13]. Бактериолитические факторы можно обнаружить у растений, грибов, животных, бактерий и бактериофагов [13].

Изучение бактериолитических факторов началось с описания П.Л. Лащенко в 1909 году вытяжек из куриных яиц, способных разрушать бактерии [14]. Позже А. Флеминг в 1922 году выделил и охарактеризовал фермент лизоцим, наиболее известный бактериолитический фермент в настоящее время [15]. Лизоцим у человека был обнаружен в слезах, грудном молоке и выделениях носоглотки, Флеминг предположил, что данный фермент используется для защиты организма от чужеродной микрофлоры.

Наиболее логичным представляется рассмотрение бактериолитических факторов с точки зрения их воздействия на бактерии. Бактериолитические факторы можно разделить на несколько групп относительно их влияния на различные микроорганизмы [16; 17]:

- автолизины – собственные ферменты, присутствующие в бактериях и участвующие в образовании и распаде клеточной стенки;
- эндолизины и экзолизины – ферменты жизненного цикла бактериофагов;
- внеклеточные ферменты бактерий (бактериоцины), секретируемые в окружающую среду с целью защиты данного микроорганизма от других бактерий.

Перед описанием бактериолитических факторов необходимо рассмотреть строение клеточной стенки бактерий для понимания механизма действия каждого из факторов.

Клеточная стенка – жесткая поверхностная структура бактериальной клетки, отвечающая за поддержание стабильной формы клетки и ее механическую защиту от внешних воздействий [18]. Бактерии принято разделять на два основных типа по методу окраски анилиновыми красителями по Граму. Таким образом, существуют грамположительные (краситель связывается с поверхностью микроорганизма) и грамотрицательные (краситель не связывается с поверхностью клетки) бактерии, строение клеточной стенки которых схематически показано на Рисунках 1 и 2.

Клеточная стенка типичных грамотрицательных бактерий состоит из внешней мембраны, пептидогликана, периплазмы и цитоплазматической мембраны. Цитоплазматическая мембрана – это фосфолипидный бислой с включенными в структуру белками, который включает в себя функции переноса электронов и транспорт питательных веществ [19]. Периплазма – это пространство между внешней и цитоплазматической мембранами у грамотрицательных бактерий, которое может занимать от 20 до 40% общего объема клетки [18]. Периплазматическое пространство включает в себя пептидогликан (будет рассмотрен ниже), различные белки, ферменты и олигосахариды [20]. В состав внешней мембраны входят белки, липопротеины и липополисахариды, главными задачами этого компартмента клетки являются селективный транспорт питательных веществ благодаря поринам (белковым каналам, пропускающим вещества определенного размера) и защитная функция, так например, липополисахариды в меньшей степени подвержены воздействию различных детергентов, органических растворителей и антибиотиков [21].

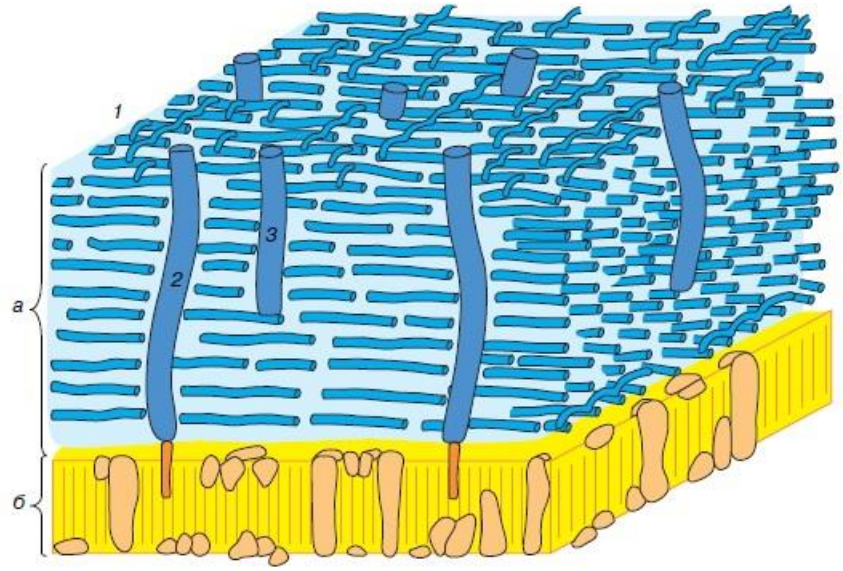

Рисунок 1 – Схема строения клеточной стенки грамположительных бактерий: а – клеточная стенка, б – цитоплазматическая мембрана, 1 – пептидогликан, 2 – липотейхоевые кислоты, 3 – тейхоевые кислоты [13]

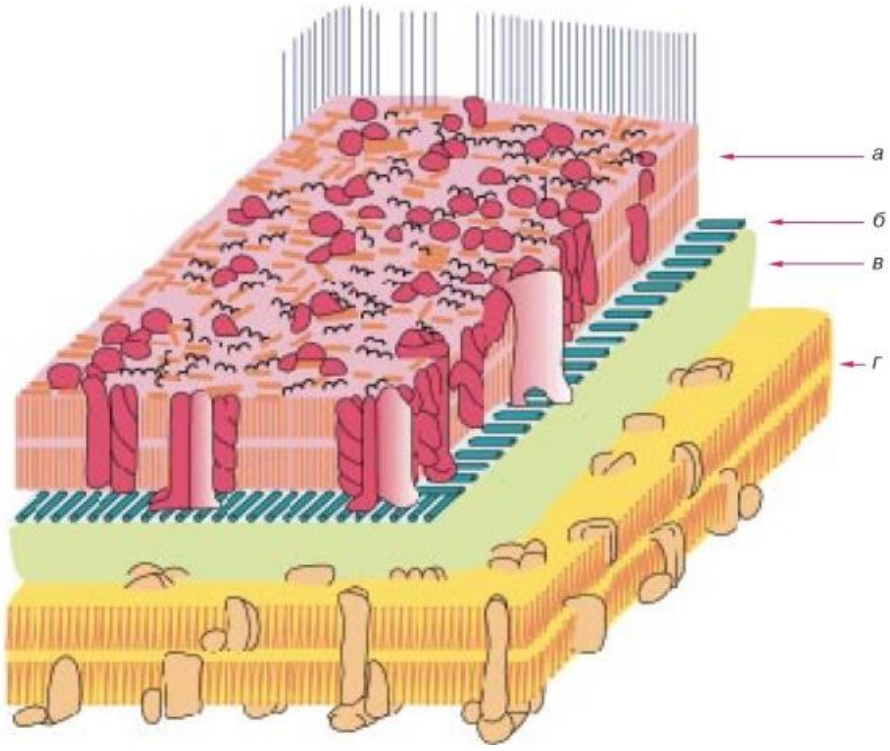

Рисунок 2 – Схема строения клеточной стенки грамотрицательных бактерий: а – внешняя мембрана, б – пептидогликан, в – периплазма, г – цитоплазматическая мембрана [13]

Клеточная стенка типичных грамположительных бактерий состоит из цитоплазматической мембраны, аналогичной цитоплазматической мембране грамотрицательных бактерий, и пептидогликана (муреина) [20]. Отличительными особенностями пептидогликана грамположительных бактерий являются его большая толщина, по сравнению с грамотрицательными бактериями, и наличие тейхоевых и липотейхоевых кислот (Рисунок 3) [19]. Тейхоевые и липотейхоевые кислоты несут отрицательный заряд, что обуславливает их функции переносчика катионов, питательных веществ и регуляции действия автолизинов [22].

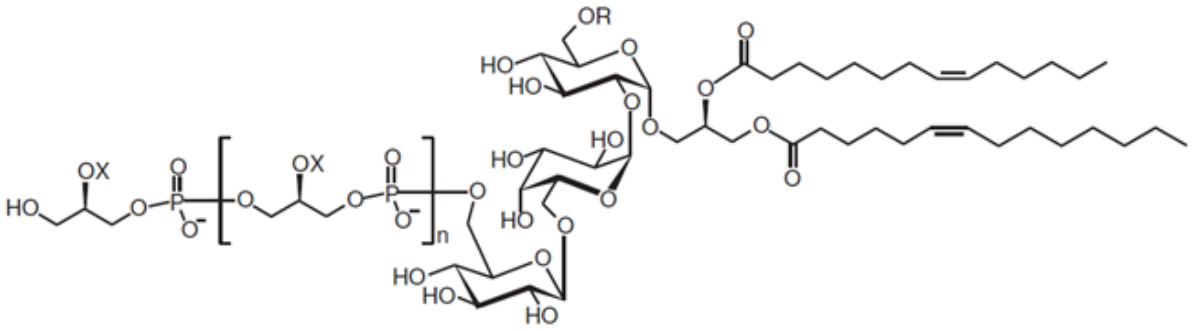

Рисунок 3 – Липотейхоевая кислота *Lactobacillus plantarum*. X – гидроксильная группа или D-аланин, R – гидроксильная группа [23]

Пептидогликановый слой – каркас клеточной стенки бактерий и главная мишень действия бактериолитических факторов. Пептидогликан состоит из полисахаридных цепей и пептидных мостиков (Рисунок 4). Мономерные звенья пептидогликанового слоя состоят из N-ацетилглюкозамина (NAG), связанного с N-ацетилмурамовой кислотой (NAM) 1,4-β-гликозидной связью [24]. Пептидная часть состоит из 4-5 остатков аминокислот, присоединенных с одной стороны свободной NH_2-группой к мурамовой кислоте, а с другой – связанных с пептидной частью соседней полисахаридной цепи [25]. Мономер пептидогликана является уникальной структурой, так как N-ацетилмурамовая кислота встречается только у бактерий, пептидные связи между L и D, D и D аминокислотами практически не встречаются в белках, в белках также редко встречаются такие аминокислоты, как диаминопимелиновая кислота, L-орнитин, L-лантионин [26].

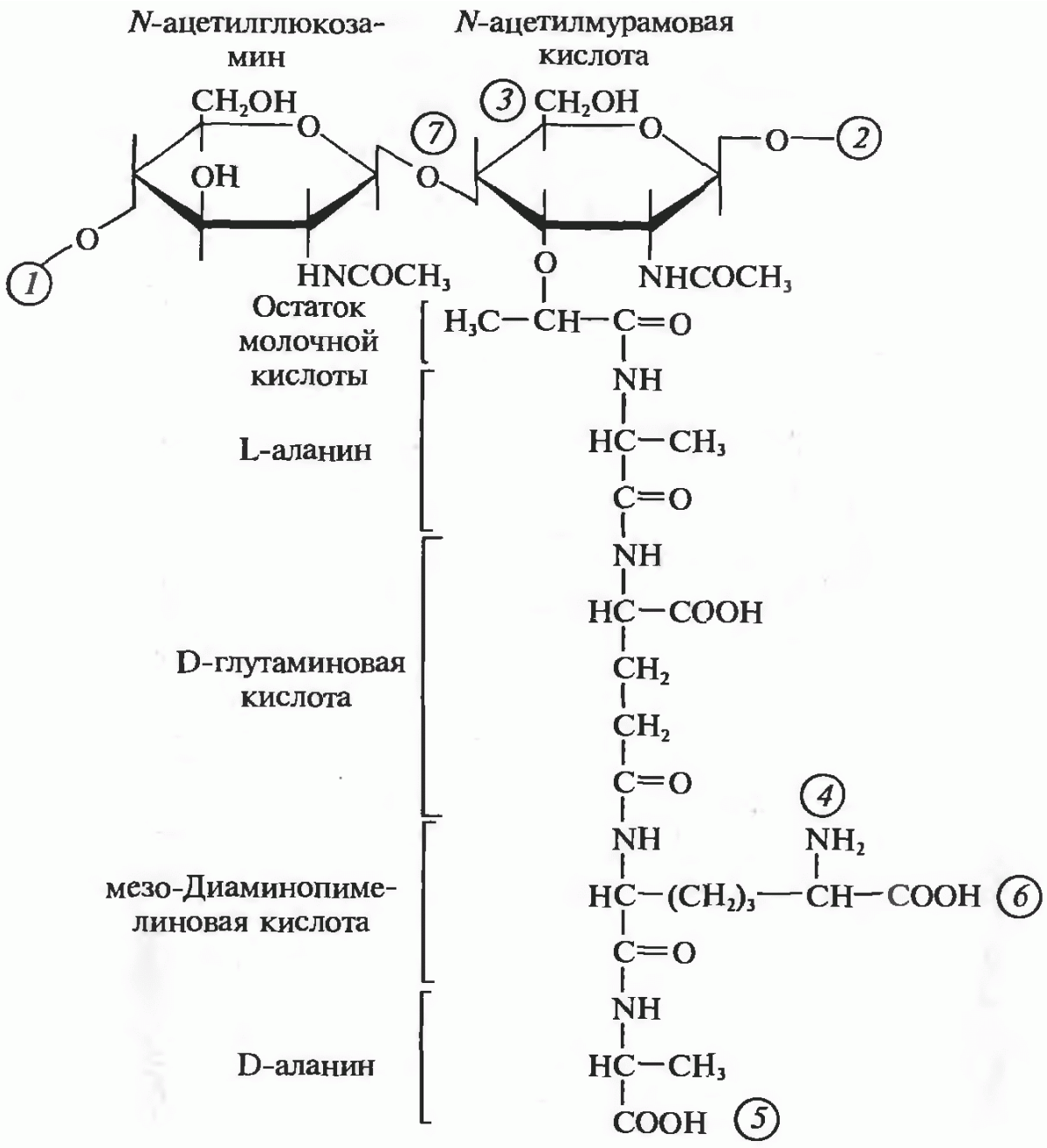

Рисунок 4 – Структура повторяющегося звена пептидогликана клеточной стенки бактерий. 1, 2 – места полимеризации полисахаридного остова, 3 – место присоединения тейхоевой кислоты к клеточной стенке грамположительных бактерий, 4, 5 – места связывания с полисахаридными цепями с помощью пептидных связей, 6 – место ковалентного связывания (пептидная связь) с липопротеином наружной мембраны у грамотрицательных бактерий, 7 – место гидролиза гликозидных связей [27]

Гликановый остов и пептидные мостики могут претерпевать различные модификации и замены для бактерий различных семейств. Так гликановый остов может подвергаться вторичной модификации (O-ацетилирование, N-деацетилирование, N-гликозилирование) (Рисунок 5), такие модификации способствуют увеличению устойчивости к бактериолитическим факторам (например, к лизоциму) [25; 28]. Аминокислотой, присоединенной непосредственно к NAM, чаще всего является L-аланин, но у некоторых видов бактерий может быть заменен на глицин (*Microbacterium lacticum, Mycobacterium leprae, Corynebacterium*) или L-серин (*Butyribacterium rettgeri*) (Рисунок 6) [26]. D-глутаминовая кислота во втором положении относительно NAM может подвергаться гидкроксилированию или амидированию, что приводит к образованию трео-3-гидроксиглутаминовой кислоты и D-глутамина соответственно [29]. Самым вариабельным участком пептидного мостика является третье положение относительно NAM. Самыми распространенными аминокислотами в данном положении являются мезо-диаминопимелиновая кислота (практически у всех грамотрицательных видов и у *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Mycobacterium*) и L-лизин (в основном у грамположительных видов) [26]. Также в этом положении встречаются другие диаминокислоты (например, L-орнитин, D-лизин, мезо-лантионин) и моноаминокислоты (L-гомосерин, L-аланин, L-глутаминовая кислота) [30]. Как и глутаминовая кислота во втором положении, аминокислоты в третьем положении могут подвергаться амидированию и гидроксилированию [31]. Аминокислоты в положениях 4 и 5 чаще всего представлены двумя D-аланинами, однако у некоторых видов бактерий D-аланин в 5 положении заменен на D-лактат (например, *Lactobacillus plantarum*) или D-серин (например, *Enterococcus hirae*) [32].

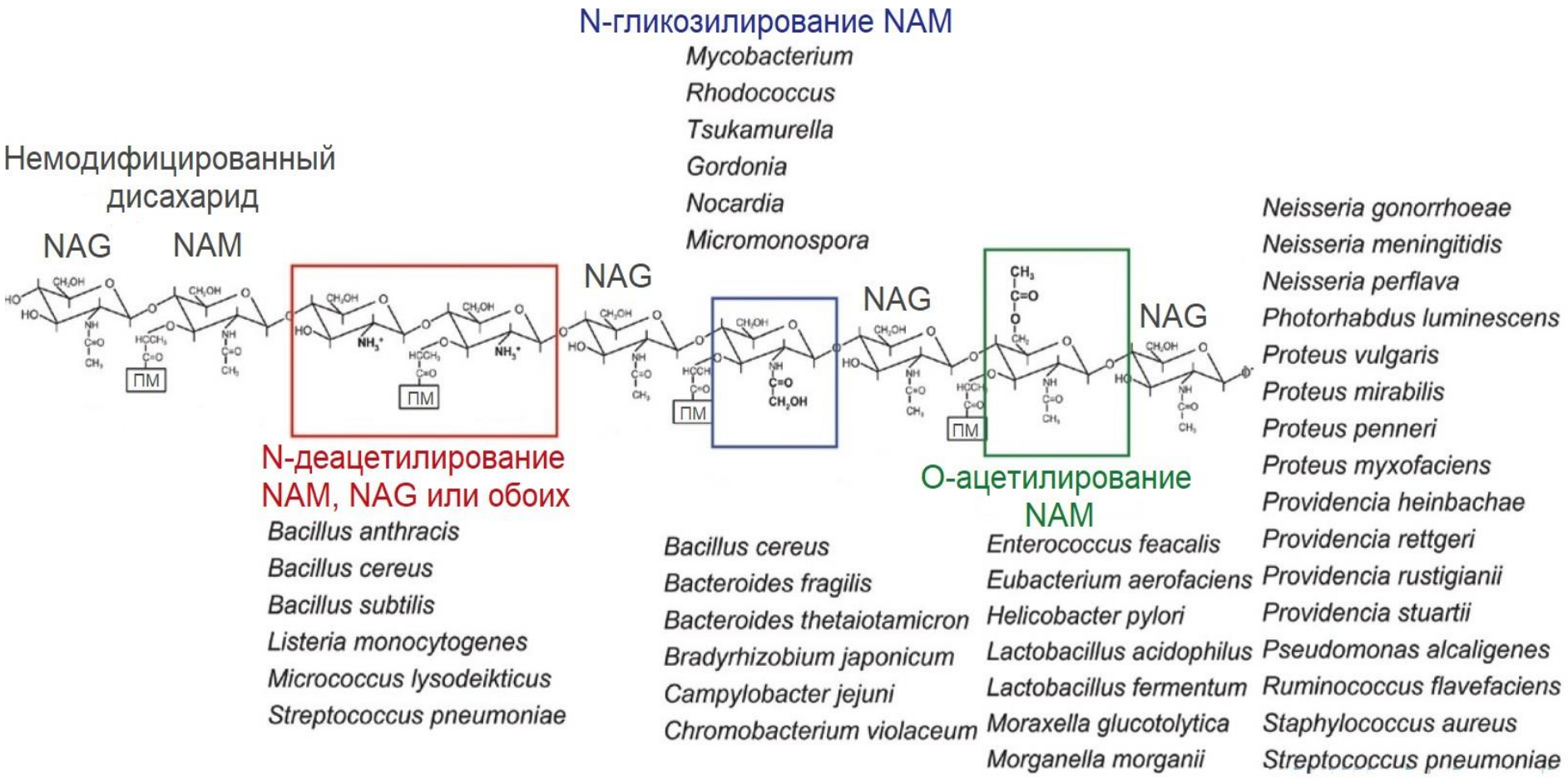

Рисунок 5 – Модификации гликанового остова. ПМ – пептидный мостик, NAG – N-ацетилглюкозамин, NAM – N-ацетилмурамовая кислота [29]

Рисунок 6 – Различия в структуре пептидного мостика, жирным шрифтом обозначены самые распространенные аминокислоты. G – NAG, M – NAM, Ala – аланин, Gly – глицин, Ser –серин, Glu – глутаминовая кислота, Gln – глутамин, мезо-A2pm – мезо-2,6-диаминопимелиновая кислота, Lys – лизин, Orn – орнитин, Lac – лактат [29]

Помимо вариаций в составе пептидных мостиков, существует различия в способе связи двух мономеров через пептидные мостики. Чаще всего аминокислота в 3 положении одного мономера связана с аминокислотой в 4 положении другого мономера (Рисунок 7), причем связь может быть как прямой

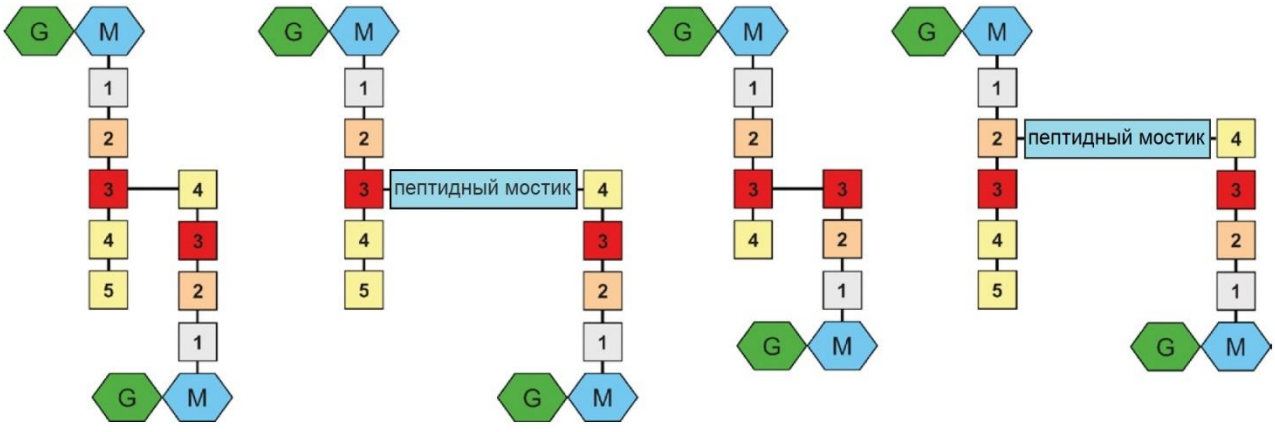

Рисунок 7 – Виды связей между мономерными звеньями пептидогликана. G – NAG, M – NAM [29]

(большинство грамотрицательных видов), так и с наличием нескольких дополнительных аминокислот (большинство грамположительных видов) [30]. У *Corynebacterium* аминокислота во 2 положении одного мономера связана с аминокислотой в 4 положении другого мономера [32]. В некоторых случаях связи 3-4 могут быть частично заменены на связи 3-3, что встречается у *Mycobacterium* и *Escherichia* [33].

Пептидогликан – необходимый компонент клеточной стенки бактерий, защищающий клетку от спонтанного разрушения. Однако пептидогликан не может оставаться неизменным и статичным в течение жизненного цикла клетки. За «пластичность» муреина отвечают собственные бактериолитические ферменты (автолизины), которые способны разрушать пептидогликановый остов в процессе деления клеток [34]. Автолизины – ферменты, относящиеся к классу гидролаз, которые можно разделить на два вида по местоположению разрушаемой связи в пептидогликановом слое: ферменты, разрушающие связь между остатками сахаров (гликозидазы), и ферменты, разрушающие пептидные связи между остатками аминокислот в пептидной части муреина (пептидазы) [35; 36].

Гликозидазы можно разделить на три группы: глюкозаминидазы, лизоцимы и литические трансгликозилазы [37; 38]. Глюкозаминидазы гидролизуют 1,4-β-гликозидную связь между NAG и NAM (Рисунок 8). Для примера, у грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli*) на данный момент охарактеризована цитоплазматическая глюкозаминидаза NagZ, у грамположительных (*Streptococcus pneumoniae*) – глюкозаминидаза LytB [39; 40]. Лизоцимы гидролизуют 1,4-β-гликозидную связь пептидогликана между NAM и NAG. Лизоцимы – наиболее изученные белки, так из *Streptococcus pneumoniae* был выделен автолизин LytC, который действует по механизму лизоцимов [41]. Литические трансгликозилазы аналогично лизоцимам разрушают 1,4-β-гликозидную связь NAM и NAG, но в отличие от лизоцимов разрыв связи происходит по негидролитическому механизму [42]. Трансгликозилазы связываются с пептдогликановым остовом аналогично лизоцимам, карбоксильная

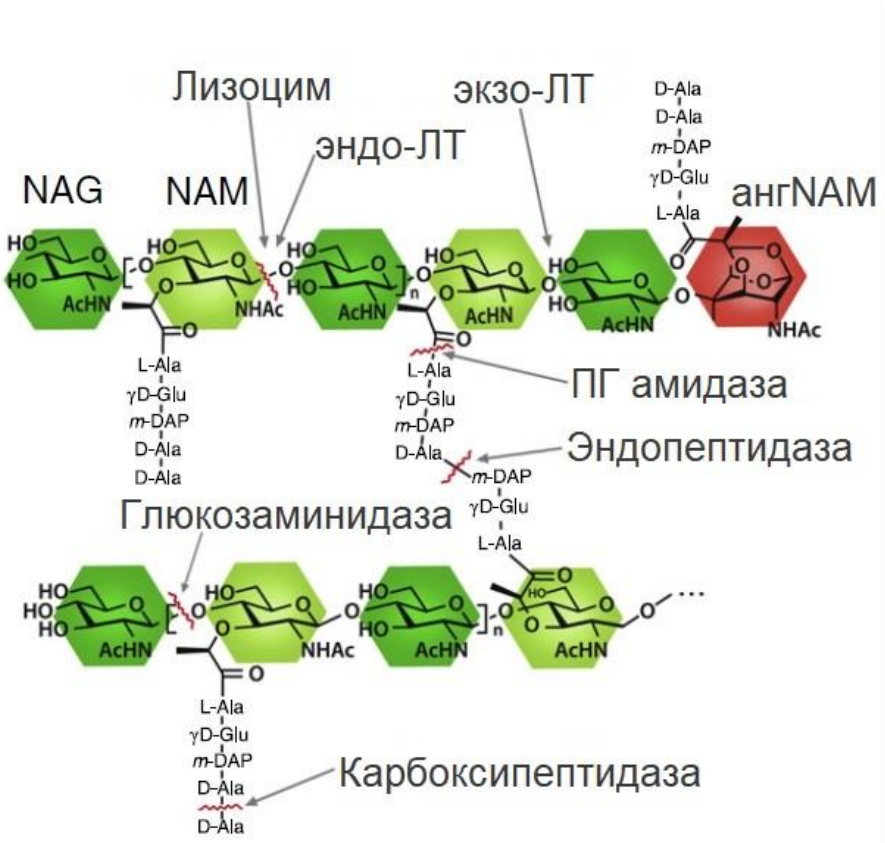

Рисунок 8 – Схема строения пептидогликана и сайты действия различных автолизинов. ПГ – пептидогликан, эндо-ЛТ – эндолитические трансгликозилазы, экзо-ЛТ – экзолитические трансгликозилазы, англNAM – 1,6-ангидромурамовая кислота [39]

группа протонирует гликозидный кислород и тем самым образует оксокарбониевый катион,сопровождающийся разрывом связи между NAM и NAG (Рисунок 9) [43]. Затем происходит внутримолекулярная циклизация, гидроксил С6 углерода связывается с кислородом оксокарбониевого катиона, при этом образуется невосстанавливающая 1,6-ангидромурамовая кислота и NAG [44]. Трансгликозилазы обладают как экзолитической, так и эндолитической активностью [45]. Описано множество трангликозилаз из бактерий, различных по природе и свойствам, при этом трансгликозилазы чаще всего разделяют на растворимые цитоплазматические и мембрансвязанные [46; 47].

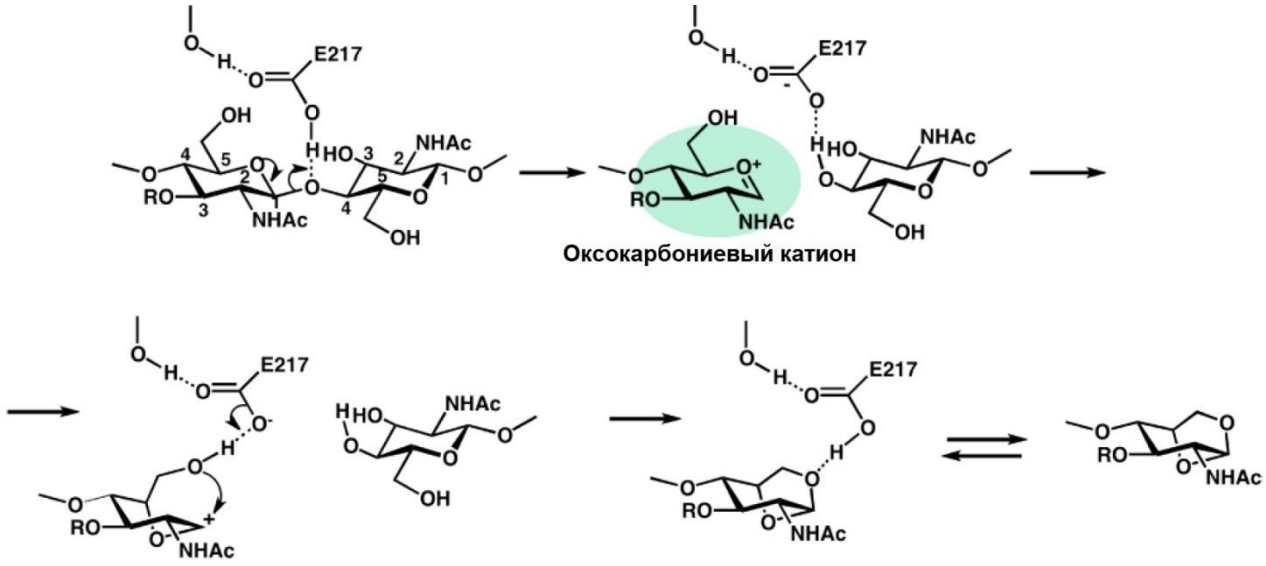

Рисунок 9 – Механизм действия литических трансгликозилаз [45]

Пептидазы можно разделить аналогично на три группы: амидазы, эндопептидазы и карбоксипептидазы (Рисунок 8) [48]. Амидазы разрушают амидную связь между L-аланином и NAM, при этом амидаза не действует на другие амидные связи в пептидном мостике [49]. Карбоксипептидазы отщепляют аминокислоты с С-конца пептидного мостика, которые затем используются для построения новых звеньев муреина [50]. Эндопептидазы являются весьма обширным классом и включают в себя множество ферментов, способных разрывать связь между различными аминокислотами пептидного мостика пептидогликана [35; 37].

Ферменты жизненного цикла бактериофагов (эндолизины и экзолизины) аналогично автолизинам бактерий можно отнести к классам пептидаз и гликозидаз [51; 52]. Бактериофаг способен связываться с определенным видом бактерий с помощью специфических рецепторов на поверхности бактериофага и вводить свою ДНК в цитоплазму клетки, предварительно разрушив часть пептидогликана необходимой величины [53]. Муреин разрушается в ходе синергетического действия белка холина (не путать с органическим соединением холин (2-гидроксиэтилтриметиламмоний)) и эндолизина бактериофага [54]. Название холин (holin) произошло от способности данного белка к встраиванию в мембрану клетки-мишени и образованию пор (hole) [55]. Холины представляют

собой небольшие трансмембранные белки размером от 60 до 145 аминокислотных остатков, наиболее изученным является холин S105 из бактериофага λ [56; 57]. После инфицирования бактерия начинает производить новые поколения бактериофагов либо литическим путем (ДНК бактериофага не встраивается в генетический аппарат бактерии), либо лизогенным (ДНК бактериофага встраивается в ДНК бактерии) (Рисунок 10) [58; 59; 60]. В связи с тем, что бактериофаги взаимодействуют с определенным видом бактерий, предполагается возможным использование бактериофагов как замены антибиотикам при лечении различных заболеваний бактериальной природы, и как потенциальных консервантов в пищевой промышленности [61; 62; 63; 64].

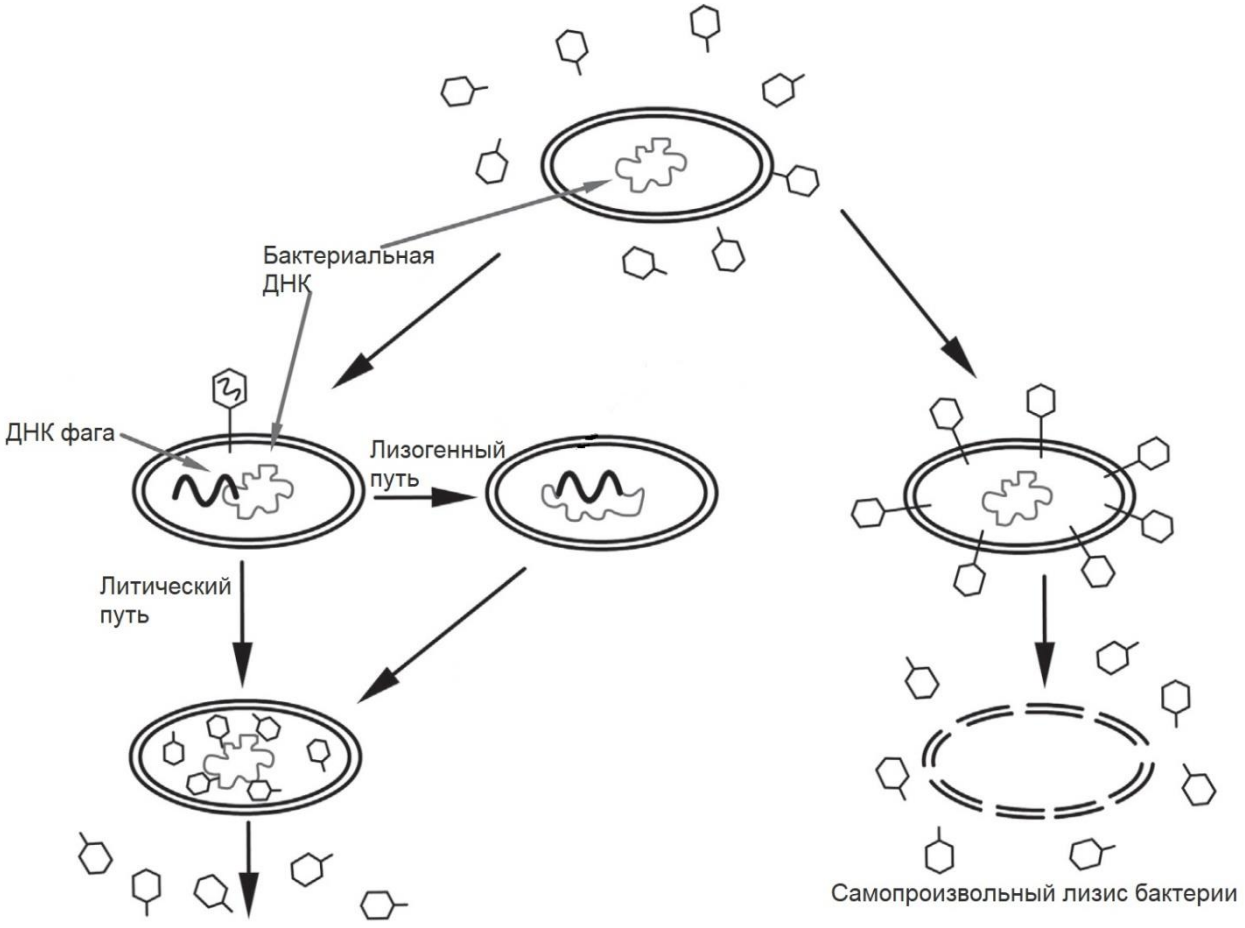

Рисунок 10 – Схематическое представление жизненного цикла бактериофага. Если количество бактериофагов будет превышать количество клеток-мишеней, то при множественном проникновении бактериофагов в клеточную мембрану может произойти самопроизвольный разрыв бактерии [59]

Помимо внутриклеточных автолизинов, которые регулируют синтез пептидогликана, бактерии способны производить ферментативные и неферментативные внеклеточные факторы пептидной и белковой природы с целью защиты клетки от других бактерий, называемые бактериоцинами [65]. Бактериоцины представляют собой неферментативные внеклеточные факторы, которые бактерии выделяют в окружающую среду против других конкурирующих видов бактерий. Отличительными особенностями бактериоцинов являются высокая активность при малых концентрациях и узкий спектр действия (на филогенетически близкие виды бактерий) [66]. Бактериоцины принято разделять на два вида по тому, из каких бактерий они были выделены граположительных или грамотрицательных. Микроцины и колицины – бактериоцины из грамотрицательных бактерий, которые различаются размером (микроцины массой меньше 5 кДа, колицины массой от 5 до 10 кДа) [65]. Оба вида не обладают бактериолитической активностью, такие бактериоцины связываются с рецепторами на поверхности клеточной стенки бактерии-мишени и через порины (белковые каналы во внешней мембране клетки, пропускающие вещества определенного размера) проникают к цитоплазматической мембране [67; 68]. После этого некоторые виды микроцинов и колицинов, связываясь с цитоплазматической мембраной, деполяризуют липидный бислой и таким образом создают поры во внутренней мембране [69]. При этом другие виды микроцинов и колицинов способны проникать внутрь клетки через цитоплазматическую мембрану и угнетать жизнедеятельность бактерии. Например, такие бактериоцины могут связываться с ДНК гиразой и ингибировать активность этого фермента по сшивке двойных разрывов в ДНК бактерии, препятствуя репликации ДНК [70]. Другие виды микроцинов и колицинов способны ингибировать РНК полимеразу, блокируя процесс транскрипции РНК [68]. Некоторые бактериоцины, находясь в цитоплазматической мембране, могут связываться с белками-переносчиками и сигнальными белками и блокировать поступление в бактерию-мишень питательных веществ или синтез клеточной стенки бактерий [69].

Бактериоцины из грамположительных бактерий делят на 4 класса. Первый класс включает в себя лантибиотики – пептиды массой меньше 5 кДа, отличительной особенностью которых является наличие аминокислоты лантионина (представляет собой связанные аланин и цистеин, причем β-атом углерода аланина связан с атомом серы цистеина), которые обладают мембранной активностью (связываются с рецепторами клеточной стенки и таким образом препятствуют различным процессам жизнедеятельности клетки) [71]. Ко второму классу относятся пептиды массой от 5 до 10 кДа, которые способны деорганизовать структуру клеточной мембраны и образовать поры (например, карноциклин А, лактококцин G) [72]. Карноциклин А представляет собой циклический пептид, состоящий из 60 аминокислотных остатков в виде соединенных между собой четырех α-спиралей [73]. Карноциклин А способен встраиваться в клеточную мембрану бактерии-мишени, образуя каналы для прохождения анионов через липидный бислой (например, NO_3^-, F^-, Cl^-, CH_3COO^-) [73]. Лактококцин G состоит из α- и β-субъединиц (39 и 35 аминокислотных остатков соответственно), представляющих собой α-спирали, и способен встраиваться в клеточную мембрану бактерий с образованием пор, через которые могут проходить катионы (например, Na^+, K^+) [74]. Третий класс бактериоцинов из грамположительных бактерий состоит из белков массой более 30 кДа и делится на собственно бактериолитические ферменты (лизостафин (пептидаза), энтеролизин А (гликозидаза)) и ферменты с нелитическим действием, некоторые из них влияют на метаболизм в клетке (гелветицин J, стрептококцин) [75]. К четвертому классу относятся комплексы бактериоцинов с липидами (лейконоцин S, уберолизин), данный класс бактериоцинов на данный момент плохо изучен [71].

Третий класс бактериоцинов из грамположительных бактерий представляет особый интерес для данной работы, поскольку такие бактериоцины способны напрямую разрушать клеточную стенку бактерий в основном посредством эндопептидазной активности [66]. Одним из наиболее изученных белков, принадлежащих к данному классу, является выделенный из *Staphylococcus*

simulans лизостафин, обладающий бактериолитической активностью по отношению к *Staphylococci* [76]. Лизостафин – металл зависимая эндопептидаза, способная разрушать пентаглициновый мостик клеточной стенки *Staphylococci* [77].

Бактериоцины благодаря узкому спектру действия представляют большой интерес для фармацевтической и пищевой промышленностей. Так в пищевой промышленности уже используются коммерческие препараты бактериоцинов: BioSafe™, HOLDBAC™, Bactoferm™ [78]. В фармацевтической промышленности предлагается использовать бактериоцины для лечения различных инфекций дыхательных путей, кожных покровов, желудочно-кишечного тракта и половой системы, нозокомиальных инфекций (внутрибольничных инфекций), а также туберкулеза [67; 71].

Недавно при выделении бактериолитических факторов из плазмы крови барана было обнаружена бактериолитическая активность у IL-2 (будет охарактеризован ниже) и у компонента системы комплемента C2 [9]. Система комплемента представляет собой ряд белков, находящихся в плазме крови, и отвечает за передачу сигнала антителам о воспалительном процессе, а также система комплемента обладает противовоспалительными функциями (связывается с иммунными комплексами и умершими клетками и помогает их выведению из кровотока и поврежденных тканей) [79]. Позже впервые была обнаружена и исследована бактериолитическая активность IL-2 человека [10]. Так IL-2 человека и IL-2 из плазмы крови барана проявляли одинаковую субстратную специфичность, разрушали бактерии *Escherichia coli* и не лизировали (не разрушали) микроорганизмы *Bacillus subtilis* и *Micrococcus luteus*, а белок C2 системы комплемента разрушал бактерии *Escherichia coli* и *Micrococcus luteus* и не разрушал (не лизировал) *Bacillus subtilis* [9;10]. Наличие у IL-2 человека бактериолитической активности расширяет понимание функциональности данного цитокина в иммунной системе человека и открывает новые перспективы использования IL-2 в лечении тяжелых заболеваний, сочетающих в себе несколько патологических процессов.

2.2. Лизоцим

Лизоцим (EC 3.2.1.17) – самый известный бактериолитический фермент. Существует несколько видов лизоцимов: c (куриный, к этому виду лизоцимов также относится человеческий лизоцим), g (гусиный), v (вирусный), i (лизоцим беспозвоночных) [80]. Наиболее изученным является лизоцим из куриных яиц, для которого в 1965 году была получена трехмерная структура с помощью рентгеноструктурного анализа [81].

Куриный яичный лизоцим – фермент с массой 14,3 кДа, состоящий из 129 аминокислотных остатков, который разрушает (лизирует) 1,4-β-гликозидную связь между NAM и NAG [82]. Лизоцим состоит из двух доменов, между которыми находится активный центр фермента, и включает в себя пять α-спиралей и пять β-складок с четырьмя внутримолекулярными дисульфидными мостиками (Рисунки 11 и 12) [83].

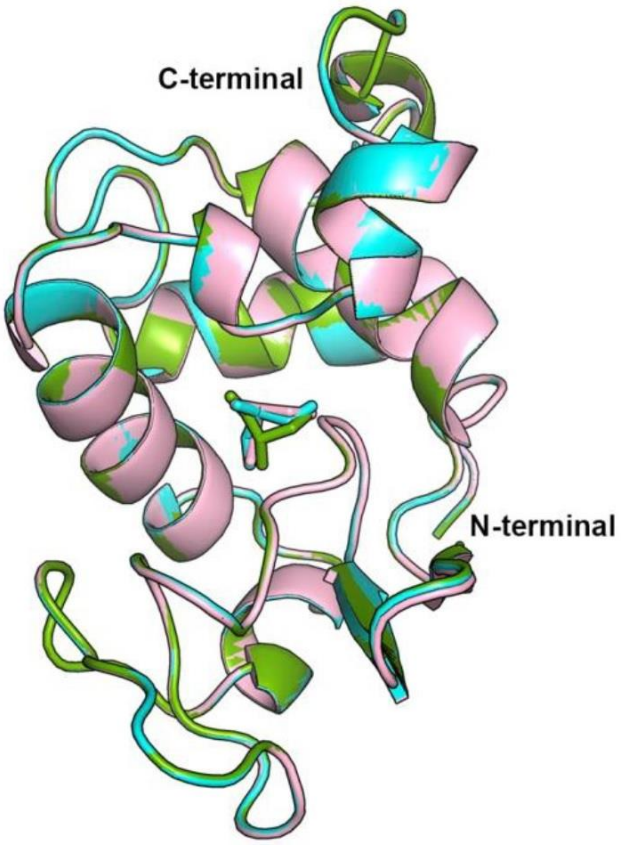

Рисунок 11 – Трехмерная структура куриного яичного лизоцима [84]

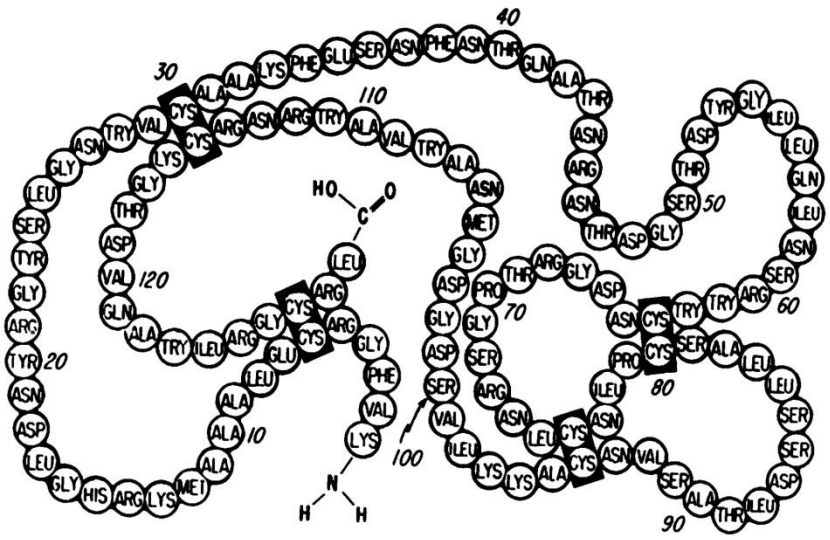

Рисунок 12 – Аминокислотная последовательность куриного яичного лизоцима. ◘ – дисульфидные мостики [85]

В активном центре лизоцима существует 6 подцентров связывания субстрата (A, B, C, D, E, F), NAG связывается с подцентрами A, C, E, а NAM – с подцентрами B, D, F, при этом NAM в подцентре D переходит из устойчивой конформации кресло в «искаженную» конформацию полукресло [86].

Существует два предположительных механизма дальнейшего действия лизоцима, описанных Филлипсом и Кошландом (Рисунок 13) [85; 87]. В 1953 году Кошланд предложил механизм разрыва 1,4-β-гликозидной связи, при котором кислород аспартата в положении 52 (Asp52) осуществляет нуклеофильную атаку гликозидного кислорода с образованием ковалентного интермедиата NAM-фермент [88]. Затем происходит разрушение интермедиата при нуклеофильной атаке кислорода воды, при этом глутамат в 35 положении (Glu35) стабилизирует промежуточные соединения [89]. Согласно механизму, предложенному Филлипсом, Glu35 протонирует гликозидный кислород, при этом происходит разрыв гликозидной связи между NAM и NAG с одновременным образованием оксокарбониевого катиона, который стабилизирован Asp52 путем электростатического взаимодействия [90]. На следующем этапе происходит нуклеофильная атака оксокарбониевого катиона кислородом воды с образованием N-ацетилмурамовой кислоты и исходных форм Glu35 и Asp52 [91].

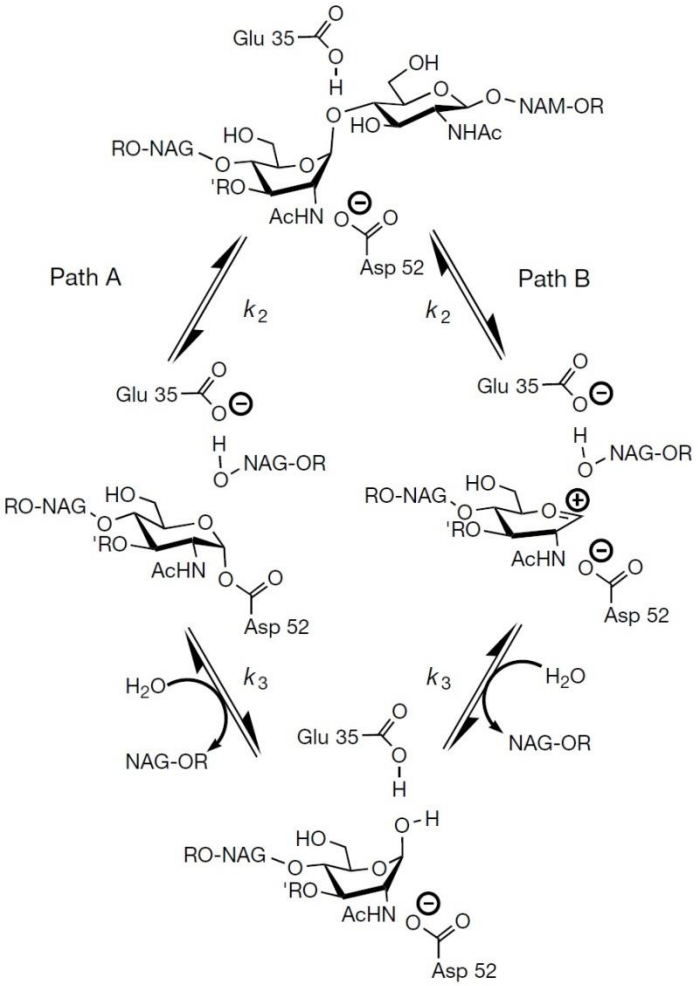

Рисунок 13 – Два возможных механизма действия куриного яичного лизоцима. Path A – механизм Кошланда, Path B – механизм Филлипса, R – цепь олигосахаридов, R′ – пептидный мостик [91]

Несмотря на долгую историю изучения лизоцима на данный момент в мире существуют противоречия о том, какой из предложенных механизмов действия лизоцима считать каноническим, опубликовано множество работ, подтверждающих как одну концепцию, так и другую [86; 89; 91].

В промышленности лизоцим используют в качестве антимикробного препарата [92; 93]. Благодаря сохранению высокой активности при больших температурах (до 60°C) и в широком диапазоне pH (pH 2 ÷ 10), лизоцим нашел обширное применение в пищевой промышленности [94]. Так лизоцим используют при приготовлении сыра, вина, пива и других продуктов питания [95; 96; 97]. В сфере медицины лизоцим применяют для лечения инфекционных заболеваний в

отоларингологии и офтальмологии [98; 99]. Более того *in vitro* показана эффективность действия лизоцима против ВИЧ (вирус иммунодефицита человека) [100].

Для пищевой промышленности лизоцим изготавливают под такими торговыми марками, как LYSOLAC®, LYSOVIN®, LYSOBEER®. Для лечения заболеваний полости рта в аптеках можно найти медицинские препараты, содержащие лизоцим, под следующими коммерческими названиями: Лизобакт®, Гексализ®, Leftose®, CP-LYSO 90®, LYNOZYNE®. Кроме того лизоцим применяют в качестве антимикробного агента в повязках для лечения инфицированных посттравматических и ожоговых ран (например, в повязках под торговым названием ПАМ-ТЛ®).

2.3. Интерлейкин-2 человека в роли цитокина

Интерлейкин-2 человека (IL-2) является одним из ключевых цитокинов человека, секретируемых Т-лимфоцитами (Т-клетками) и играющих важную роль при иммунном ответе [101].

Цитокинами называют небольшие сигнальные белки (чаще всего менее 80 кДа), которые регулируют различные функции организма (воспаление, иммунитет, коммуникация клеток, рост клеток, пролиферация (увеличение числа клеток) и дифференциация (разделение по функциям) клеток и другие) [102]. Цитокины можно классифицировать различными способами: по биологической активности, по роли в ответе на воспалительный процесс, по клеткам-продуцентам. Среди цитокинов принято различать лимфокины (цитокины из лимфоцитов), монокины (цитокины из моноцитов), хемокины и интерлейкины [103]. Однако такая классификация не позволяет различать цитокины по их функциям в организме, поэтому среди цитокинов чаще всего выделяют хемокины, интерфероны (IFN), интерлейкины (IL) и факторы некроза опухоли (TNF) [104]. Хемокины – это цитокины, способные к активации лимфоцитов и миграции данных лимфоцитов к местам воспаления в организме [103]. Интерфероны

представляют собой цитокины, активирующие лимфоциты, которые способны обнаруживать и разрушать вирусы и опухолевые клетки [104]. Интерлейкины – это цитокины, производимые лимфоцитами и регулирующие работу других лимфоцитов (интерлейкины производятся лимфоцитами и воздействуют на лимфоциты) [105]. Факторы некроза опухоли – это цитокины, способные по каскадному механизму к передаче сигнала о разрушении (апоптозе) опухолевым клеткам [105]. Цитокины продуцируются различными клетками иммунной системы: макрофагами, Т-лимфоцитами, В-лимфоцитами (В-клетками), тучными клетками (мастоцитами), эндотелиальными клетками, фибробластами [104; 105].

Цитокины могут воздействовать как на клетки, которыми они были секретированы (аутокринное действие), так и на ближайшие клетки (паракринное действие), а также на удаленные клетки (эндокринное действие) (на Рисунке 14 показана связь между клетками-продуцентами цитокинов и клетками-мишенями) [106].

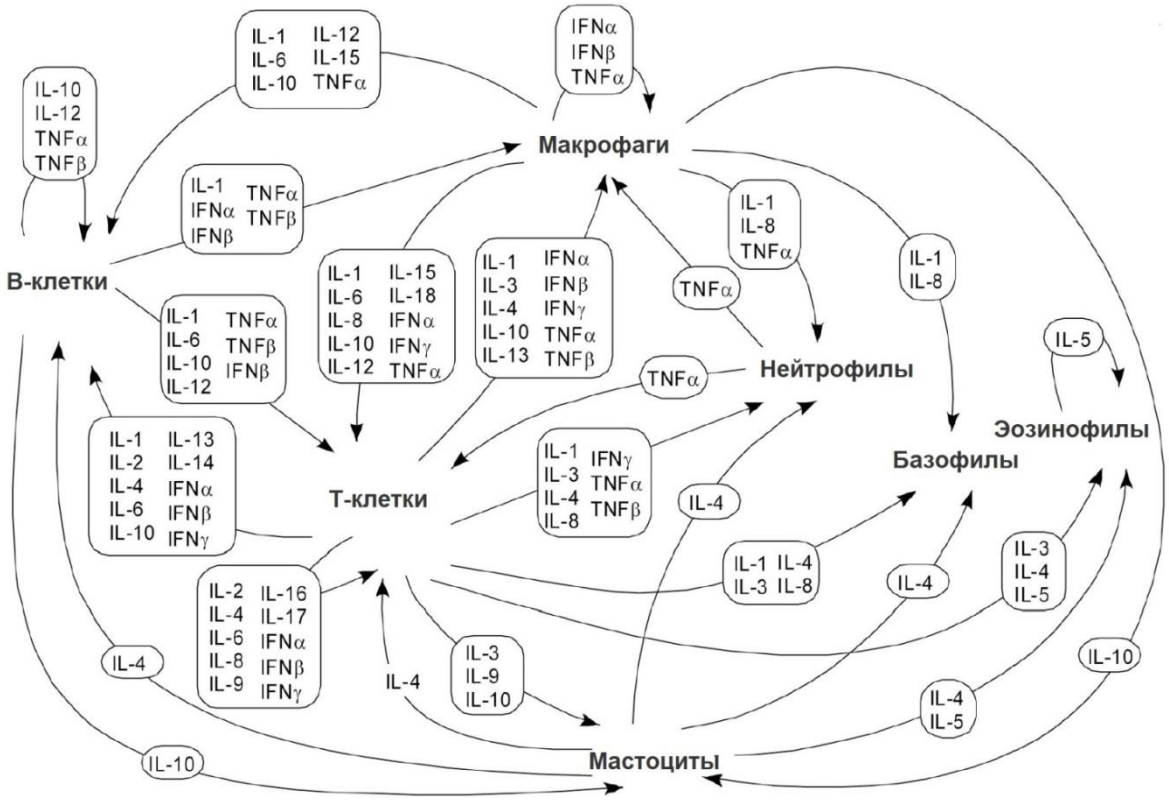

Рисунок 14 – Связь между клетками-продуцентами и клетками-мишенями различных цитокинов. IL – интерлейкины, IFNα, β, γ – интерфероны α, β, γ, TNFα, β – факторы некроза опухоли α, β [106]

Механизм образования цитокинов можно разделить на несколько этапов: на начальном этапе происходит внешнее воздействие на иммунную клетку (например, контакт с микробной клеткой, взаимодействие с реакционноспособными интермедиатами, воздействие радиации или ультрафиолетового света, взаимодействие с другими цитокинами), затем происходит экспрессия необходимого цитокина и выделение его во внеклеточное пространство, далее цитокин связывается с рецептором на клетке-мишени, после чего происходит передача соответствующего сигнала внутрь клетки-мишени и изменение функций клетки-мишени [105; 107].

Интерлейкин-2 человека был одним из первых обнаруженных цитокинов, так в 1976 году была впервые обнаружена способность супернатанта стимулированных лимфоцитов приводить к росту Т-лимфоцитов [108]. Более того в 1983 году была получена последовательность ДНК для IL-2, что привело к широкому использованию IL-2 в клинике и лаборатории [109].

Человеческий IL-2 синтезируется в организме как предшественник, состоящий из 153 аминокислотных остатков, причем 20 аминокислотных остатков (гидрофобная сигнальная последовательность) отщепляется после секреции IL-2 [110]. Активная форма белка состоит из 133 аминокислот и имеет массу 15,5 кДа (Рисунок 15) [111]. Белок содержит один сайт гликозилирования в положении 3

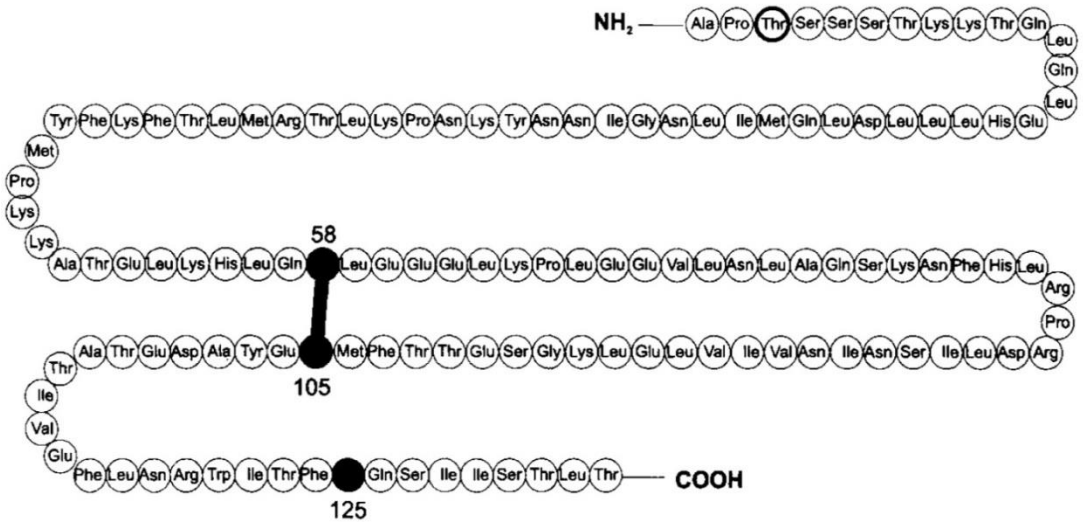

Рисунок 15 – Вторичная структура IL-2. ● – цистеин, ◘ - треонин в положении 3 [112]

(треонин), количество гликозидных остатков может варьироваться, что приводит к различиям в массе и заряде конечного белка [113]. Несмотря на данный факт, считается, что гликозилирование не является решающим фактором для проявления биологической активности, наличие гликозидных остатков необходимо для связывания антител с IL-2 [112].

Нативный IL-2 содержит 3 цистеина в положениях 58, 105, 125, цистеины в положениях 58 и 105 образуют дисульфидный мостик и играют важную роль в проявлении биологической активности [114]. Альтернативные варианты положения дисульфидного мостика в молекуле IL-2 приводят к радикальному уменьшению биологической активности, что в большой мере осложняет производство рекомбинантного IL-2 [115]. Третичная структура IL-2 представляет собой 4 α-спирали (A, B, C, D) и небольшой регион β-складок (Рисунок 16) [116; 117].

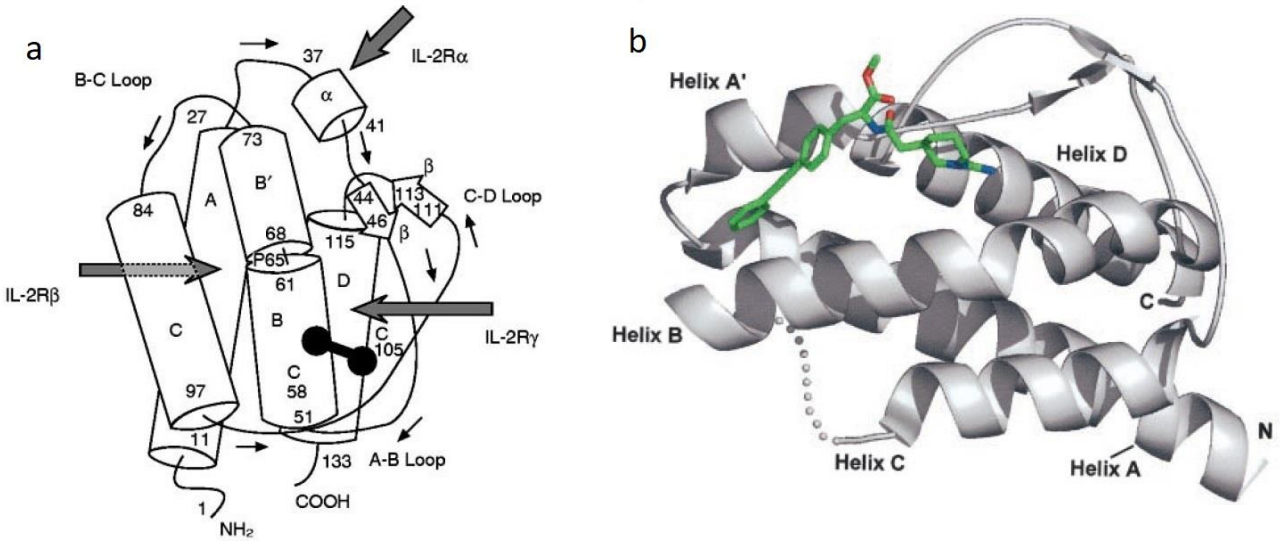

Рисунок 16 – Третичная структура IL-2. a – схематическое изображение, b – структура, определенная с помощью рентгеноструктурного анализа. A, B, C, D, α – α-спирали, β – β-складки, ● – дисульфидный мостик, IL-2Rα, IL-2Rβ, IL-2Rγ_c – регионы связывания с α, β, γ_c цепями рецептора IL-2 [116; 117]

IL-2 производится в основном Т-клетками, содержащими на поверхности кластер дифференциации 4 ($CD4^+$) (определенные антигены на поверхности клеток, которые показывают фенотип клеток), и в меньшей степени Т-клетками,

содержащими на поверхности кластер дифференциации 8 ($CD8^+$), естественными киллерами (NK), дендритными клетками (DC) и тучными клетками (мастоцитами) [118]. Т-клетки иммунной системы названы таким образом, поскольку они образуются в тимусе (вилочковой железе) [119]. Существует 2 вида Т-клеток: Т-хелперы и цитотоксические клетки (Т-киллеры) [119]. Т-хелперы экспрессируют на поверхность клеточной стенки молекулы (гликопротеины) $CD4^+$ (кластер дифференциации 4), которые участвуют в передаче сигнала другим клеткам, например, В-клеткам и макрофагам [120]. Цитотоксические клетки (Т-киллеры) аналогично образуют молекулы $CD8^+$ (кластер дифференциации 8), которые непосредственно обнаруживают и разрушают инфицированные клетки [121]. Естественные киллеры – это одна из разновидностей лимфоцитов, являющиеся частью врожденного иммунитета человека, которые играют важную роль в защите от вирусов и опухолей, обнаруживая и разрушая инфицированные клетки [122]. Дендритные клетки (DC) способны, связываясь с Т-клетками, инициировать и усиливать иммунный ответ [123]. Тучные клетки (мастоциты) расположены повсеместно в организме человека, мастоциты локально участвуют в иммунном ответе при инфекционных заражениях, также играют важную роль при аллергических реакциях [124].

IL-2 обладает как аутокринным (действует на клетки, которыми был секретирован данный IL-2), так и паракринным действием (действует на близкорасположенные клетки иммунной системы) (Рисунок 17) [116]. IL-2 является фактором роста и пролиферации (увеличение числа клеток) Т-хелперов 1 и 2 типа [110]. Связываясь с В-лимфоцитами (В-клетками), IL-2 активирует выработку иммуноглобулинов различных типов и тем самым участвует в иммунном ответе организма человека [125]. IL-2 стимулирует пролиферацию Т-киллеров и естественных киллеров, при этом усиливая их цитотоксическую активность [111; 126]. IL-2 активирует пролиферацию моноцитов и образование различных медиаторов (пероксида водорода, простагландинов, факторов некроза опухоли и других) [112; 127].

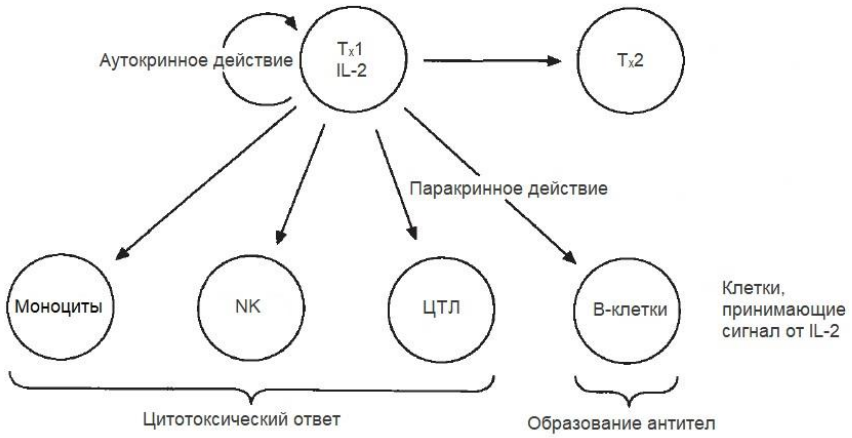

Рисунок 17 – Клетки-мишени действия IL-2. T_x1, T_x2 – Т-хелперы 1 и 2 типа, ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты (Т-киллеры), NK – естественные киллеры [116]

IL-2 передает сигнал клеткам-мишеням посредством связывания с рецептором IL-2 (IL-2R). IL-2R состоит из трех субъединиц α, β, γ_c, которые представляют собой мембранные белки массой 55, 75 и 64 кДа соответственно [128]. Субъединицы β и γ_c являются частями рецепторов и для других интерлейкинов (IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 и IL-21), а субъединица α отвечает за связывание исключительно с IL-2 [118]. Связывание IL-2 с α субъединицей вызывает конформационные изменения в структуре IL-2, которые способствуют взаимодействию IL-2 с β и γ_c субъединицами рецептора, при образовании комплекса IL-2 со всеми субъединицами рецептора происходит образование корректной формы IL-2R для передачи сигнала внутрь клетки (Рисунок 18) [129; 130]. При этом возможно образование трех отличающихся комплексов IL-2 с субъединицами IL-2R с различной аффинностью [131]. Наименьшей аффинностью обладает комплекс IL-2 с α субъединицей ($K_d \approx 10^{-8}$ М), причем такой комплекс не передает сигнал внутрь клетки. Среднюю аффинность проявляет комплекс IL-2 с α и β субъединицами ($K_d \approx 10^{-9}$ М), такой комплекс участвует в передаче сигнала клетке-мишени. Наибольшей аффинностью обладает комплекс IL-2 с тремя субъединицами ($K_d \approx 10^{-11}$ М) и аналогично проводит сигнал внутрь

клетки [126; 132]. Образование комплекса IL-2 с IL-2R приводит к включению различных сигнальных путей внутри клетки [125].

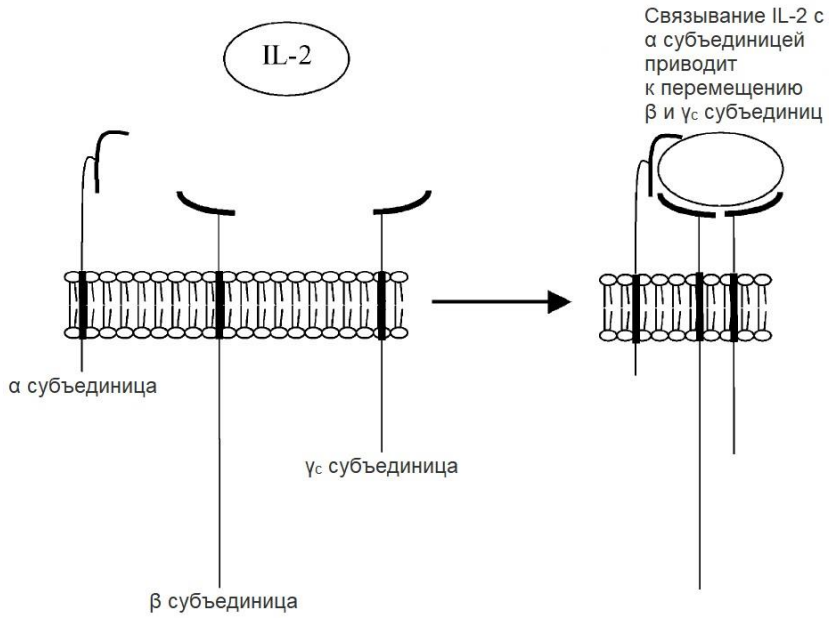

Рисунок 18 – Связывание IL-2 с субъединицами IL-2R [129]

В медицине IL-2 чаще всего применяют для лечения опухолей различного происхождения: карциномы (например, почек, мочевого пузыря, носоглотки, яичника), метастатической меланомы, лимфомы, рака желудочно-кишечного тракта, рака легких и других [133 – 139]. Помимо этого IL-2 применяют в качестве совместного препарата при лечении различных инфекционных заболеваний ВИЧ (вирус иммунодефицита человека), туберкулез, проказа [140 – 146]. Более того показана эффективность применения IL-2 при лечении сепсиса [147]. Наиболее распространенными лекарственными препаратами рекомбинантного IL-2 человека в России являются Ронколейкин® и Proleukin®.

2.4. Адсорбция бактериолитических факторов на поверхности бактериальных клеток

Взаимодействие фермента с клеткой является ключевым фактором процесса лизиса клеток. Под взаимодействием понимается адсорбция фермента на

поверхности клетки, которая показывает эффективность работы фермента. Существует два вида адсорбции: продуктивная и непродуктивная. Теоретичекси продуктивная сорбция ведет к ферментативной реакции, непродуктивная замедляет процесс лизиса клеток [148]. Изменяя условия проведения лизиса клеток (температура, pH, ионная сила раствора), можно оптимизировать процесс сорбции так, чтобы реакция гидролиза пептидогликана была наиболее предпочтительной [149].

Бактериолитические ферменты играют ключевую роль в защите от чужеродных бактерий. Бактерии в свою очередь развили механизмы борьбы с бактериолитическими ферментами. В последние годы было показано, что одним из механизмов такой устойчивости является сорбция бактериолитических ферментов на периплазматическом ингибиторе бактерий [150]. Например, недавно было обнаружено, что у грамотрицательных бактерий существуют периплазматические белковые комплексы-ингибиторы (Plil, PliC, PliG) против самого известного бактериолитического фермента – лизоцима (Plil – против лизоцима i-типа (лизоцим беспозвоночных), PliC – против лизоцима c-типа (куриного), PliG – против лизоцима g-типа (гусиного)) [151; 152]. Эти комплексы связываются как с активным центром фермента, так и с другими частями глобулы, препятствуя действию фермента на клеточную стенку [152; 153]. Таким образом у ряда бактерий непродуктивная сорбция бактериолитических факторов может осуществляться за счет взаимодействия с периплазматическими ингибиторами.

Несмотря на большой интерес к исследованию взаимодействий фермент-бактерия, изучение сорбции в основном ведется на моделях клеточной стенки, например, на препаратах клеточной стенки *E.coli*, пленках липополисахаридов, которые входят в состав клеточной стенки бактерий [154; 155; 156]. Однако недавно была предложена простая в исполнении методика изучения адсорбции лизоцима на интактных бактериальных клетках *E.coli* в условиях близких к физиологическим [149]. Эксперимент заключался в том, что клеточная суспензия *E.coli* инкубировалась с известным количеством лизоцима в течении 5 минут при

37°C, затем реакционная смесь центрифугировалась. Далее в надосадочной жидкости определялось количество не связавшегося лизоцима по калибровочной зависимости скорости лизиса бактериальных клеток *Micrococcus luteus* от концентрации лизоцима. Измерение количества не связавшегося лизоцима с помощью других методов определения концентрации белка невозможно ввиду того, что при разрушении клетки в реакционную смесь выделяется множество внутриклеточных белков. В итоге по разнице между добавленным количеством лизоцима и определенным в надосадочной жидкости вычисляли количество связавшегося с клеткой лизоцима. Полученные зависимости количества связанного лизоцима с бактерией от количества свободного лизоцима имели вид изотермы адсорбции Лэнгмюра. После аппроксимации зависимостей с помощью изотермы адсорбции Лэнгмюра, по уравнению Лэнгмюра можно определить константу десорбции лизоцима с поверхности бактерии и максимальное количество сорбируемого фермента.

2.5. Методы регистрации бактериолитической активности

Проявление бактериолитической активности заключается в разрушении клеточной стенки бактерий, что в конечном счете приводит к лизису (разрушению) бактериальной клетки. Для того чтобы измерить результат действия бактериолитического фактора и количественно определить его активность, необходимо подобрать подходящий метод регистрации лизиса (разрушения) клеток. Существуют различные методы регистрации бактериолитической активности от прямого подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ) до методов светорассеяния и определения концентрации специфических внутриклеточных компонентов.

Прямым способом измерения процесса лизиса клеток является метод подсчета КОЕ. Данный метод подразумевает высев аликвот клеточных суспензий на питательную среду после разных времен обработки бактерий с помощью бактериолитических факторов [157]. После соответствующей инкубации бактерий

на питательных средах производят подсчет количества КОЕ и по падению числа бактерий в инкубационной смеси во времени определяет скорость лизиса бактерий данным бактериолитическим фактором [158]. Этот метод является весьма трудоемким и продолжительным, время проведения эксперимента в основном определяется временем инкубации клеточных суспензий на питательных средах достаточных для подсчета КОЕ, которое чаще всего составляет более 24 часов. Кроме того метод подсчета КОЕ характеризуется большой погрешностью измерений [157; 158].

Другим подходом для определения доли лизированных клеток является обнаружение в реакционной смеси внутриклеточных компонентов бактерий. Так в ходе процесса разрушения бактерий в окружающую среду выходят различные компоненты клетки, по концентрации которых можно следить за ходом лизиса, так как в данном случае концентрация таких компонентов будет пропорциональная количеству разрушенных бактерий. Кроме того об активности бактериолитического фактора можно судить по количеству выделяемого в раствор общего белка, которое можно измерить классическими методами [159; 160; 161]. Также представляется возможным измерять специфические белки цитоплазмы клетки (маркеры) с помощью антител или радиоактивных меток [162]. Однако метод определения бактериолитической активности посредством измерения внутриклеточных компонентов обладает некоторыми ограничениями. При проведении эксперимента необходимо помнить о том, что компоненты цитоплазмы могут выделяться в окружающую среду при частичном разрушении клеточной стенки, соответственно сигнал в таком случае будет положительным (маркер обнаружен в растворе), а клетка не будет разрушена. Более того бактерии могут секретировать некоторые белки при резких изменениях условий окружающей среды. Соответственно для определения бактериолитической активности с помощью такого метода необходимо выбирать только такие внутриклеточные компоненты, которые не выделяются в окружающую среду без разрушения клетки. Например, ГАФД (глиферальдегид-3-фосфатдегидрогеназа) – фермент бактерии, который выделяется в окружающую среду только при полном

разрушении клетки. Поэтому ГАФД является удобным белком для измерения бактериолитической активности на спектрофотометре при длине волны 340 (максимум поглощения NADH) [163]. Также можно использовать количественный метод ПЦР (полимеразная цепная реакция – микробиологический метод увеличения концентрации фрагментов ДНК с помощью фермента ДНК-полимеразы) для определения степени лизиса бактерий [164]. В ходе лизиса бактерий в окружающую среду попадает ДНК бактерии, метод ПЦР позволяет увеличить концентрацию ДНК бактерии в пробе, по увеличению концентрации ДНК бактерии в реакционной смеси во времени можно судить о скорости лизиса бактерий. Однако такие методы весьма трудоемки и нуждаются в дорогостоящих реактивах и оборудовании.

Среди разных способов регистрации лизиса бактерий турбидиметрический метод является наиболее простым в исполнении. Турбидиметрия подразумевает измерение мутности препарата во времени, соответственно при действии бактериолитических факторов суспензия бактерий просветляется вследствие их разрушения и по изменению оптической плотности во времени можно судить о скорости лизиса бактерий [165 – 169]. Несмотря на всю элегантность и экспрессность, метод турбидиметрии имеет некоторые методические трудности, а именно мутность суспензии зависит от размера и формы частиц, данные параметры у бактерий могут меняться по причинам не связанным с разрушением клетки [170]. Отдельной сложной задачей турбидиметрии является интерпретация падения оптического поглощения во времени. Так одинаковое оптическое поглощение суспензий двух различных видов бактерий при пересеве на питательную среду вероятнее всего даст различные значения КОЕ (так как мутность суспензии зависит от размера и формы бактерий). Только недавно был разработан метод, позволяющий корректно сравнить эффективность действия одного бактериолитического фактора относительно различных видов бактерий, который будет описан в следующем разделе [171].

При использовании любого из методов измерения лизиса бактерий необходимо помнить о составе раствора, в котором находится суспензия

бактерий, в физиологических условиях могут образовываться протопласты (клеточная стенка таких бактерий разрушена, но при этом целостность клетки сохранена), соответственно, в таком случае аналитический сигнал не будет меняться [171; 172]. Для такого описанного случая в методе турбидиметрии оптическая плотность раствора может оставаться неизменной, метод подсчета КОЕ также покажет отсутствие лизиса, аналогичная ситуация будет и при использовании других методов измерения лизиса бактерий.

2.6. Турбидиметрия

Турбидиметрия – количественный метод измерения светорассеяния на частицах в растворе и определения числа частиц в растворе [173].

История данного метода началась с разработки Густавом Ми в 1908 году теории рассеяния света сферической частицей [174]. Рассеяние света зависит от формы, размера частиц и длины волны [175]. Если сопоставить теорию Ми и закон Бугера-Ламберта-Бера, то можно получить зависимость падения интенсивности светового потока с определенной длиной волны (видимый диапазон), проходящего через раствор, от количества частиц определенной формы в данном растворе (мутность среды):

$$I = I_0 \times e^{-\tau l} \quad (1)$$

где l – длина оптического пути, I_0 и I – длина волны падающего и прошедшего света, τ – мутность среды [176]. Иными словами турбидиметрия – метод измерения мутности суспензии при определенной длине волны [177]. В настоящее время турбидиметрия используется для качественного и количественного описания различных физических, химических и биологических процессов [178 – 181].

В микробиологии и биохимии турбидиметрия широко применяется в качестве экспрессного метода оценки приблизительного количества клеток в растворе или изучения лизиса бактерий [165]. Однако только в последние годы были проведены исследования, в которых была подтверждена возможность

использования метода турбидиметрии для корректного количественного описания процесса разрушения (лизиса) бактериальных клеток [171; 172].

Процесс лизиса (разрушения) клетки под действием бактериолитического фактора можно разделить на два этапа: на первом этапе происходит разрушение пептидогликана бактерий, на следующем этапе вследствие осмотического шока происходит разрыв клетки с высвобождением компонентов цитоплазмы (Рисунок 19). При этом турбидиметрия описывает только второй этап (осмотическое разрушение), так как только на этом этапе происходит изменение оптического поглощения бактериальной суспензии. Соответственно для изучения лизиса бактерий необходимо подбирать условия эксперимента так, чтобы осмотическая деструкция клетки происходила как можно быстрее, а действие бактериолитического фактора стало бы скорость лимитирующей стадией. Более того измерения следует проводить в видимом спектре длин волн для того, чтобы компоненты клетки не вносили искажения в аналитический сигнал.

Рисунок 19 – Механизм действия бактериолитического фактора лизоцима на бактериальные клетки [171]

При действии бактериолитического фактора на клетки происходит уменьшение оптического поглощения суспензии во времени до некоторого предельного уровня оптического поглощения, который характерен для обломков клеточных стенок бактерий (клеточная стенка разрушена полностью, но остались некоторые фрагменты, которые обладают ненулевым оптическим поглощением) (Рисунок 20).

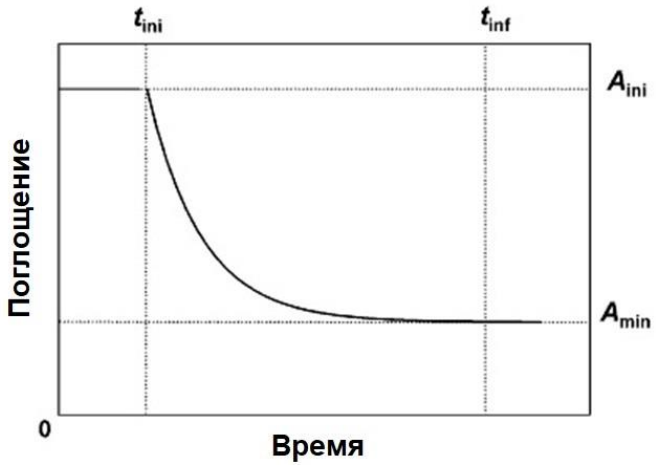

Рисунок 20 – Схематический вид зависимости оптической плотности суспензии бактерий от времени при действии бактериолитического фактора [171]

Для того чтобы подтвердить возможность использования метода турбидиметрии для корректного описания процесса лизиса необходимо соотнести методы турбидиметрии и подсчета КОЕ. Для этого можно ввести безразмерный параметр – степень лизиса (Ѳ). Степень лизиса – это отношение количества лизированных (разрушенных) бактерий к общему количеству бактерий в клеточной суспензии (Ѳ=0 в случае, когда все бактериальные клетки целы, и Ѳ=1 в случае, когда все бактериальные клетки разрушены). Предполагая существование бактерии в двух состояниях (бактерия целая и бактерия разрушенная), отличающихся значением оптического поглощения, можно считать справедливым следующее выражение для расчета степени лизиса по данным, полученным с помощью метода турбидиметрии:

$$\theta(t) = \frac{A_{ini} - A_t}{A_{ini} - A_{min}}, \quad (2)$$

где A_{ini} – начальная оптическая плотность суспензии, A_t – оптическая плотность суспензии в момент времени t от начала лизиса, A_{min} – оптическая плотность после разрушения всех клеток суспензии. Тогда начальная скорость лизиса будет являться функцией от изменения степени лизиса во времени:

$$V = \frac{d\theta(t)}{dt} = \frac{-1}{A_{ini} - A_{min}} \times \frac{dA}{dt}. \quad (3)$$

Аналогично можно представить выражения для степени лизиса, измеренного методом подсчета КОЕ:

$$[\text{КОЕ}] = [\text{КОЕ}]_0 \times (1 - \theta), \quad (4)$$

где [КОЕ] – доля нелизированных бактерий, $[\text{КОЕ}]_0$ – количество КОЕ в исходной суспензии бактерий. И выражение для скорости лизиса через изменение количества бактерий:

$$V = \frac{d[\text{КОЕ}]}{dt} = -[\text{КОЕ}]_0 \times \frac{d\theta(t)}{dt}. \quad (5)$$

Совмещая выражения (3) и (5) можно получить реальную начальную скорость лизиса, зависящую как от поглощения суспензии, так и от вида клеток:

$$V = \frac{-[\text{КОЕ}]_0}{A_{ini} - A_{min}} \times \frac{dA}{dt}. \quad (6)$$

При проведении эксперимента по определению начальной скорости лизиса бактерий необходимо помнить о том, что зависимость оптического поглощения суспензии бактериальных клеток от количества КОЕ не линейна при оптическом поглощении большем 0,8 оптических единиц (Рисунок 21) [171; 182]. Поэтому для получения корректных данных необходимо проводить эксперимент в таких условиях, чтобы начальное поглощение суспензии находилось в линейном диапазоне зависимости оптического поглощения суспензии бактериальных клеток от количества КОЕ (при оптическом поглощении суспензии меньшем 0,8 оптических единиц).

Корректность использования метода турбидиметрии была подтверждена с помощью метода подсчета КОЕ при изучении действия куриного яичного лизоцима на бактерии *Escherichia coli* [171].

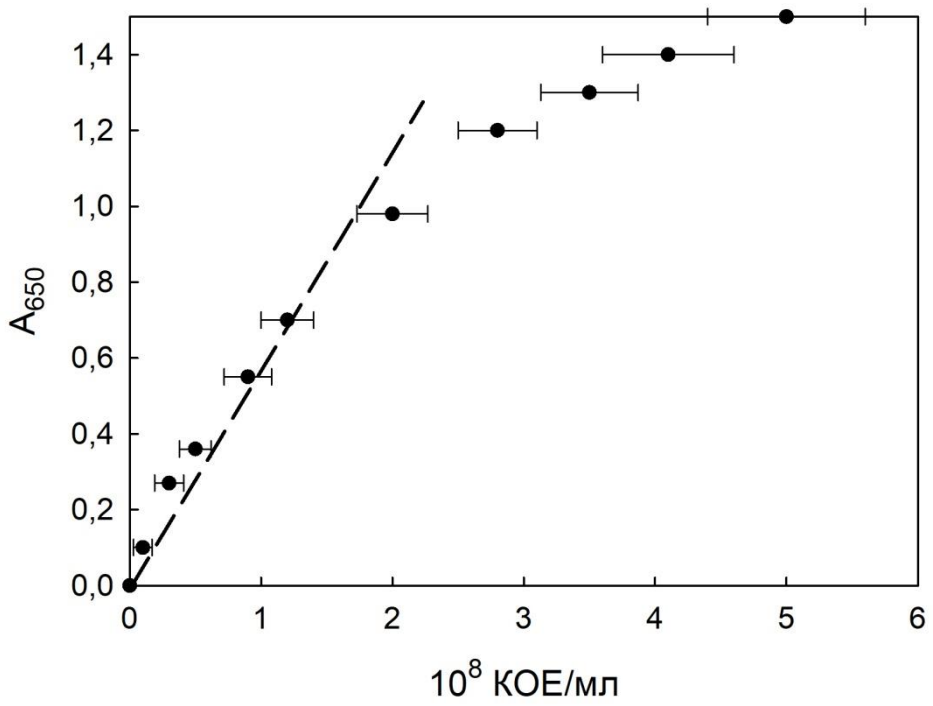

Рисунок 21 – Зависимость оптической поглощения суспензии бактериальных клеток *Lactobacillus plantarum* от количества КОЕ [182]

2.7. Бактерии, исследуемые в работе

В работе было исследовано действие бактериолитических факторов на обширный спектр бактерий как патогенных, так и непатогенных для человека, с которыми человек может столкнуться в течение жизни. Некоторые из описанных ниже видов бактерий широко используются в молекулярной биологии и биохимии, другие нашли применение в пищевой промышленности.

Семейство Alcaligenaceae

Род *Alcaligenes*

Alcaligenes spp – грамотрицательные, палочковидные, аэробные бактерии с размерами 0,5-1,2×1-3 мкм [183]. Самым известным представителем *Alcaligenes*

spp является *A.faecalis* [183]. *Alcaligenes* spp могут быть обнаружены в воде, почве, желудочно-кишечном тракте и верхних дыхательных путях человека и животных, в ранах [184]. *Alcaligenes* spp широко используют в пищевой промышленности для производства различных аминокислот [185]. Некоторые виды *Alcaligenes* могут быть патогенными для человека и вызывать инфекции: перитонит, пневмония, менингит, бактериемия, остеомиелит, эндокардит и другие [186; 187].

Семейство Bacillaceae

Род *Bacillus*

Bacillus spp – грамположительные, спорообразующие сапрофиты (микроорганизмы, обитающие на омертвевших тканях или растениях) в виде палочек с размерами индивидуальных бактерий 0,5-2,5×1,2-10,0 мкм, по отношению к кислороду бывают как аэробные, так и факультативно анаэробные [188]. Род *Bacillus* включает в себя более 30 видов, среди них выделяют две группы, внутри каждой из групп находятся виды со схожими последовательностями ДНК [189]. К первой группе *Bacillus cereus* относят *B.cereus, B.anthracis, B.thuringiensis, B.weihenstephanensis, B.mycoides,* ко второй группе *Bacillus subtilis* относят *B.subtilis, B.amyloliquefaciens, B.licheniformis, B.pumilus* [190]. *Bacillus* spp – вездесущие микроорганизмы; обитают повсеместно в почве, воде, на растениях, являются симбионтами человека и животных [191]. Благодаря своей способности образовывать споры и возможности оставаться жизнеспособными при низких значениях pH, данный род бактерий применяется в качестве пробиотиков (продукты питания с культурами живых микроорганизмов, которые улучшают микрофлору кишечника) [192; 193]. *Bacillus* spp производят различные вещества с антимикробными свойствами, что находит широкое применение в медицине и сельском хозяйстве [194; 195; 196]. Так *Bacillus* spp синтезируют: циклические липопептидные антибиотики (состоят из семи

аминокислотных остатков и β-амино жирной кислоты, содержащей от четырнадцати до семнадцати атомов углерода) (например, итурин, эсперин), которые имеют высокую активность против дрожжей и грибов, образуя поры в цитоплазматической мембране клеток; и пептидные антибиотики (например, субтилин, эрицин), в состав которых может входить от двадцати до сорока аминокислотных остатков, способные встраиваться и образовывать поры в клеточной мембране, такие антибиотики обладают высокой бактерицидной активностью относительно различных грамположительных бактерий [194]. *Bacillus* spp также способны производить и выделять в окружающую среду различные поверхностно-активные вещества, которые помогают создавать биопленки, что применяется в биотехнологии [196; 197]. Несмотря на то, что большинство *Bacillus* spp не представляют опасности для человека, некоторые виды являются серьезными патогенами, например *B.cereus* и *B.anthracis* [190; 198]. Так бактерии *B.anthracis* являются причиной сибирской язвы, широко распространенного заболевания в странах Африки и Азии [191]. А *B.cereus* помимо заболеваний желудочно-кишечного тракта вызывают эндофтальмит (гнойное воспаление глаз), при этом *B.cereus* считается самым агрессивным возбудителем данного заболевания [188; 191]. Помимо этого высокая устойчивость спор *Bacillus* spp к воздействию высоких температур, ионизационного облучения и дезинфицирующих веществ увеличивает вероятность заболеваний желудочно-кишечного тракта и сепсиса [198].

Семейство Bifidobacteriaceae

Род *Bifidobacterium*

Bifidobacterium spp – грамположительные, палочковидные (могут быть разветвленными), анаэробные бактерии с средним размером 0,5-1,0×2,0-5,0 мкм [199]. Семейство Bifidobacteriaceae насчитывает более 50 видов бактерий, большинство из которых являются частью микрофлоры желудочно-кишечного

тракта человека и животных [200]. *Bifidobacterium* spp получили широкое применение в пищевой промышленности [201]. Бифидобактерии на ряду с лактобактериями используют для изготовления различных ферментированных продуктов питания, например, при изготовлении кисло-молочных продуктов питания [202]. Более того данный род бактерий используется в качестве пробиотиков при лечении диареи различной этиологии, колитов, пищевых аллергий [203; 204]. Помимо этого *Bifidobacterium* spp производят бактериоцины (вещества белковой природы, токсичные для филогенетически близких видов бактерий), которые способны подавлять рост патогенных бактерий, что также используется в пищевой промышленности [205].

Семейство Clostridiaceae

Род *Clostridium*

Clostridium spp – грамположительные, палочковидные, анаэробные, спорообразующие бактерии, размер которых сильно зависит от стадии роста 0,5-2,0×2-20 мкм [206]. *Clostridium* spp насчитывают более 200 видов, из которых только менее 20 видов считаются патогенными для человека [207]. Заражение патогенными *Clostridium* spp может привести не только к инфекциям желудочно-кишечного тракта, но также и к газовой гангрене, ботулизму, некротическому фасцииту, бактериемии и другим [207 – 210]. *Clostridium* spp производят яды – нейротоксины (вещества белковой природы), которые способны поражать нервные клетки центральной нервной системы зараженного человека. Одним из самых опасных нейротоксинов на данный момент является ботулин, который выделяется бактериями *C.botulinum* и приводит к заболеванию ботулизм [211]. Ботулин представляет собой эндопептидазу, которая связывается с мембраной нервных клеток и ингибирует высвобождение ацетилхолина (нейротрансмиттер, осуществляет передачу сигнала от нервных клеток к другим видам клеток организма), тем самым приводя к параличу и остановке дыхания [212]. На ряду с

ботулином одним из самых опасных нейротоксинов является, производимый *C.tetani*, нейротоксин столбняка (вызывает столбняк), который ингибирует высвобождение нейротрансмиттера (вещество, которое осуществляет передачу сигнала от нервных клеток к другим видам клеток организма) глицина, что приводит к периодическим спазмам мышц зараженного человека [211; 212]. Нейротоксины *C.perfringens*, приводящие некрозу мышечных тканей, вызывают газовую гангрену. При жизнедеятельности в пораженном организме *C.perfringens* выделяют смесь различных газов (кислород, азот, водород), именно поэтому заболевание называется газовой гангреной [213]. Среди *Clostridium* spp *C.difficile* является одним из самых распространенных микроорганизмов вызывающих диарею, так по некоторым данным в Европе и США от такого заболевания погибают от 15000 до 30000 человек ежегодно [214]. *Clostridium* spp встречается повсеместно в почве, желудочно-кишечном тракте животных, женской половой системе, ранах кожных покровов [215]. Ввиду высокой устойчивости спор *Clostridium* spp к действию высоких температур, облучения и антибиотиков увеличивается вероятность заражения продуктов питания спорами данных бактерий, наиболее часто встречаются случаи заражения молочных продуктов и мяса спорами *Clostridium* spp [215; 216].

Семейство Corynebacteriaceae

Род *Corynebacterium*

Corynebacterium spp – грамположительные, аэробные бактерии с средним размером 0,5-1,0×2,0-6,0 мкм, имеющие булавовидную форму [217]. Род Corynebacteriaceae насчитывает 88 видов, при этом больше половины считается непатогенными для человека. Самым известным представителем рода является *C.diphtheriae*, которая вызывает дифтерию [218; 219]. *Corynebacterium* spp – бактерии симбиотической флоры верхних дыхательных путей, кожных покровов человека, а также обнаруживаются в окружающей среде [220]. Дифтерия – самая

известная инфекция, вызываемая *Corynebacterium* spp, однако различные виды этого рода бактерий могут вызывать эндокардит, бактериемию, остеомиелит, менингит, инфекции кожных покровов и мочеполовой системы [220 – 223].

Семейство Enterobacteriaceae

Enterobacteriaceae – обширное семейство грамотрицательных, факультативно анаэробных бактерий [224; 225]. Некоторые виды из семейства энтеробактерий являются частью симбиотической микрофлоры человека и животных, другие обитают в воде и почве, паразитируют на некоторых растениях [226; 227; 228]. При этом в семейство энтеробактерий входят различные патогены: сальмонеллы, шигеллы, клебсиеллы, отдельные штаммы кишечной палочки (*Escherichia coli*), чумная палочка (*Yersinia pestis*) и другие.

Род *Citrobacter*

Citrobacter spp – факультативно анаэробные палочковидные бактерии размером 1,0-1,5×2-6 мкм [229]. Род *Citrobacter* был впервые описан в 1932 году Веркманом и Гилленом, которые обнаружили *C.freundii* в почве [230]. Данный род бактерий насчитывает 11 видов: *C.freundii, C.koseri, C.amalonaticus, C.youngae, C.farmeri, C.braakii, C.werkmanii, C.sedlakii, C.gillenii, C.murliniae, C.rodentium* [231; 232]. *Citrobacter* spp обнаруживаются в почве и воде, а также являются частью флоры желудочно-кишечного тракта животных и человека [232]. Несмотря на низкую вирулентность данного рода бактерий, человек в состоянии иммунодефицита может быть инфицирован *Citrobacter* spp. Инфекции, вызванные *Citrobacter* spp, включают в себя: инфекции мочевых путей, абсцесс, менингит, бактериемия, эндокардит и другие [231; 233; 234; 235]. Лечение данных заболеваний, вызванных *Citrobacter* spp, осложняется высокой устойчивостью этого рода бактерий к действию различных антибиотиков, например

цефалоспоринов (β-лактамные антибиотики, основным структурным элементом которых является 7-аминоцефалоспориновая кислота) [230; 236].

Род *Enterobacter r*

Enterobacter spp – факультативно анаэробные палочковидные бактерии размером 0,6-1,0×1,2-3,0 мкм, подвержены образованию капсул (дополнительная внешняя оболочка, чаще всего состоящая из полисахаридов и гликопротеинов) [230]. В *Enterobacter* spp включены 13 видов бактерий: *E.aerogenes, E.agglomerans, E.absuriare, E.taylorae, E.cloacae, E.dissolvens, E.gergoviae, E.bomaecbei, E.intermedius, E.kobei, E.nimipressuralis, E.pyrinus* [237]. *Enterobacter* spp являются частью микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека и животных; населяют воду, почву, растения и продукты питания [238]. Род *Enterobacter* признается потенциально патогенным и представляет опасность в основном для новорожденных и взрослых в состоянии иммунодефицита, также возможно заражение через открытые раны. Наиболее часто встречаются случаи заражения *E.aerogenes* и *E.cloacae*, которые могут вызывать различные заболевания: сепсис, менингит, пневмония, эндокардит и другие [237; 239]. В настоящее время все чаще говорится об увеличении резистентности данного рода к действию различных антибиотиков, так род *Enterobacter* принадлежит к группе бактерий устойчивых к действию антибиотиков ESKAPE (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumanii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter* spp), по данным Всемирной Организации Здравоохранения [238].

Род *Escherichia*

Escherichia spp – факультативно анаэробные палочковидные бактерии размером 1,1-1,5×2-6 мкм [240]. Род эшерихий включает в себя 5 видов *E.albetii, E.coli, E.fergusonii, E.hermanii* и *E.vulneris* и назван в честь Теодора Эшериха,

который в 1885 году описал *E.coli* [241]. В настоящее время самой известной бактерией рода эшерихий является *E.coli*, которая служит модельным микроорганизмом в микробиологии и широко применяется в биотехнологии [242]. Непатогенные штаммы *E.coli* являются частью микрофлоры кишечника человека и теплокровных животных. Патогенные штаммы данных бактерий вызывают инфекции пищеварительного тракта, инфекции мочевых путей, инфекции нервной системы (менингит) и заражение крови (сепсис) [241; 243]. *E.coli* таксономически близка к таким патогенным бактериям, как *Shigella* spp и *Salmonella* spp [240; 242].

Род *Klebsiella*

Klebsiella spp – факультативно анаэробные палочковидные бактерии размером 0,5-0,8×1-2 мкм, могут инкапсулироваться (покрываться дополнительной внешней оболочкой, чаще всего состоящей из полисахаридов и гликопротеинов) [244]. Данный род бактерий включает в себя 5 видов *Klebsiella* (*K.pneumoniae, K.oxytoca, K.granulomatis, K.variicola, K.singaporensis*) и 3 вида *Raoultella* (*R.terrigena, R.ornitinolytica, R.planticola*) [244]. *Klebsiella* spp обитают в почве, воде, растениях; у человека являются частью флоры желудочно-кишечного тракта, ротовой полости и кожных покровов [245; 246]. Наибольшую опасность для человека по количеству заболеваний и их тяжести представляют виды *K.pneumoniae* (возбудитель пневмонии) и *K.oxytoca*. Данные бактерии могут вызывать пневмонию, сепсис, абсцесс, инфекции мочевых путей и брюшной полости [247; 248; 249]. Кроме того *K.pneumoniae* входит в состав группы бактерий ESKAPE (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumanii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter* spp), обладающих высокой резистентностью к антибиотикам [249].

Род *Morganella*

Morganella spp – факультативно анаэробные палочковидные бактерии размером 0,6-0,7×1,0-1,7 мкм [250]. *M.morganii* – единственный вид в роде *Morganella* [251]. *M.morganii* обнаруживается повсеместно в окружающей среде, в желудочно-кишечном тракте человека и животных [252]. В 1939 году впервые был описан случай инфекции мочеполовой системы, вызванной *M.morganii*, также данный вид бактерий способен вызывать абсцессы, бактеримии, менингит и другие [252; 253]. Заболеванию чаще всего подвергаются послеоперационные раны и мочеполовая система человека [250].

Род *Proteus*

Proteus spp – подвижные факультативно анаэробные палочковидные бактерии размером 0,4-0,8×1-3 мкм [254]. Данный род насчитывает 5 видов: *P.mirabilis, P.vulgaris, P.penneri, P.hauseri, P.myxofaciens* [251; 255]. *Proteus* spp являются частью микрофлоры человека и животных, населяют желудочно-кишечный тракт, кожные покровы и ротовую полость, также обитают в окружающей среде (почва, вода) [254]. Наиболее опасными для человека признаны виды *P.mirabilis* и *P.vulgaris*, они могут вызывать инфекции мочеполовой системы, заражение ран, пневмонию и другие заболевания [255; 256; 257]. Так заражение *P.mirabilis* может привести к воспалению мочевого пузыря (циститу) и почек (пиелонефриту) [258].

Род *Serratia*

Serratia spp – подвижные факультативно анаэробные палочковидные бактерии размером 0,5-0,8×0,9-2,0 мкм [259]. Самый известный из 15, существующих в роду, вид *Serratia marcescens* впервые был обнаружен в 1823 году венецианским фармацевтом Бицио, который описал красный микроорганизм,

растущий на ячмене [260]. Данный микроорганизм распространен повсеместно в окружающей среде, не является частью микрофлоры человека, поэтому все возникающие инфекции связывают с внешними загрязнениями продуктов питания, медикаментов, медицинского оборудования [261]. Наиболее распространенные заболевания, вызванные *S.marcescens*: менингит, сепсис, лимфаденит, остеомиелит, респираторные и другие инфекции [259; 261; 262].

Семейство Enterococcaceae

Род Enterococcus

Enterococcus spp – грамположительные, факультативно анаэробные, сферические бактерии с средним размером 0,6-2,0 мкм [263]. Самыми известными из 36 видов данного рода являются *E.faecalis* и *E.faecium* [264]. *Enterococcus* spp населяют почву, растения, являются частью симбиотической микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека и животных [265]. *Enterococcus* spp относятся к бактериям, выделяющим молочную кислоту, именно поэтому они часто используются в молочной промышленности для придания продуктам специфического запаха и вкуса, более того *Enterococcus* spp могут применятся в качестве пробиотиков [264]. Несмотря на низкую вирулентность данного рода, существует вероятность заболеваний мочеполовой системы, эндокардита, бактериемии и других заболеваний у пациентов со сниженным иммунитетом или после долговременной терапии антибиотиками [264; 265; 266]. Кроме того *E.faecium* включен в группу бактерий ESKAPE (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumanii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter* spp), которые по данным Всемирной Организации Здравоохранения обладают наибольшей резистентностью к антибиотикам [267].

Семейство Lactobacillaceae

Род *Lactobacillus*

Lactobacillus spp – грамположительные, палочковидные, факультативно анаэробные бактерии, средний размер 0,5-1,2×1-10 мкм [268; 269]. Данный род весьма обширен и насчитывает более 120 видов [268]. *Lactobacillus* spp обитают в молочных продуктах, на поверхности фруктов и овощей; в организме человека находятся в кишечнике, во влагалище, на кожных покровах [270]. Наиболее широкое применение *Lactobacillus* spp нашли в пищевой промышленности. Различные виды этих бактерий принимают участие в процессах ферментации молочных продуктов, консервации овощей, приготовлении закваски в хлебопечении [269; 271]. Одним из перспективных направлений использования *Lactobacillus* spp является применение в качестве пробиотиков. Было показано, что применение *Lactobacillus* spp в качестве пробиотиков снижает риск воспалительных заболеваний кишечника, диареи [203; 272]. Также *Lactobacillus* spp можно использовать как антибактериальный препарат для лечения инфекций кишечного тракта и мочеполовой системы [272; 273]. Главным антибактериальным свойством данного рода бактерий является их способность к созданию микросреды непригодной для патогенных микроорганизмов. Под изменением микросреды подразумевается выделение молочной кислоты и изменение pH окружающей среды, выделение пероксида водорода и других сопутствующих продуктов метаболизма, которые ингибируют рост других бактерий [274; 275]. Также *Lactobacillus* spp синтезируют небольшие пептиды (бактериоцины), которые выполняют защитную функцию против чужеродных клеток в качестве антибактериального средства [276]. Несмотря на пользу приносящую организму человека, в некоторых случаях (чаще всего при попадании в кровоток) *Lactobacillus* spp могут выступать в качестве патогенных [277]. Наиболее распространенные заболевания, вызываемые *Lactobacillus* spp: эндокардит, бактериемия, абсцессы и другие [270; 274; 278].

Семейство Micrococcaceae

Род *Micrococcus*

Micrococcus spp – грамположительные, аэробные, сферические бактерии с средним размером 0,5-2,0 мкм [279]. В данный род входят 9 видов бактерий: *M.agalis, M.halobius, M.kristinae, M.luteus, M.lylae, M.nishinomiyansis, M.roseus, M.sedentarius, M.varians* [280]. *Micrococcus* spp можно обнаружить повсеместно в продуктах питания, воде, почве; для человека являются частью микрофлоры кожных покровов и слизистых оболочек [280]. Несмотря на то, что *Micrococcus* spp считаются непатогенными для человека, данный род может участвовать в таких инфекционных заболеваниях, как пневмония, менингит, артрит, бактериемия, эндокардит и другие [281; 282].

Род *Rothia*

Rothia spp – грамположительные, аэробные, сферические бактерии с средним размером 0,5-1,0 мкм [283]. Род *Rothia* насчитывает 6 видов бактерий: *R.aeria, R.amarac, R.dentocariosa, R.mucilaginosa, R.nasimurium, R.terrae* [283]. Все виды населяют ротовую полость и верхние дыхательные пути человека [284]. *Rothia* spp считаются непатогенными для человека, при этом в некоторых случаях могут вызывать периодонтальные заболевания. Однако существуют публикации, в которых описаны случаи заболевания эндокардитом, остеомиелитом, пневмонией, бронхитом, перитонитом и другими [284; 285; 286].

Семейство Moraxellaceae

Род *Acinetobacter*

Acinetobacter spp – грамотрицательные, палочковидные, аэробные бактерии с средним размером 1,0-1,5×1,5-2,5 мкм [287; 288]. *Acinetobacter* spp насчитывает более 40 видов бактерий, наиболее известным является вид *A.baumanii* [288; 289]. Данный род считается вездесущим, однако *Acinetobacter* spp встречаются чаще всего в больницах на поверхностях и внутри медицинских изделий, также являются симбионтами на кожных покровах человека [290; 291]. *A.baumanii* относится к одному из шести видов бактерий ESKAPE (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumanii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter* spp) и стоит на третьем месте по количеству летальных исходов от внутрибольничных инфекций [291]. Заболевания, связанные с *Acinetobacter* spp, в основном встречаются после продолжительного лечения в медицинских учреждениях и проявляются в качестве пневмонии, менингита, язв на кожных покровах, различных абсцессов, эндокардита [289; 290; 292].

Семейство Neisseriaceae

Род *Neisseria*

Neisseria spp – грамотрицательные, аэробные, сферические бактерии (чаще всего диплококки (пара бактерий)) с средним размером 0,6-1,0 мкм [293]. *N.gonorrhoeae* и *N.meningitidis* – патогенные для человека представители данного рода, остальные 15 видов не являются патогенными [294]. *Neisseria* spp населяют слизистые оболочки человека и животных [295]. Наиболее частые заболевания, связанные с *Neisseria* spp – это менингит (*N.meningitidis*) и гонорея (*N.gonorrhoeae*). Помимо этого описаны случаи возникновения бактериемии,

воспалительных заболеваний малого таза и инфекционных артритов [293; 296; 297].

Семейство Pseudomonadaceae

Род *Pseudomonas*

Pseudomonas spp – грамотрицательные, палочковидные, облигативно аэробные бактерии с размерами 0,5-0,8×1,5-3,0 мкм [298]. Данный род весьма обширный и насчитывает более 100 видов [299]. Одними из самых известных представителей *Pseudomonas* spp являются *P.aeruginosa, P.fluorescens, P.putida* [300]. *Pseudomonas* spp обитают повсеместно в окружающей среде, участвуют в процессах разложения различных химических веществ, в том числе важны для переработки нефтепродуктов, пестицидов и очистки сточных вод, также *Pseudomonas* spp участвуют в порче продуктов питания [298; 301]. Некоторые виды *Pseudomonas* spp являются патогенами человека (*P.aeruginosa, P.fluorescens, P.putida, P.paucimobilis, P.acidovorans*), другие – патогенами растений (*P.pseudoalcaligenes, P.savastanoi, P.syringae*), некоторые – патогены рыб и птиц (*P.anguilliseptica, P.chlororaphis, P.aeruginosa*) [300]. *Pseudomonas* spp могут вызывать различные заболевания: пневмонию, эндокардит, бактериемию, инфекции ушей (отит) и глаз (конъюнктевит), дерматит, инфекции в ранах и ожогах на кожных покровах, остеомиелит и другие [302; 303; 304]. *P.aeruginosa* является одним из самых опасных микроорганизмов в этом роду и относится к одному из шести видов бактерий ESKAPE (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumanii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter* spp), определенных Всемирной Организацией Здравоохранения как виды обладающие высокой резистентностью к антибиотикам и требующие разработки новых подходов в лечении [305]. Синегнойная палочка (*P.aeruginosa*) при инфицировании приводит к развитию сепсиса (попадание в кровь бактерий, при котором происходит воспалительная реакция в инфицированном организме),

а в тяжелых случаях может привести к септическому шоку (нарушению циркуляции крови и доставке кислорода к тканям) [306]. Также *P.aeruginosa* способна вызывать пневмонию, колиты и некроз тканей [306].

Семейство Staphylococcaceae

Род *Staphylococcus*

Staphylococcus spp – грамположительные, сферические, факультативно анаэробные бактерии с средним диаметром 0,5-1,5 мкм [307; 3088]. Род *Staphylococcus* включает в себя около 40 видов, наиболее известным представителем является *S.aureus* [309]. *Staphylococcus* spp являются симбионтом на кожных покровах человека и млекопитающих, обнаруживаются в почве, воде, продуктах питания [310; 311]. Большинство видов являются патогенными для человека и представляют опасность при ослаблении барьера кожных покровов или слизистых оболочек посредством травм или имплантации, наиболее опасными представляются *S.aureus* и *S.epidermidis* [309; 312; 313]. *S.aureus* является одним из самых опасных грамположительных видов бактерий (входит в группу микроорганизмов устойчивых к действию антибиотиков ESKAPE). В случае заражения *Staphylococcus* spp выделяют в окружающие ткани три вида токсинов: разрушающие клеточную мембрану токсины, взаимодействующие с рецепторами токсины и секретируемые ферменты; все эти токсины совместно приводят к разрушению тканей организма [308; 314]. *Staphylococcus* spp вызывают различные виды инфекций: дерматит, инфекции желудочно-кишечного тракта, пневмония, бактериемия, эндокардит и другие [308; 309; 315].

Семейство Streptococcaceae

Род *Streptococcus*

Streptococcus spp – грамположительные, сферические, факультативно анаэробные бактерии с средним диаметром 0,5-2,0 мкм [316]. *Streptococcus* spp насчитывают более 100 видов, среди которых существуют как патогенные, так и непатогенные виды, наиболее опасными для человека являются *S.agalactiae, S.pneumoniae, S.pyogenes* [317]. Несмотря на данный факт, некоторые *Streptococcus* spp (*S.thermophilus*) используются в пищевой промышленности для приготовления йогуртов и сыров [318]. *Streptococcus* spp являются симбионтами человека на кожных покровах, в ротовой полости, в верхних дыхательных путях, в кишечнике [316; 318]. Патогенные *Streptococcus* spp могут вызывать различные заболевания: фарингит, пневмония, скарлатина, пародонтит, менингит, бронхит и другие [317; 319 – 321].

Род *Lactococcus*

Lactococcus spp – грамположительные, сферические, факультативно анаэробные бактерии с средним диаметром 0,5-1,5 мкм [322]. *Lactococcus* spp насчитывает 12 видов бактерий, которые чаще всего используются в пищевой промышленности при приготовлении кисломолочных продуктов, наиболее известным представителем данного рода является *L.lactis* [323]. *Lactococcus* spp аналогично *Streptococcus* spp обитают на кожных покровах человека, а также на овощах и фруктах [324]. *Lactococcus* spp считаются непатогенными для человека, однако встречаются вызванные *Lactococcus* spp случаи заболевания бактериемией, эндокардитом и инфекциями мочеполовой системы у пациентов со сниженным иммунитетом. Впрочем такие заболевания как правило не являются тяжелыми, так как *Lactococcus* spp не обладают резистентностью к большинству видов антибиотиков [324; 325].

Семейство Thermaceae

Род *Thermus*

Thermus spp – грамотрицательные, палочковидные, аэробные бактерии с размерами 0,5-0,8×5-10 мкм [326]. Самым известным представителем данного рода является *T.aquaticus*. *T.aquaticus* впервые была выделена Броком и Фризом в 1969 году из горячих источников Йеллоустонского национального парка, другие виды бактерий данного рода обитают в горячих источниках, сточных водах, компостном навозе [327; 328]. Помимо этого в литературе описаны более 20 других видов *Thermus*, все виды этого рода непатогенны для человека [326]. *Thermus* spp нашли широкое применение в микробиологии, так например, ДНК-полимераза из *T.aquaticus* используется при проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР). Данный род является продуцентом и других термостабильных белков для нужд пищевой промышленности и медицины [329].

Семейство Xanthomonadaceae

Род *Stenotrophomonas*

Stenotrophomonas spp – грамотрицательные, палочковидные, аэробные бактерии с размерами 0,4-0,7×0,7-1,8 мкм [330]. В настоящее время описано 8 видов, из которых наиболее известным является *S.maltophilia* [331]. Данный род обитает повсеместно: в воде, почве, растениях и животых, может быть обнаружен в ранах, крови и моче [332]. Ввиду увеличения устойчивости к антибиотикам и способности образовывать биопленки *S.maltophilia* в настоящее время может являться патогеном для человека, в особенности для людей в состоянии иммунодефицита [331; 333]. *S.maltophilia* может стать причиной таких заболеваний как бактериемия, пневмония, менингит, инфекции мочеполовой системы, эндокардит, остеомиелит и другие [334; 335].

2.8. Низкомолекулярные эффекторы, потенциально влияющие на лизис бактериальных клеток

В работе было изучено влияние потенциальных эффекторов на активность бактериолитических факторов, при этом в первую очередь было проверено влияние веществ, которые часто можно обнаружить в биологических жидкостях человека. В качестве потенциальных эффекторов действия интерлейкина-2 и лизоцима были взяты следующие вещества: глицин, лизин, аргинин, глутамат, фенилаланин, тирозин, триптофан, тирамин, триптамин, таурин, мельдоний, бацитрацин, полимиксин В, ЭДТА. Все перечисленные аминокислоты участвуют не только в синтезе белков организма, но и в передаче нейрохимических сигналов в нервной системе человека. Тирамин, триптамин и таурин являются производными соответственно тирозина, триптофана и цистеина и в организме человека выполняют функции нейротрансмиттеров (вещество, способное передавать сигнал от нервных клеток другим клеткам организма) и нейромодуляторов (вещества, регулирующие передачу сигнала от нервных клеток другим клеткам организма). Мельдоний по своей структуре аналогичен физиологически активным веществам: L-карнитину и γ-бутиробетаину. Бацитрацин и полимиксин В являются широко используемыми антибиотиками против грамположительных и грамотрицательных бактерий соответственно.

Глицин – самая простая из аминокислот. В организме человека производится из аминокислоты серина и является нейромедиатором, выполняющим функции как ингибитора, так и активатора при передаче нейрохимических сигналов в центральной нервной системе [336]. В медицине глицин используют при лечении неврологических заболеваний, а также заболеваний сердечнососудистой системы [337; 338]. В свободной продаже можно встретить такие препараты, как Глицин Форте Эвалар®, Глицин Форте Фамаплант®, Глицин-БИО Фармаплант®. Помимо этого было подтверждено, что глицин обладает антибактериальными свойствами против бактерий различных видов, например, *Lactobacillus plantarum, Staphylococcus aureus, Corynebacterium*

callunae, *Helicobacter pylori* и другие [339; 340]. Глицин способен ингибировать процесс образования пептидогликана. Так глицин может встраиваться в пептидный мостик, связывающий полисахаридные цепи муреина, вместо L-аланина и D-аланина в положениях 1, 4 и 5 (Рисунок 6), что приводит к уменьшению количества сшивок в пептидогликане и морфологическим изменениям клеток, которые в свою очередь вызывают нарушение жизнедеятельности бактерии [339; 340].

Лизин – положительно заряженная, незаменимая аминокислота. Положительно заряженная аминогруппа лизина в организме человека достаточно часто подвергается посттрансляционной модификации, что позволяет лизину участвовать в различных биохимических процессах [341]. Например, одной из самых важных посттрансляционных модификаций лизина является ацетилирование лизина в составе белков гистонов (белки, связывающиеся с ДНК; комплексы ДНК-гистоны образуют хроматин), что приводит к увеличению активности процесса транскрипции (синтез РНК из ДНК) [341; 342]. В свободном состоянии лизин способен подавлять вирусное заболевание герпес [342].

Аргинин – еще одна положительно заряженная аминокислота. В организме человека аргинин является предшественником не только при создании белков, но и при синтезе мочевины, полиаминов, пролина, глутамата и креатина [343]. В настоящее время аргинин представляет наибольший интерес как единственный субстрат при биосинтезе оксида азота (NO), который играет важную роль в различных физиологических процессах (нейротрансмиссии, цитотоксичности и иммунитета) [344]. Благодаря своему участию в разнообразных биохимических процессах аргинин возможно использовать для уменьшения артериального давления, лечения ран, лечения атеросклероза, улучшения микроциркуляции крови, лечения ишемичесой болезни сердца и других [344; 345]. На данный момент аргинин имеется в продаже в качестве биологически активных добавок [345].

Глутамат (соль глутаминовой кислоты) является одним из главных возбуждающих нейротрансмиттеров центральной нервной системы человека, в

связи с этим предполагается, что глутамат – важный субстрат в процессах обучения и запоминания [346]. Однако глутамат может выступать в виде нейротоксина (увеличение концентрации глутамата вследствие дисфункции транспортеров глутамата может вызывать дегенерацию нервных клеток из-за избыточного возбуждающего сигнала, полученного от связывания больших количеств глутамата с рецепторами на поверхности нервных клеток) и в таком виде участвовать в патогенезе различных неврологических заболеваний (например, инсульт, склероз, болезнь Паркинсона) [347; 348].

Фенилаланин – незаменимая ароматическая аминокислота. В организме человека фенилаланин превращается в тирозин, который в свою очередь является предшественником при синтезе нейротрансмиттеров (дофамин, норадреналин, адреналин) [349]. Фенилкетонурия – наследственное генетическое заболевание, при котором нарушен метаболизм фенилаланина. При фенилкетонурии генетическая мутация фермента фенилаланингидроксилазы приводит к отсутствию возможности переработки фенилаланина в тирозин и дефициту производных тирозина: дофамина и адреналина [350]. В совокупности данные факторы приводят к умственной отсталости, микроцефалии и эпилепсии у больных фенилкетонурией [350; 351].

Тирозин – ароматическая аминокислота, предшественник нейромодуляторов таких как дофамин и адреналин. В медицине тирозин предполагается использовать для лечения стресса у здоровых людей [352]. Тирозин также был предложен для лечения заболеваний, связанных с действием метаболитов тирозина (например, болезнь Паркинсона), но в настоящее время эффективность такой терапии не доказана [353; 354].

Триптофан – незаменимая аминокислота, предшественник серотонина и меланина [355]. Пониженное употребление триптофана может вызывать различные заболевания: пеллагра (один из видов авитаминозов), хронические заболевания почек, непереносимость глютена (целиакия), шизофрения, анорексия и другие [356]. В медицине триптофан используют для лечения депрессии, булемии, бессонницы, гиперактивности и хронической усталости [355; 357].

Тирамин – биогенный амин (получаемый из тирозина), который чаще всего можно обнаружить в ферментированных продуктах [358; 359]. Чрезмерное употребление тирамина человеком может вызвать аллергические и неврологические реакции, а также расстройство желудочно-кишечного тракта [360]. При попадании в кровоток тирамин способен высвобождать норадреналин, повышать давление и сердечный ритм, однако лечение тирамином некоторых пациентов может вызывать побочное действие в виде мигрени [361; 362].

Триптамин – биогенный амин (производное триптофана), у человека обнаруживается в мозгу и играет роль нейротрансмиттера и нейромодулятора [363]. Триптамин является предшественником различных гормонов и нейротрасмиттеров (например, серотонин и мелатонин) [364]. Триптамин способен влиять на поведение человека, так было обнаружено повышенное содержание в крови триптамина у людей с различными психиатрическими заболеваниями (например, шизофрения) и болезнью Паркинсона [365]. Пониженное содержание триптамина найдено у больных с депрессией, однако использование триптамина в качестве антидепрессанта невозможно в связи с негативными побочными эффектами [365].

Таурин – сульфокислота, производное цистеина. В организме человека встречается практически во всех тканях, выполняет функции нейротрансмиттера, регуляции осмоса, антиоксиданта и некоторые защитные функции (например, защита от окислительного стресса, действия токсинов) [366]. Таурин в медицине используют при лечении сердечнососудистых заболеваний, диабета, заболеваний глаза, эпилепсии и других [366 – 369]. Интересно, что у кошек синтез таурина ограничен в связи с низкой активностью некоторых ферментов в пути синтеза таурина из цистеина, поэтому для кошек таурин необходимо добавлять в рацион в качестве пищевой добавки [370]. В аптеках можно найти следующие средства с действующим веществом таурин: Тауфон®, Дибикор®, КардиоАктив®, Игрель®, Таурин-ДИА®.

Мельдоний (милдронат) является ингибитором L-карнитина и регулятором метаболизма в мышцах [371]. Как структурный аналог L-карнитина и γ-

бутиробетаина, милдронат ингибирует ферменты на пути β-окисления жирных кислот в митохондриях клетки и также ингибирует белки-переносчики L-карнитина [372]. Мельдоний позволяет снизить концентрацию L-карнитина в клетке, это важно при кислородном голодании клетки, так как в этом случае происходит неполное окисление жирных кислот и вырабатываются вредные вещества (например, ацилкарнитин) [373]. А ингибирование синтеза и транспорта L-карнитина позволяет клетке переходить на метаболизм углеводов [373]. В медицине милдронат используется для лечения сердечнососудистых заболеваний (гипоксия, ишемия), цереброваскулярных заболеваний (заболевания нервной системы) и диабета [374; 375]. Среди лекарственных препаратов, содержащих активное вещество мельдоний, можно найти следующие коммерческие препараты: Милдронат®, Идринол®, Кардионат®.

Бацитрацин – циклический полипептидный антибиотик, производимый бактериями *Bacillus subtilis* (Рисунок 22) [376]. Бацитрацин обладает бактериостатическим действием (предотвращает размножение бактерий) по отношению к грамположительным бактериям: Staphylococcus, Streptococcus и Clostridium [377]. Бацитрацин препятствует дефосфорилированию липидов, которые участвуют в переносе мономерных звеньев пептидогликанового остова [378]. В связи с низкой растворимостью в медицине применяют в виде мазей для наружного применения при лечении офтальмологических и кожных заболеваний: Банеоцин®, Триасепт®.

Полимиксин В – смесь циклических катионных пептидных антибиотиков, производимых *Bacillus polymyxa*, обладающих бактериостатическим действием (предотвращает размножение бактерий) (Рисунок 23) [379]. Полимиксин В активен относительно грамотрицательных бактерий семейств Escherichia, Salmonella, Pseudomonas [380]. Существует несколько альтернативных механизмов действия полимиксина В. Предполагается, что полимиксин может взаимодействовать с липополисахаридами и таким образом разрушать внешнюю мембрану бактерий, либо полимиксин может связывать катионы Mg^{+2} и Ca^{+2}, связанные с фосфатными группами на поверхности внешней мембраны, что

аналогично приводит к разрушению бактерии [381; 382]. В медицине полимиксин В (Полижинакс®, Веллобактин-В®, Сабвиксин® и другие) применяют при лечении инфекций, вызванных бактериями резистентными по отношению к другим антибиотикам, например, бактериемия, заболевания желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы [380]. Ввиду токсичности полимиксина В в настоящее время в ряде стран полимиксин В используется только для наружного и интраназального применения (например, Полидекса®, Макситрол®) [382].

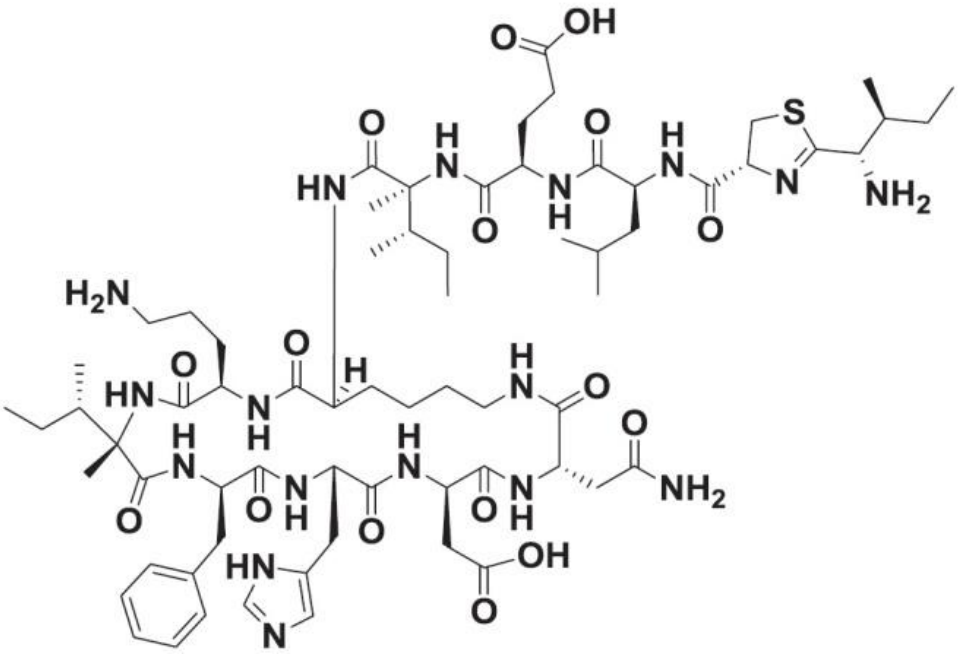

Рисунок 22 – Бацитрацин [378]

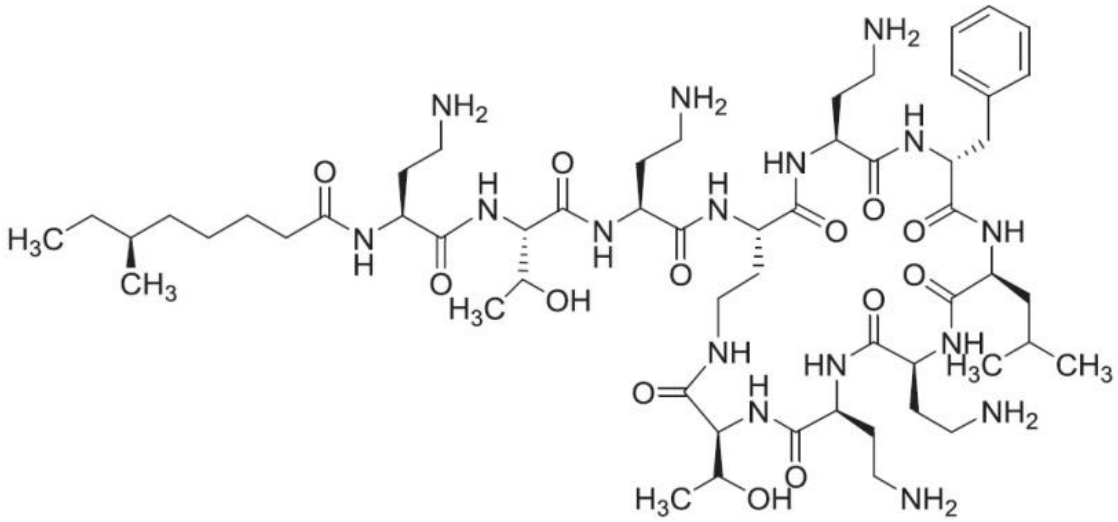

Рисунок 23 – Полимиксин В [382]

3. Материалы и методы

3.1. Материалы

В работе были использованы следующие материалы: TRIS, MES («extra pure», Amresco, США); уксусная кислота («ч.д.а.», Реахим, Россия); глюкоза (99,5% чистоты, Helicon, Россия); дрожжевой экстракт (Helicon, Россия); сульфат магния (98% чистоты, Helicon, Россия); карбонат кальция (Pharma Grade, Helicon, Россия); пептон, триптон, бактоагар (BD Difco, США); NaOH (98% чистоты, PanReac, Испания); NaCl, ЭДТА, сульфат марганца (ACS, PanReac, Испания); Tween 85, моногидрофосфат калия, дигидрофосфат калия (Pharma Grade, PanReac, Испания); HCl (Germed, Германия); 10% водный раствор додецилсульфата натрия (ДСН) (Bio Rad, США); лиофилизованный лизоцим куриного яйца (95% чистоты, Sigma Aldrich, США); полимиксин B, L-триптофан, L-тирозин, L-фенилаланин, L-аргинин (Pharma Grade, Sigma Aldrich, США); *Micrococcus luteus* ATCC (Sigma Aldrich, США); лимонная кислота, сульфат меди (II) (98% чистоты, Merck, Германия); карбонат натрия (99,5% чистоты, Merck, Германия); тирамин (97% чистоты, Acros Organics, США); триптамин (98% чистоты, Acros Organics, США); таурин (99% чистоты, Acros Organics, США); *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus plantarum* (Микроген, Россия); Ронколейкин® (раствор рекомбинантного очищенного интерлейкина-2 для внутривенного и подкожного введения 0,25 мг/мл и 0,5 мг/мл, Биотех, Россия); бацитрацин (MP Biomedicals, Германия); глицин (99% чистоты, Fluka, Германия); L-лизин (99% чистоты, Serva, Германия); милдронат (2-(2-карбоксидатоэтил)-1,1,1-триметилгидразиний, Cridex, Латвия); L-глутамат натрия (Hong Mei, Китай); 5% кровяной колумбийский агар pH = 7,3 (Oxoid, Великобритания); Интерлейкин-2-ИФА-БЕСТ (ВекторБест, Россия).

В работе было использовано следующее оборудование: центрифуга Minispin (Eppendorf, Германия); спектрофотометр UV-1800 (Shimadzu, Япония); термостат суховоздушный ТСО-1/80 (МедЛайф, Россия); шейкер-ротатор Multi Bio RS-24

(Biosan, Латвия); планшетный спектрофотометр Multiscan FC (Thermo Scientific, Швейцария)

В качестве стандартного препарата IL-2 применяли раствор Ронколейкина® без дополнительной обработки, ампулу с препаратом открывали непосредственно перед проведением эксперимента. IL-2 из разных ампул с разной концентрацией имел одинаковую удельную активность. Препарат IL-2 является элетрофоретически гомогенным. Препарат лизоцима готовили непосредственно перед экспериментом, растворяя в буферной смеси для измерения активности. Концентрацию белка определяли с помощью микробиуретового метода, с применением модифицированного реагента Бенедикта [161].

Для проведения экспериментов бактериологической лабораторией Первого МГМУ им. И.М.Сеченова были любезно предоставлены штаммы бактериальных клеток: *Acinetobacter baumanii*, *Bacillus megaterium*, *Citrobacter braakii*, *Corynebacterium amycolatum*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumonia*, *Morganella morganii*, *Neisseria perflava*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Rothia mucilaginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Stenotrophomonas maltophilia*. Видовую принадлежность бактерий определяли методом прямого белкового профилирования с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии (серия FLEX, Bruker Daltonic GmbH, Германия). Микроорганизмы выращивали в течение 24 часов при 35°C в атмосфере 5% CO_2 на твердой агаризованной среде (5% кровяной колумбийский агар).

В работе также были использованы штаммы бактерий, любезно предоставленные музейной коллекцией кафедры микробиологии МГУ им. М.В.Ломоносова (обозначение КМ МГУ): *Alcaligenes faecalis* КМ МГУ 82, *Bacillus megaterium* КМ МГУ 17, *Bacillus mycoides* КМ МГУ 31, *Bacillus cereus* КМ МГУ 9, *Clostridium butyricum* КМ МГУ 19, *Lactobacillus acidophilus* КМ МГУ 146, *Lactobacillus casei* КМ МГУ 153, *Lactococcus lactis* КМ МГУ 165,

Pseudomonas aeruginosa КМ МГУ 47, *Pseudomonas fluorescens* КМ МГУ 71, *Serratia marcescens* КМ МГУ 208, *Staphylococcus aureus* КМ МГУ 144.

Бактерии *Alcaligenes faecalis* КМ МГУ 82, *Bacillus megaterium* КМ МГУ 17, *Bacillus mycoides* КМ МГУ 31, *Bacillus cereus* КМ МГУ 9, *Pseudomonas aeruginosa* КМ МГУ 47, *Pseudomonas fluorescens* КМ МГУ 71, *Serratia marcescens* КМ МГУ 208 и *Staphylococcus aureus* КМ МГУ 144 выращивали при 30°С в аэробных условиях на мясо-пептонном бульоне [383]. *Lactobacillus acidophilus* КМ МГУ 146, *Lactobacillus casei* КМ МГУ 153 и *Lactococcus lactis* КМ МГУ 165 выращивали на среде MRS по стандартной методике [384]. *Clostridium butyricum* КМ МГУ выращивали при 37°С в анаэробных условиях в среде следующего состава: 10 г/л глюкозы, 10 г/л пептона, 5 г/л $CaCO_3$, 1 г/л K_2HPO_4 [385].

Микроорганизм *Thermus aquaticus*, любезно предоставленный А.А.Белогуровым (Институт экспериментальной кардиологии Национального медицинского исследовательского центра кардиологии Министерства здравоохранения РФ), выращивался по стандартной методике в аэробных условиях при 75°С [327]. Бактериальные клетки *Escherichia coli* JM109 любезно предоставлены Дж. Мессингом (Waksman Institute, New Jersey, США), культивировались по стандартной методике в течение 24 часов при 37°С [386].

Препараты лиофилизированных бактерий *Bifidobacterium bifidum* и *Lactobacillus plantarum* непосредственно перед проведением эксперимента суспендировали в 10 мл буфера для измерения активности (в расчете на 1 ампулу лиофилизированных бактерий).

Все препараты бактериальных клеток, использованных в работе, были культивированы до одинаковой фазы роста и перед проведением экспериментов промывались центрифугированием при 3500 оборотов в минуту (822 g) в течение 4 минут, после чего осадок бактерий ресуспендировали в буферной смеси для измерения активности.

3.2. Методы исследования

Измерение бактериолитической активности

Измерение бактериолитической активности проводили при длине волны 650 нм в кюветах объемом 0,5 мл и длиной оптического пути 1см. Все измерения проводились при температуре 37°С. В ходе эксперимента сначала наблюдали за фоновыми процессами самопроизвольного лизиса и осаждения в течение 1 минуты, затем добавляли бактериолитический фактор и следили за уменьшением оптического поглощения суспензии (A_{650}). За начальную скорость лизиса принимали изменение оптического поглощения во времени с 5 по 55 секунды после добавления бактериолитического фактора, при этом учитывали процессы самопроизвольного лизиса и осаждения. В случае, если бактериальные клетки подвергались лизису в присутствии как IL-2, так и додецилсульфата натрия (ДСН), то учитывали поправку при расчете скорости лизиса IL-2 с учетом содержания ДСН в пробе. Начальное оптическое поглощение суспензии бактериальных клеток во всех экспериментах составляло A_{650}=0,4÷0,45 оптических единиц поглощения. За активность принимали изменение оптического поглощения бактериальной суспензии во времени (-dA/dt, ед.опт.погл.×мин$^{-1}$), которое пропорционально изменению количества КОЕ во времени (-dКОЕ/dt), как описано выше. Все измерения проводились в буферной смеси 10 мМ TRIS-MES-CH_3COOH с различными значениями pH.

Зависимость начальной скорости лизиса от концентрации бактериолитического фактора. Для построения зависимости начальной скорости лизиса от концентрации бактериолитического фактора к бактериальной суспензии добавляли различные количества бактериолитического фактора, определяли скорость лизиса при данной концентрации бактериолитического фактора и строили зависимость. Из линейного диапазона зависимости выбирали такую концентрацию бактериолитического фактора, при которой достигается треть от

скорости лизиса на «плато». Выбранные концентрации указаны в подписях к рисункам и таблицам.

Зависимость начальной скорости лизиса от pH. Измеряли начальные скорости лизиса бактерий при различных значениях pH, строили зависмости активности бактериолитических факторов от pH. Дальнейшие измерения проводились в pH-оптимумах активности бактериолитических факторов, как указано в подписях к рисункам и таблицам.

Влияние потенциальных эффекторов на активность бактериолитических факторов. Потенциальные эффекторы, использованные в работе, не влияли на оптическое поглощение бактериальной суспензии в течение 10 минут. Зависимости активности бактериолитических факторов от концентрации потенциальных эффекторов измеряли аналогично процедурам, описанным выше.

Сопоставление степени лизиса с прямым микробиологическим методом подсчета КОЕ

Для проведения микробиологического анализа сначала готовили соответствующие бактериальные суспензии, в которые добавляли бактериолитический фактор до необходимой концентрации (для *E.coli* 15 мкг/мл и 0,1 мкг/мл IL-2 и лизоцима соответственно; для *L.plantarum* 30 мкг/мл и 2,5 мкг/мл IL-2 и лизоцима соответственно). Затем через равные промежутки времени отбирали пробы клеточной суспензии (30мкл), из которых готовили необходимые разведения (10^7 и 10^6 по три повтора) и производили высев на агаризованную среду. *E.coli* культивировали на стандартной среде LB, а *L.plantarum* на среде MRS с заменой Tween 80 на Tween 85 [384; 386]. Подсчет количества КОЕ производили после 36 часов инкубации при 37°C. При этом степень лизиса свежевыращенных *L.plantarum* не отличалась от степени лизиса аналогичного лиофилизованного препарата.

Исследование адсорбции интерлейкина-2 на бактериях *E.coli*

Эксперимент по адсорбции IL-2 на бактериях *E.coli* проводили согласно Рисунку 24. В ходе эксперимента бактериальные клетки суспендировали в буферной смеси 10 мМ TRIS-MES-CH_3COOH с различными значениями pH до начальной оптической плотности A_{650}=1 ((8,2±1,1)×10^8 КОЕ/мл). Затем проводили инкубацию полученной смеси при 37°C в суховоздушном термостате на шейкере-ротаторе, далее образцы центрифугировали при 3500 оборотов в минуту (822 g) в течение 4 минут. На заключительном этапе концентрацию IL-2 (свободного) определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью набора Интерлейкин-2-ИФА-БЕСТ. Количество связавшегося IL-2 определяли по разнице между добавленным количеством и определенным по методу ИФА (концентрацией свободного IL-2). При этом рассчитывали количество связавшегося IL-2 с одной клеткой, исходя из данных о количестве КОЕ в 1 мл бактериальной суспензии с начальной оптической плотностью A_{650}=1 [171]. Параметры изотерм адсорбции при разных временах инкубации *E.coli* с IL-2 (при разных степенях лизиса) не менялись, для проведения эксперимента было выбрано методически удобное время инкубации – 5 минут.

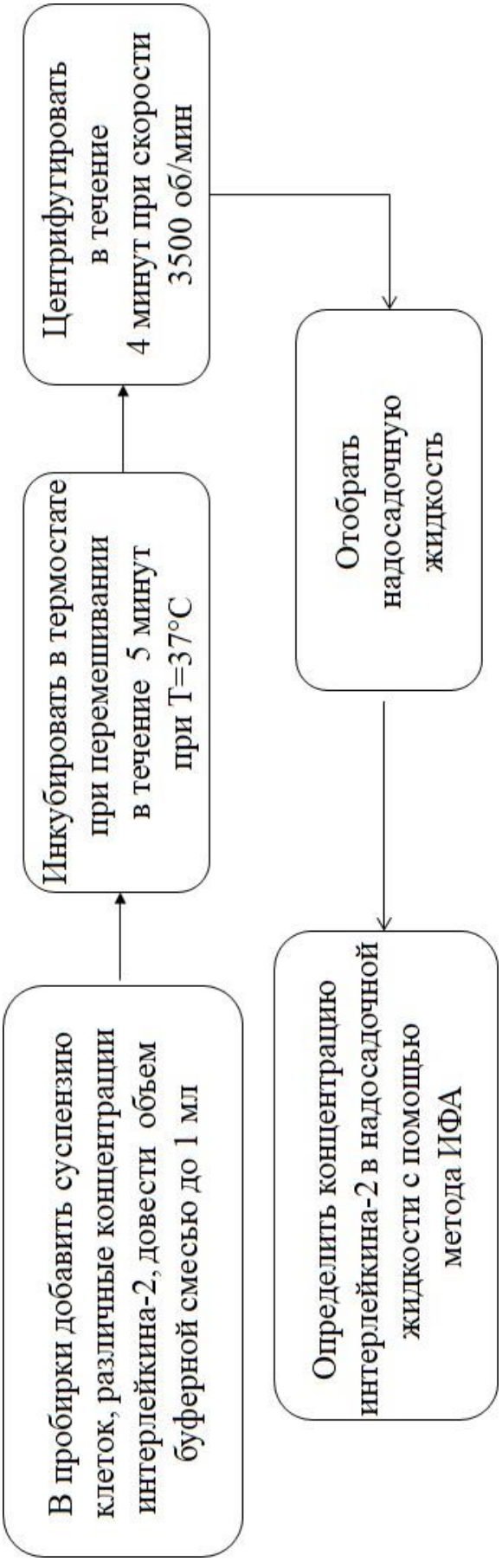

Рисунок 24 – Схема проведения эксперимента по адсорбции интерлейкина-2 на клетках *E.coli*

4. Результаты и обсуждение

4.1. Выбор модели сравнения для изучения бактериолитических свойств интерлейкина-2 человека

В настоящее время интерлейкин-2 человека (IL-2) применяют в медицине при лечении онкологических заболеваний и сепсиса в качестве иммуномоделирующего средства, увеличивающего иммунный ответ организма. Недавно у IL-2 человека была обнаружена бактериолитическая активность. Соответственно после обнаружения у IL-2 бактериолитической активности можно утверждать, что при лечении сепсиса IL-2 может выполнять двойственную функцию: как цитокина, увеличивающего иммунный ответ, так и бактериолитического фактора, который непосредственно разрушает (лизирует) бактерии.

К моменту выполнения данной работы для IL-2 были описаны pH-зависимость и зависимость бактериолитической активности от ионной силы реакционной смеси для бактерий вида *Escherichia coli*. pH-зависимость для IL-2 имеет колоколообразную форму, такой вид pH-зависимости характерен и для такого известного бактериолитического фактора как лизоцим. Кроме того при увеличении ионной силы раствора бактериолитическая активность IL-2 уменьшается и при ионной силе 80 мМ IL-2 не разрушает (лизирует) бактерии вида *Escherichia coli*. Такое влияние ионной силы раствора на бактериолитическую активность обнаруживается и у лизоцима, при ионной силе раствора 100 мМ лизоцим перестает разрушать бактерии вида *Escherichia coli*. В виду аналогичной картины бактериолитического действия IL-2 и лизоцима на бактерии вида *Escherichia coli*, в данной работе лизоцим был выбран как модельный бактериолитический фактор для сравнения при изучении бактериолитических свойств IL-2 человека.

4.2. Сопоставление данных для единого подхода к расчету скорости ферментативного лизиса живых бактериальных клеточных субстратов турбидиметрическим методом

В настоящее время для оценки эффективности действия бактериолитических факторов сравнивают величины изменения оптического поглощения во времени (-dA/dt). Однако такой метод позволяет сравнивать лишь активность действия одного бактериолитического фактора на один вид бактерий при различных условиях. Для сравнения действия одного бактериолитического фактора на разные виды микроорганизмов или же наоборот действия различных бактериолитических факторов на один вид бактерий необходимо переходить к измерению скоростей лизиса с помощью метода подсчета КОЕ. Проведение микробиологического эксперимента (метод подсчета КОЕ) является весьма трудоемким процессом для измерения большого массива данных, поэтому необходимо разработать некоторую общую схему, которая смогла бы позволить определять активность бактериолитических факторов без использования микробиологических экспериментов.

В разделе 2.5. Турбидиметрия данной работы рассмотрено преобразование выражений скоростей лизиса, получаемых с помощью метода турбидиметрии (выражения (2) и (3)), и выражений для определения активности бактериолитических факторов с помощью метода подсчета КОЕ (выражения (4) и (5)). Преобразуя данные выражения, можно получить выражение (6) для расчета истинной скорости лизиса, учитывающее как оптическое поглощение суспензии бактерий, так и количество КОЕ.

$$V = \frac{-[\text{КОЕ}]_0}{A_{ini} - A_{min}} \times \frac{dA}{dt}. \quad (6)$$

Как было указано в разделе 2.6. Турбидиметрия измерение скоростей лизиса бактерий с помощью метода турбидиметрии сопряжено с некоторыми особенностями. Так зависимость оптического поглощения от количества КОЕ нелинейна при оптическом поглощении большем 0,8 оптических единиц (Рисунок

21). Кроме того отдельной методической задачей является выбор концентрации бактериолитического фактора при исследовании лизиса бактерий. Как видно из Рисунка 25, при высоких концентрациях бактериолитических факторов наблюдается отклонение от линейности зависимости начальной скорости изменения оптического поглощения (начальная скорость лизиса) от концентрации бактериолитического фактора. При малых концентрациях бактериолитического фактора скорость лизиса прямо пропорциональна концентрации фермента, что говорит в пользу того факта, что лимитирующей стадией процесса лизиса является именно активность самого фактора, а разрыв клетки под действием

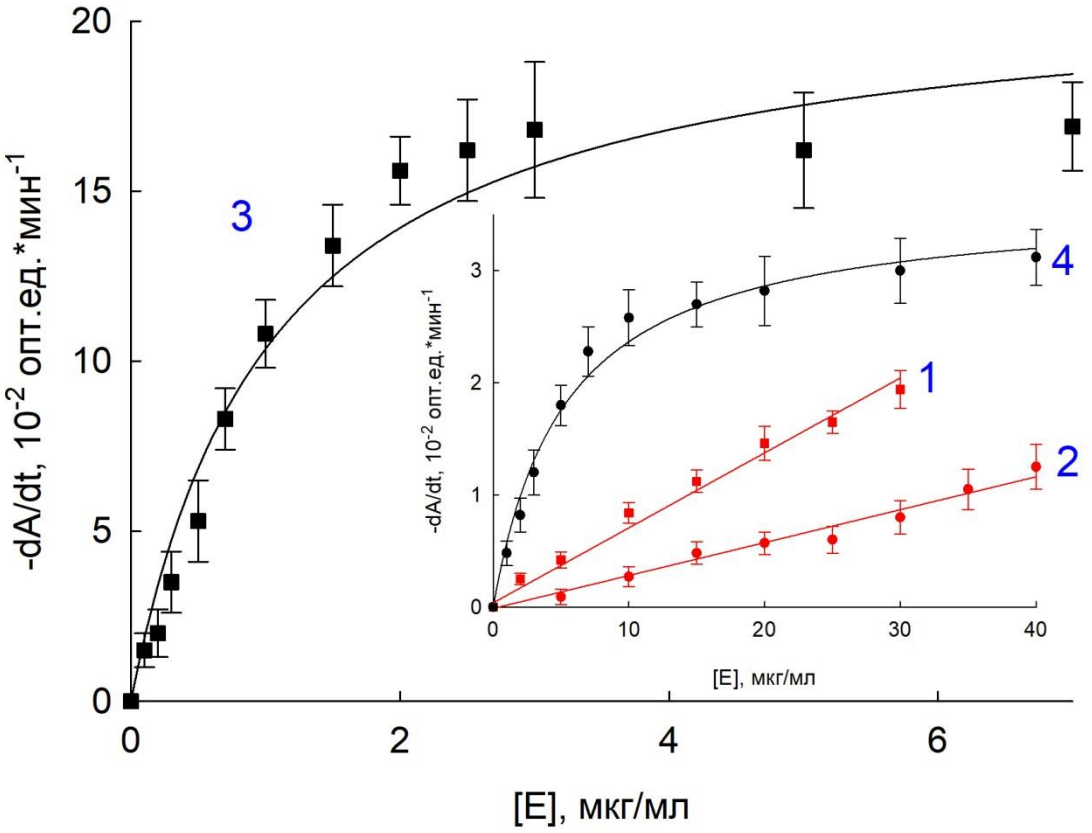

Рисунок 25 – Зависимости начальной скорости лизиса от концентрации IL-2 и лизоцима для *E.coli* и *L.plantarum*. 1 – IL-2, *E.coli*, pH = 8,5; 2 – IL-2, *L.plantarum*, pH = 7,0; 3 – лизоцим, *E.coli*, pH = 8,5; 4 – лизоцим, *L.plantarum*, pH = 7,0

осмотического шока происходит быстрее действия бактериолитического фактора. При больших концентрациях бактериолитического фактора наблюдается «плато» на графике зависимости, и скорость лизиса перестает зависеть от концентрации

фактора в реакционной смеси, в этой области скорость реакции, вероятно, определяется процессом осмотической деструкции клетки. В случае большого содержания бактериолитических факторов в реакционной смеси происходят множественные разрывы клеточной стенки бактерий, сопровождающиеся более медленным процессом разрушения бактериальной клетки под действием осмотического шока. Соответственно вероятнее всего осмотическая деструкция бактерий становится скорость лимитирующей стадией при лизисе бактерий («плато» на графике зависимости скорости лизиса от концентрации бактериолитического фактора).

Для составления общей схемы расчета скорости лизиса турбидиметрическим методом были выбраны два микроорганизма: *E.coli* (как типичный представитель грамотрицательных бактерий) и *L.plantarum* (как типичный представитель грамположительных бактерий).

На Рисунке 26 представлены зависимости оптического поглощения от времени для бактериальных клеток *E.coli* и *L.plantarum* при действии IL-2 и лизоцима. Можно заметить, что графики для *E.coli* и *L.plantarum* существенно отличаются. Так суспензии бактерий *E.coli* практически полностью просветляются при действии обоих бактериолитических факторов после времени проведения эксперимента 150 минут. Для *L.plantarum* наблюдается принципиально иная картина, бактериальная суспензия не достигает полного просветления ни при действии IL-2, ни при действии лизоцима даже при временах проведения эксперимента – 180 минут. В Таблице 1 приведено сопоставление данных, полученных для эксперимента соответствующего зависимостям на Рисунке 26, по изменению числа КОЕ и оптического поглощения бактериальных суспензий во времени в присутствии IL-2 и лизоцима.

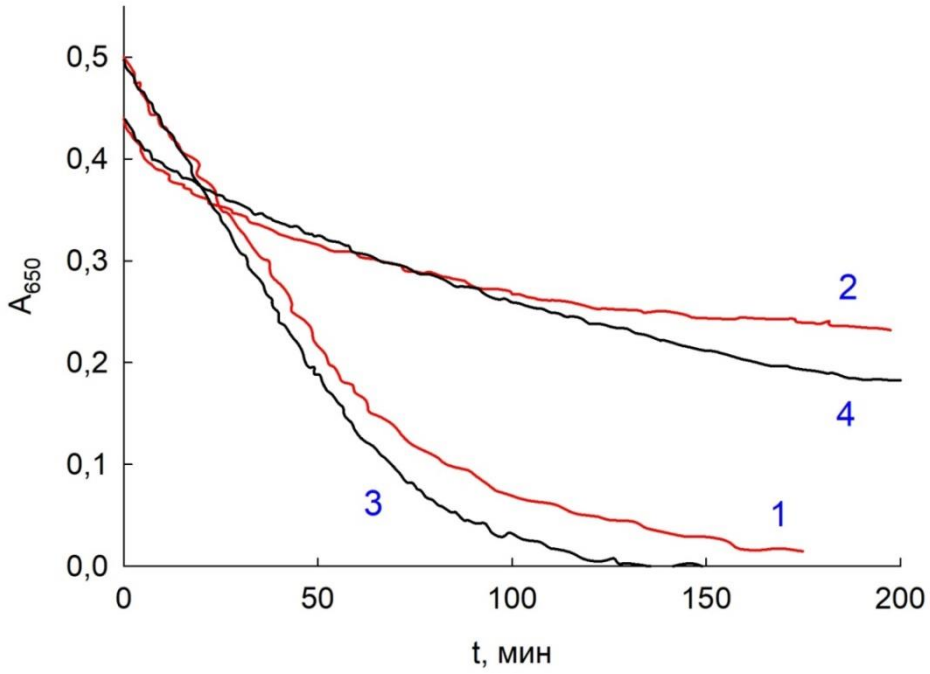

Рисунок 26 – Зависимость оптического поглощения от времени. 1 – *E.coli* в присутствии IL-2, 15 мкг/мл, pH = 8,5; 2 – *L.plantarum* в присутствии IL-2, 30 мкг/мл, pH = 7,0; 3 – *E.coli* в присутствии лизоцима, 0,1 мкг/мл, pH = 8,5; 4 – *L.plantarum* в присутствии лизоцима, 2,5 мкг/мл, pH = 7,0

Из Таблицы 1 видно, что после двух часов проведения эксперимента в суспензии не остается жизнеспособных бактерий *E.coli*. При этом для *L.plantarum* после трех часов обработки бактериолитическими факторами количество жизнеспособных бактерий падает на порядок и клеточная суспензия просветляется на 43%. Можно предположить, что при действии бактериолитических факторов на клетки *E.coli* происходит множественный разрыв связей в пептидогликане и бактерия распадается на мелкие фрагменты, поэтому оптическое поглощение суспензии стремится к нулю при больших временах проведения эксперимента. Вероятно в случае *L.plantarum* даже небольшое количество разрывов в муреине после действия бактериолитических факторов может приводить к распаду бактерии, при этом будут формироваться достаточно крупные фрагменты клеточных стенок, которые будут давать остаточное поглощение на больших временах лизиса.

Таблица 1 – Изменение числа КОЕ и оптического поглощения во времени при действии бактериолитических факторов на суспензии бактерий *E.coli* и *L.plantarum*

t, минуты	IL-2								Лизоцим							
	E.coli				*L.plantarum*				*E.coli*				*L.plantarum*			
	10^7 КОЕ/мл	**$\Theta_{КОЕ}$**	A_{650}	**Θ_A**	10^7 КОЕ/мл	**$\Theta_{КОЕ}$**	A_{650}	**Θ_A**	10^7 КОЕ/мл	**$\Theta_{КОЕ}$**	A_{650}	**Θ_A**	10^7 КОЕ/мл	**$\Theta_{КОЕ}$**	A_{650}	**Θ_A**
0	37±8	**0**	0,50	**0**	8,8±1,1	**0**	0,44	**0**	37±6	**0**	0,49	**0**	8,8±0,5	**0**	0,44	**0**
30	22±5	**0,41**	0,33	**0,35**	6,1±0,8	**0,24**	0,35	**0,32**	23±3	**0,38**	0,31	**0,37**	5,7±0,9	**0,35**	0,35	**0,32**
60	10±2	**0,73**	0,17	**0,67**	4,5±0,5	**0,49**	0,31	**0,46**	12±4	**0,68**	0,13	**0,73**	4,4±0,4	**0,50**	0,31	**0,46**
90	3,0±0,9	**0,92**	0,09	**0,84**	3,3±0,3	**0,63**	0,27	**0,61**	6±2	**0,84**	0,04	**0,92**	3,2±0,5	**0,64**	0,27	**0,61**
120	0,4±0,1	**0,99**	0,05	**0,92**	2,1±0,4	**0,76**	0,26	**0,64**	1,0±0,3	**0,97**	0,01	**0,98**	2,7±0,3	**0,69**	0,24	**0,71**
150	0,0	**1**	0,03	**0,96**	1,6±0,3	**0,82**	0,24	**0,71**	0,0	**1**	0,0	**1**	2,0±0,2	**0,77**	0,21	**0,82**
180	0,0	**1**	0,01	**1**	1,0±0,2	**0,89**	0,23	**0,75**	0,0	**1**	0,0	**1**	1,7±0,4	**0,81**	0,19	**0,89**

Примечания. $\Theta_{КОЕ}$ – степень лизиса, рассчитанная по формуле (1). Θ_A – степень лизиса, рассчитанная по формуле (2). Погрешность $\Theta_{КОЕ}$ составляла не более 20%, погрешность Θ_A составляла не более 15%, погрешность для A_{650} составляла не более 5%.

Из Таблицы 1 видно, что степени лизиса, рассчитанные исходя из данных, полученных из двух независимых экспериментов (метод турбидиметрии и метод подсчета КОЕ), совпадают при действии бактериолитических факторов на бактерии видов *E.coli* и *L.plantarum*. Таким образом, представляется возможным использовать выражение (2) для расчета степени лизиса бактериальных клеток. Кроме того доказана правомерность использования метода турбидиметрии для количественного определения степеней лизиса бактерий в присутствии бактериолитических факторов.

На Рисунке 27 показана связь между данными, полученными турбидиметрическим методом и методом прямого подсчета КОЕ. Как можно заметить, поглощение суспензии линейно зависит от количества жизнеспособных клеток в процессе лизиса. Что также подтверждает справедливость предложенного выражения (2) и корректность использования метода турбидиметрии при расчете степеней лизиса бактериальных субстратов.

При проведении экспериментов по лизису бактерий необходимо учитывать, что при одинаковых значениях начальных оптических поглощений суспензий, количество бактериальных клеток для различных микроорганизмов может в значительной мере отличаться. Например, A_{650}=0,5 (значение оптического поглощения бактериальной суспензии при длине волны 650 нм) для *E.coli* соответствует $3{,}7\times10^8$ КОЕ/мл, A_{650}=0,49 для *L.plantarum* соответствует $8{,}8\times10^7$ КОЕ/мл. Кроме того, как видно из Рисунков 3 и 4, для бактерий при Ѳ=1 (все бактерии разрушены) может наблюдаться как полное просветление бактериальной суспензии (A_{650}=0 (значение оптического поглощения при длине волны 650 нм)), так возможно и неполное просветление бактериальной суспензии, характеризующееся неким остаточным уровнем оптического поглощения при Ѳ=1 (все бактерии разрушены). В таком случае для сравнения эффективности лизиса разных микроорганизмов предпочтительнее использовать безразмерную величину эффективности лизиса ($d\theta/dt$):

$$\frac{d\theta(t)}{dt} = -\frac{1}{[\text{КОЕ}]_0} \times \frac{d[\text{КОЕ}]}{dt} = -\frac{1}{A_{ini}-A_{min}} \times \frac{dA}{dt}. \qquad (7)$$

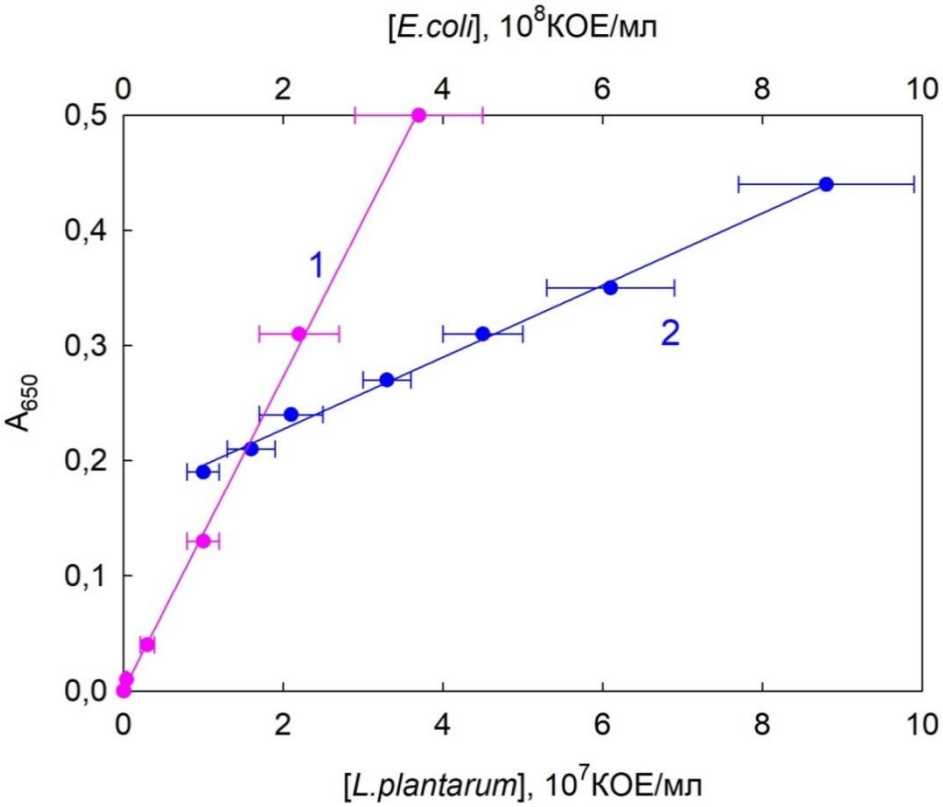

Рисунок 27 – Связь между оптическим поглощением суспензии и количеством жизнеспособных клеток при лизисе бактерий в присутствии лизоцима. 1 – *E.coli*, 0,1 мкг/мл, pH = 8,5; 2 – *L.plantarum*, 2,5 мкг/мл, pH = 7,0

В условиях эксперимента скорости лизиса линейно зависят от концентрации бактериолитического фактора. И для того чтобы учесть концентрацию бактериолитического фактора можно ввести новый параметр – удельную эффективность лизиса (Λ):

$$\Lambda = \frac{1}{\mathrm{E}} \times \frac{d\theta(t)}{dt} = -\frac{1}{\mathrm{E}} \times \frac{1}{A_{ini} - A_{min}} \times \frac{dA}{dt}. \quad (8)$$

Зная все исходные параметры уравнения, можно рассчитать удельные эффективности лизиса и сравнить влияние IL-2 и лизоцима на микроорганизмы *E.coli* и *L.plantarum*. Для *E.coli* примем значения A_{ini}=0,49, A_{min}=0. Ситуация для *L.plantarum* осложняется тем, что A_{min} неизвестно. Это связано с тем, что даже при временах эксперимента более четырех часов оптическое поглощение суспензии *L.plantarum* продолжало уменьшаться (как описано выше, данный факт скорее всего обусловлен осаждением крупных фрагментов клеточных стенок,

обладающих ненулевым оптическим поглощением). A_{min} можно вычислить, исходя из преобразования выражения (2):

$$A_{min} = \frac{A(t)-(1-\theta(t))\times A_{ini}}{\theta(t)}. \quad (9)$$

В выражение (9) вместо $\theta(t)$ подставим значение, полученное из микробиологического эксперимента взаимодействия *L.plantarum* с лизоцимом. Согласно Таблице 2 выберем время эксперимента три часа и вычислим $\theta(t)=[КОЕ]_{180}/[КОЕ]_0=0{,}114$. Тогда при $A_{ini}=0{,}44$, $A(180)=0{,}19$, получаем $A_{min}=0{,}16$. Аналогичное значение A_{min} можно получить путем экстраполяции линейной зависимости A_{650} от количества бактерий *L.plantarum* (Рисунок 26).

В Таблице 2 представлено сопоставление данных лизиса бактериальных клеток *E.coli* и *L.plantarum* в присутствии IL-2 и лизоцима. Если сравнить влияние разных бактериолитических факторов на один вид бактерий, то лизоцим разрушает *E.coli* в примерно 150 раз лучше, чем IL-2. Аналогичная ситуация наблюдается и для *L.plantarum*, лизоцим практически в 15 раз эффективнее разрушает бактерии *L.plantarum*, чем IL-2. Из этого можно сделать вывод о том, что бактерии *E.coli* и *L.plantarum* лучше разрушаются лизоцимом.

Аналогично можно сопоставить влияние одного бактериолитического фактора на разные виды бактерий. Если посмотреть на две последние строки в Таблице 2, то можно заметить, что IL-2 лизирует *E.coli* в полтора раза действеннее по сравнению с *L.plantarum*. А лизоцим в свою очередь в 15 раз лучше разрушает *E.coli* по сравнению с *L.plantarum*. Из всего вышесказанного можно сделать выводы, что оба бактериолитических фактора эффективнее лизируют бактериальные клетки *E.coli*.

Таким образом, в работе показано использование турбидиметрического метода для расчета скоростей лизиса бактериальных клеток (-dA/dt) (при лизисе бактерий оптическое поглощение бактериальной суспензии линейно зависит от количества КОЕ) и возможность количественного сравнения эффективности действия различных бактериолитических факторов на различные бактериальные субстраты.

Таблица 2 – Сопоставление удельной эффективности лизиса IL-2 и лизоцимом бактериальных клеток *E.coli* и *L.plantarum*

	E.coli	*L.plantarum*
A_{ini}	0,49	0,44
A_{min}	0	0,16
$[КОЕ]_0$, КОЕ×мл$^{-1}$	3,7×10^8	8,8×10^7
Лизис в присутствии IL-2		
-dA/dt, 10^{-3} опт.ед.×мин$^{-1}$	12,6	10,2
d[КОЕ]/dt, 10^5 КОЕ×мл$^{-1}$×мин$^{-1}$	95,1	32,1
dθ/dt, 10^{-3} опт.ед.×мин$^{-1}$	25,7	36,4
[E], 10^{-3} г/л	15	30
Λ_{IL-2}, л×опт.ед.×г$^{-1}$×мин$^{-1}$	1,7	1,2
Лизис в присутствии лизоцима		
-dA/dt, 10^{-3} опт.ед.×мин$^{-1}$	12,0	11,4
dθ/dt, 10^{-3} опт.ед.×мин$^{-1}$	24,5	40,7
[E], 10^{-3} г/л	0,1	2,5
$\Lambda_{лизоцим}$, л×опт.ед.×г$^{-1}$×мин$^{-1}$	245,0	16,3
Сравнение эффективности лизиса IL-2 и лизоцимом		
$\Lambda_{лизоцим}/\ \Lambda_{IL-2}$	141	13,5
$\Lambda_{IL-2}^{E.coli}/\Lambda_{IL-2}^{L.plantarum}$	1,45	
$\Lambda_{лизоцим}^{E.coli}/\Lambda_{лизоцим}^{L.plantarum}$	15,1	

4.3. Скрининг бактериолитической активности интерлейкина-2 и лизоцима на различных бактериальных клетках

Ранее было изучено, что IL-2 способен разрушать бактерии *Escherichia coli* и не проявляет активности относительно бактерий видов *Bacillus subtilis* и *Micrococcus luteus*, в отличие от лизоцима, который лизирует все перечисленные

виды бактерий. Поскольку IL-2 является одним из важнейших компонентов иммунной системы человека, для более широкого изучения субстратной специфичности были выбраны микроорганизмы, с которыми человек может контактировать в течение жизни: бактерии симбиотической микрофлоры и бактерии, обнаруживаемые при бактериальных инфекциях и в ранах.

В Таблицах 3 и 4 представлены результаты по изучению специфичности действия IL-2 и лизоцима по отношению к 36 видам микроорганизмов. Для каждого из видов бактерий, описанных в Таблице 3, были измерены зависимости начальной скорости лизиса от концентрации бактериолитического фактора и зависимости начальной скорости лизиса от pH в диапазоне от 5,5 до 10. В Таблице 3 для различных микроорганизмов приведены значения начальных скоростей лизиса в pH-оптимумах активности при таких концентрациях бактериолитических факторов, чтобы начальные скорости лизиса были сопоставимы.

Ввиду того, что в составе препарата Ронколейкин® находится додецилсульфат натрия (ДСН), была также проанализирована способность ДСН разрушать бактериальные клетки. В тех случаях, когда ДСН лизировал клетки в концентрациях, соизмеримых с добавляемым ДСН в составе препарата IL-2, учитывали поправку о наличии активности от ДСН (из скоростей лизиса IL-2 вычитали действие ДСН на данный вид бактерий). В Таблице 3 значения скоростей лизиса IL-2 для бактерий, разрушаемых как в присутствии IL-2, так и ДСН, даны с учетом поправки влияния ДСН на бактерии.

Было обнаружено, что IL-2 способен лизировать 8 видов микроорганизмов: *Bacillus megaterium* (подтверждено для 2 разных штаммов), *Bacillus mycoides, Bacillus cereus, Enterobacter aerogenes, Escherichia coli, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum, Serratia marcescens*. Лизоцим в свою очередь активен относительно 16 видов бактерий: *Alcaligenes faecalis, Bacillus megaterium* (подтверждено для 2 разных штаммов), *Bacillus mycoides, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Escherichia coli, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum, Micrococcus luteus, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa* (подтверждено для 2

Таблица 3 – Субстратная специфичность IL-2, лизоцима и ДСН

Микроорганизм	Скорость лизиса в присутствии		
	IL-2	лизоцим	ДСН
Acinetobacter baumanii	0	0	0
***Alcaligenes faecalis* КМ МГУ 82**	0	3,2/2,0/6,4	1,1/100/8,0
Bacillus megaterium	6,1/15/8,7	5,2/0,8/8,7	0
***Bacillus megaterium* КМ МГУ 17**	2,6/30/8,5	2,2/2,0/8,5	0
***Bacillus mycoides* КМ МГУ 31**	3,6/10/8,0	4,5/4,0/8,0	0,7/100/8,0
***Bacillus cereus* КМ МГУ 9**	0,9/30/8,5	4,5/4,0/8,5	0
Bacillus subtilis	0*	6/0,1/8,8*	0
Bifidobacterium bifidum	0	0	0
Citrobacter braakii	0	0	0
***Clostridium butyricum* КМ МГУ 19**	0	0	2,5/400/8,0
Corynebacterium amycolatum	0	0	0
Enterobacter aerogenes	7,8/2,0/6,4	0	0
Enterobacter cloacae	0	0	0,9/200/8,0
Enterococcus faecalis	0	0	1,9/50/8,0
Escherichia coli	12/15/8,8	12/0,1/8,5	0,5/150/8,0
Klebsiella pneumoniae	0	0	0
***Lactobacillus acidophilus* КМ МГУ 146**	2,9/5,0/7,0	3,2/0,8/7,0	2,4/50/8,0
***Lactobacillus casei* КМ МГУ 153**	0	0	0
Lactobacillus plantarum	9,5/30/7,0	11/2,5/6,7	0
***Lactococcus lactis* КМ МГУ 165**	0	0	0
Micrococcus luteus	0*	9/0,1/8,8*	0
Morganella morganii	0	0	2,0/40/8,0
Neisseria perflava	0	0	0
Proteus mirabilis	0	0	2,9/50/8,0
Proteus vulgaris	0	3,6/2,0/8,7	2,2/60/8,0
Pseudomonas aeruginosa	0	4,2/0,2/8,7	5,8/50/8,0
***Pseudomonas aeruginosa* КМ МГУ 47**	0	7,3/0,4/7,7	1,1/100/8,0
***Pseudomonas fluorescens* КМ МГУ 71**	0	3,5/0,5/8,4	0
Pseudomonas putida	0	0	2,5/200/8,0
Rothia mucilaginosa	0	0	0
***Serratia marcescens* КМ МГУ 208**	4,7/30/8,0	3,7/0,2/8,4	0
Staphylococcus aureus	0	0	6,2/50/8,0
***Staphylococcus aureus* КМ МГУ 144**	0	1,6/1,0/7,7	0
Staphylococcus capitis	0	0	0
Staphylococcus epidermidis	0	0	0
Staphylococcus haemolyticus	0	1,4/0,4/8,7	4,9/20/8,0
Staphylococcus lugdunensis	0	0	0
Stenotrophomonas maltophilia	0	0	3,3/150/8,0
Streptococcus agalactiae	0	4,6/5,0/7,0	4,1/50/8,0
Streptococcus pyogenes	0	0	0
Thermus aquaticus	0	0	3,6/125/8,0

Примечание. В таблице значения начальных скоростей лизиса даны в виде X/Y/Z, где X – скорость лизиса, 10^{-3} опт.ед.×мин$^{-1}$, Y – концентрация фактора, мкг×мл$^{-1}$, Z – pH буферной смеси для измерения активности. Для IL-2 и лизоцима значения скоростей лизиса даны в pH-оптимумах активности, все измерения с ДСН проводились при pH = 8,0. Нули в таблице означают, что вплоть до концентраций IL-2 50 мкг/мл, лизоцима – 5 мкг/мл и ДСН – 0,5 мг/мл оптическое поглощение бактериальной суспензии не изменялось в течение 3 минут после добавления бактериолитического фактора. Погрешность всех измерений, представленных в таблице, составляла не более 20%. * – согласно литературным данным [10].

Таблица 4 – Семейства и виды бактерий, подверженных лизису в присутствии IL-2 и лизоцима

Семейство	Вид	IL-2	Лизоцим
Alcaligenaceae	*Alcaligenes faecalis*	0	3,2/2,0/6,4
Bacillaceae	*Bacillus megaterium*	6,1/15/8,7	5,2/0,8/8,7
	Bacillus mycoides	3,6/10/8,0	4,5/4,0/8,0
	Bacillus cereus	0,9/30/8,5	4,5/4,0/8,5
	Bacillus subtilis	0*	6/0,1/8,8*
Enterobacteriaceae	*Enterobacter aerogenes*	7,8/2,0/6,4	0
	Escherichia coli	12/15/8,8	12/0,1/8,5
	Proteus vulgaris	0	3,6/2,0/8,7
	Serratia marcescens	4,7/30/8,0	3,7/0,2/8,4
Lactobacillaceae	*Lactobacillus acidophilus*	2,9/5,0/7,0	3,2/0,8/7,0
	Lactobacillus plantarum	9,5/30/7,0	11/2,5/6,7
Micrococcaceae	*Micrococcus luteus*	0*	9/0,1/8,8*
Pseudomonadaceae	*Pseudomonas aeruginosa*	0	4,2/0,2/8,7
	Pseudomonas fluorescens	0	3,5/0,5/8,4
Staphylococcaceae	*Staphylococcus aureus*	0	1,6/1,0/7,7
	Staphylococcus haemolyticus	0	1,4/0,4/8,7
Streptococcaceae	*Streptococcus agalactiae*	0	4,6/5,0/7,0

Примечание. В таблице значения начальных скоростей лизиса даны в виде X/Y/Z, где X – скорость лизиса, 10^{-3} опт.ед.×мин$^{-1}$, Y – концентрация фактора, мкг×мл$^{-1}$, Z – pH буферной смеси для измерения активности. Для IL-2 и лизоцима даны pH-оптимумы активности. Нули в таблице означают, что вплоть до концентраций IL-2 – 50мкг/мл и лизоцима – 5мкг/мл оптическое поглощение бактериальной суспензии не изменялось в течение 3 минут после добавления бактериолитического фактора. * – согласно литературным данным [10]. В таблице закрашенные розовым ячейки означают, что данный вид бактерий разрушается как в присутствии IL-2, так и лизоцима. Ячейки, закрашенные зеленым, означают, что данный вид бактерий лизируется в присутствии IL-2. Ячейки, закрашенные голубым, означают, что данный вид бактерий разрушается в присутствии лизоцима.

разных штаммов), *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Streptococcus agalactiae*. ДСН обладает наиболее широким спектром действия и разрушает 17 видов бактериальных клеток.

Таким образом, IL-2 проявляет активность относительно таких неродственных семейств бактерий, как Enterobacteriaceae, Bacillaceae, Lactobacillaceae (Таблица 4). Лизоцим разрушает микроорганизмы семейств Alcaligenaceae, Bacillaceae, Enterobacteriaceae, Lactobacillaceae, Micrococcaceae, Pseudomonadaceae, Staphylococcaceae, Streptococcaceae. Как можно видеть, спектры действия IL-2 и лизоцима имеют некоторые пересечения, однако значительно различаются как по семействам, так и по видам внутри одного семейства. Из всего выше сказанного можно сделать вывод о том, что механизмы действия IL-2 и лизоцима различаются.

В результате анализа литературных данных было обнаружено, что в пептидогликане большинства видов бактерий, лизируемых IL-2, присутствует одинаковый структурный компонент – диаминопимелиновая кислота (A2pm). Так в муреине грамотрицательных бактерий и у семейств *Bacillus*, *Lactobacillus* чаще всего в третьем положении белкового мостика находится A2pm [29].

Действительно сообщается, что в пептидогликан *Escherichia coli* и *Serratia marcescens* включена A2pm [387; 388]. При этом точных данных о составе пептидного мостика у *Enterobacter aerogenes* не было найдено.

Для семейства *Bacillus* также характерно наличие A2pm в составе муреина [389; 390; 391]. Однако для *Bacillus subtilis* было показано, что A2pm подвергается амидированию в процессе синтеза пептидогликана этих бактерий [392; 393]. Ранее было установлено, что *Bacillus subtilis* не подвергается лизису в присутствии IL-2 [10]. Что может говорить в пользу гипотезы о A2pm, как о потенциальном сайте действия IL-2.

По литературным данным среди изученных в работе *Lactobacillus* A2pm есть только у *Lactobacillus plantarum*, при этом для *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* в третьем положении пептидного мостика характерно наличие

L-лизина [394; 395]. Несмотря на это, можно предположить, что некоторые штаммы *Lactobacillus acidophilus* могут содержать A2pm. Все вышеперечисленное подтверждает гипотезу о том, что A2pm может быть потенциальной мишенью для действия IL-2.

В литературе описано, что у *Staphylococcus* (в том числе у *S.aureus, S.capitis, S.epidermidis, S.haemolyticus, S.lugdunensis*), *Streptococcus pyogenes* и *Micrococcus luteus* (все перечисленные не лизируются IL-2) в третьем положении пептидного мостика находится L-лизин [397 – 400]. Данный факт может подтверждать гипотезу о A2pm как о потенциальном сайте действия IL-2.

Некоторые грамотрицательные бактерии (*Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa*) не разрушаются в присутствии IL-2. Хотя в литературе описано, что такие бактериальные клетки содержат A2pm в пептидогликановом остове [401; 402; 403].

В целом на данный момент преждевременно делать однозначный вывод о диаминопимелиновой кислоте, как о потенциальном месте разрыва связей в пептидогликане под действием IL-2, либо как о потенциальном месте связывания IL-2 с клеточной стенкой бактерий. Существуют как подтверждения данной гипотезы, так и примеры противоречащие этому предположению. Клеточная стенка подвергается постоянному изменению в процессе жизнедеятельности бактерии и может меняться в зависимости от фазы жизненного цикла бактерии, наличия капсулы, спорообразования и других факторов. Кроме того действие бактериолитического фактора (если предположить, что пептидный мостик является мишенью его действия) может зависеть от положения связи между мономерными звеньями пептидогликана (Рисунок 7). Следует отметить, что даже для наиболее изученного бактериолитического фактора – лизоцима до сих пор ведутся споры о его точном механизме действия, как описано в разделе 2.2 Лизоцим. В данной работе описан спектр бактерий, подверженных лизису в присутствии IL-2 и лизоцима, что поможет при дальнейшем изучении механизма действия данных факторов.

4.4. Зависимость начальной скорости лизиса от pH в присутствии интерлейкина-2, лизоцима и додецилсульфата натрия для различных видов бактериальных клеток

На Рисунках 28–30 представлены зависимости начальных скоростей лизиса бактерий от pH для IL-2 и лизоцима. Также на Рисунке 31 показана зависимость скорости лизиса от pH в присутствии IL-2 для бактерий *E.aerogenes*, которые разрушаются только в присутствии IL-2, а лизоцим не лизирует данный вид бактерий. Как видно из графиков (Рисунок 28), pH-оптимумы активности IL-2 и лизоцима относительно бактерий *L.plantarum* близки (7,0 и 6,7 соответственно). Аналогичная ситуация наблюдается для *E.coli*, pH-оптимумы IL-2 и лизоцима составляют 8,8 и 8,5.

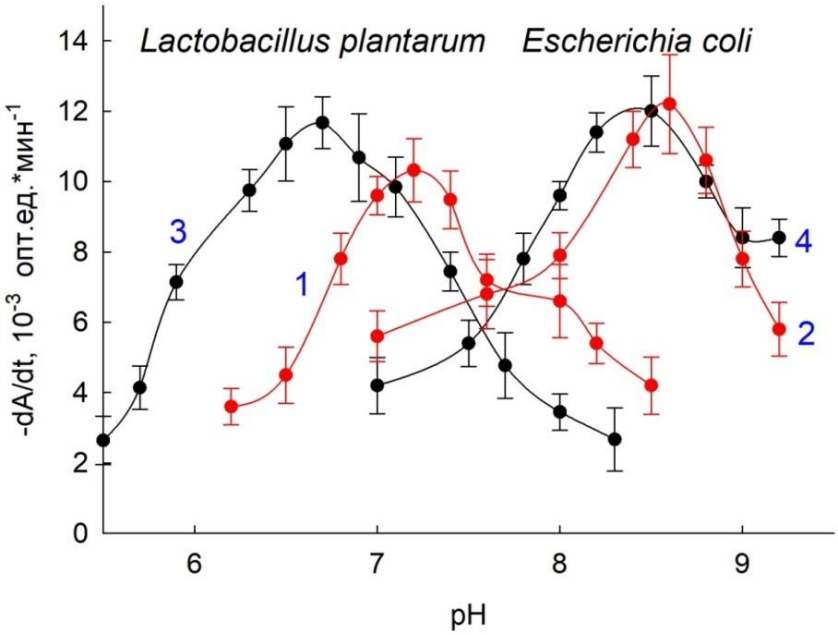

Рисунок 28 – Зависимость начальной скорости лизиса бактерий *E.coli* и *L.plantarum* от pH в присутствии IL-2 и лизоцима. 1 – IL-2, 30 мкг/мл, *L.plantarum*; 2 – IL-2, 15 мкг/мл, *E.coli*; 3 – лизоцим, 2,5 мкг/мл, *L.plantarum*; 4 – лизоцим, 0,1 мкг/мл, *E.coli*

В случае микроорганизма *L.acidophilus* (Рисунок 29) pH-оптимумы IL-2 и лизоцима также близки (6,5–7,0 и 6,7–7,2). Подобная картина наблюдается и для *S.marcescens*, где pH-оптимумы IL-2 и лизоцима находятся при pH=8,0 и pH=8,4 соответственно.

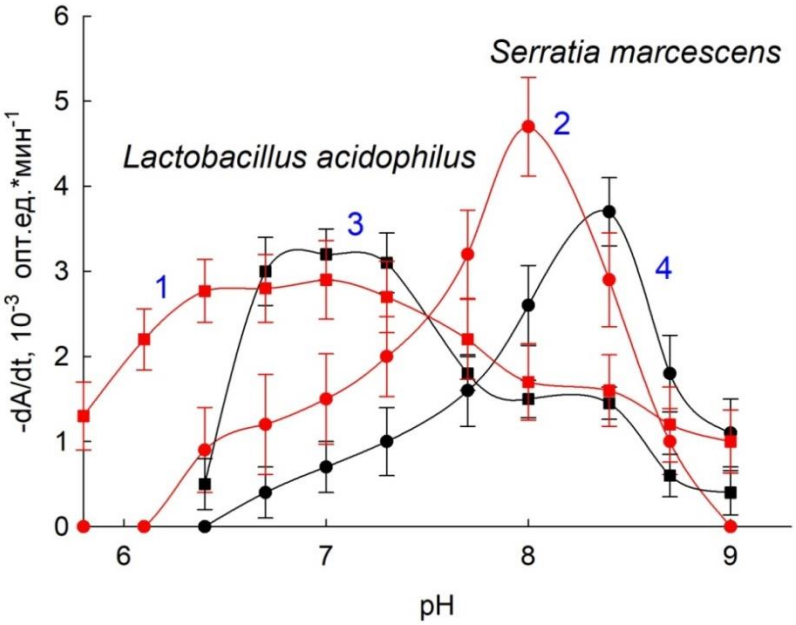

Рисунок 29 – Зависимость начальной скорости лизиса бактерий *L.acidophilus* и *S.marcescens* от pH в присутствии IL-2 и лизоцима. 1 – IL-2, 5 мкг/мл, *L.acidophilus*; 2 – IL-2, 30 мкг/мл, *S.marcescens*; 3 – лизоцим, 0,8 мкг/мл, *L.acidophilus*; 4 – лизоцим, 0,2 мкг/мл, *S.marcescens*

Кроме того схожая ситуация наблюдается и для различных видов семейства Bacillaceae, изученных в данной работе (на Рисунке 30 представлены зависимости для бактерий *B.megaterium*; зависимости для *B.mycoides* и *B.cereus* не представлены, ввиду их сходства с зависимостями для *B.megaterium*). Из всего выше сказанного можно заключить, что pH-оптимумы активности IL-2 и лизоцима в значительной степени определяются бактериями-субстратом, на которые действуют данные бактериолитические факторы.

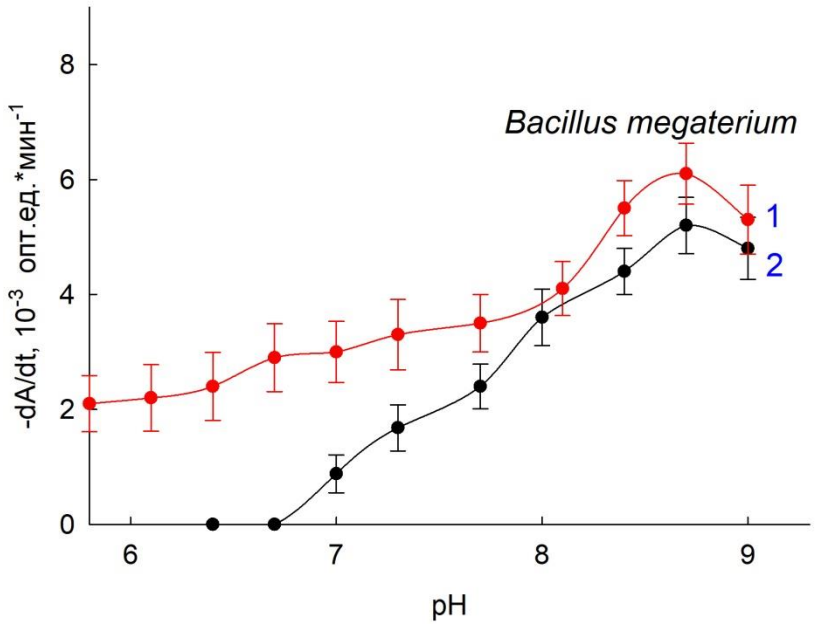

Рисунок 30 – Зависимость начальной скорости лизиса бактерий *B.megaterium* от pH в присутствии IL-2 и лизоцима. 1 – IL-2, 15 мкг/мл; 2 – лизоцим, 0,8 мкг/мл

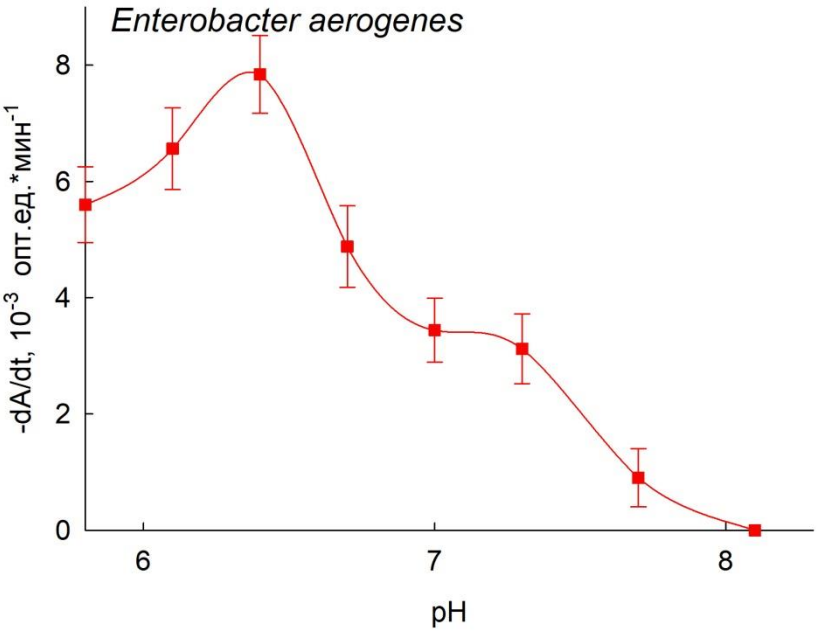

Рисунок 31 – Зависимость начальной скорости лизиса бактерий *E.aerogenes* от pH в присутствии IL-2. IL-2, 2 мкг/мл

На Рисунке 32 представлены зависимости скорости лизиса от pH в присутствии лизоцима для пяти микроорганизмов, которые не разрушаются при добавлении IL-2. Как опять можно заметить, значение pH-оптимума действия лизоцима в значительной мере зависит от клеток-субстрата.

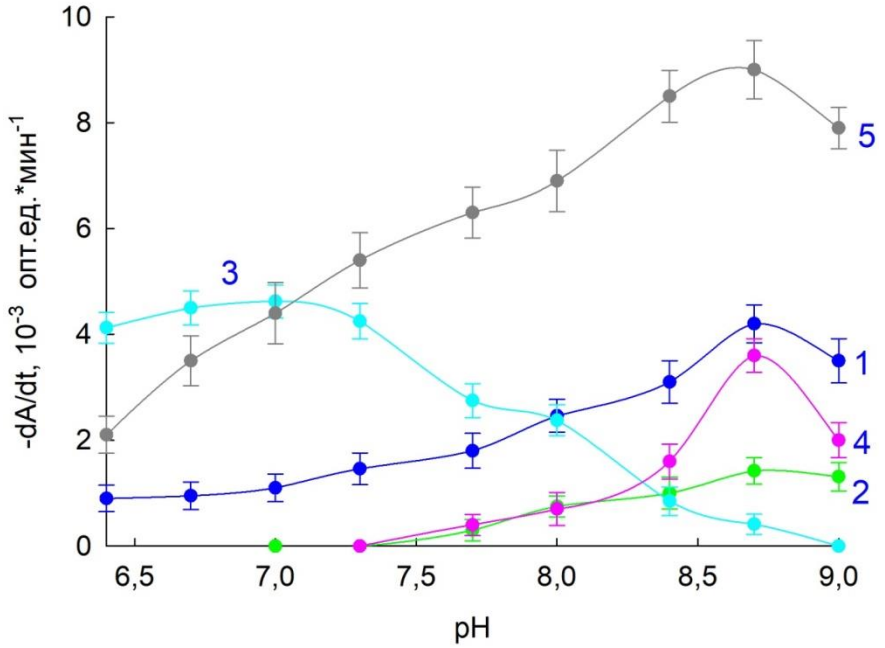

Рисунок 32 – Зависимость начальной скорости лизиса бактерий от pH в присутствии лизоцима. 1 – *P.aeruginosa*, 0,2 мкг/мл; 2 – *S.haemolyticus*, 0,4 мкг/мл; 3 – *S.agalactiae*, 5 мкг/мл; 4 – *P.vulgaris*, 2 мкг/мл; 5 – *M.luteus*, 0,1 мкг/мл

На Рисунке 33 представлены зависимости скорости лизиса от pH в присутствии ДСН для 5 видов бактерий разных семейств. Для остальных 12 видов микрорганизмов, разрушающихся в присутствии ДСН, зависимости имеют аналогичный характер. Можно заметить, что ДСН более эффективно лизирует бактериальные клетки при pH больше 7,5 вне зависимости от семейства данных микроорганизмов.

Возможно, такое проявление активности ДСН связано с pK фосфатных групп фосфолипидов на поверхности клеточных стенок бактерий. Так сообщается, что pK фосфатных групп кардиолипина принадлежит интервалу 7,5 – 9,5 (Рисунок 34) [404; 405]. А pK фосфатных групп фосфатидилинозитола составляют pK = 6 – 8 [406]. Оба этих фосфолипида содержатся в клеточной

мембране как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, при этом 25% всех липидов клеточной мембраны являются кардиолипинами, а содержание фосфатидилинозитола в клеточной мембране составляет порядка 10% от общего числа липидов в клеточной мембране [407; 408]. Однако выяснение точной причины такого характера бактериолитической активности ДСН выходит за рамки данной работы.

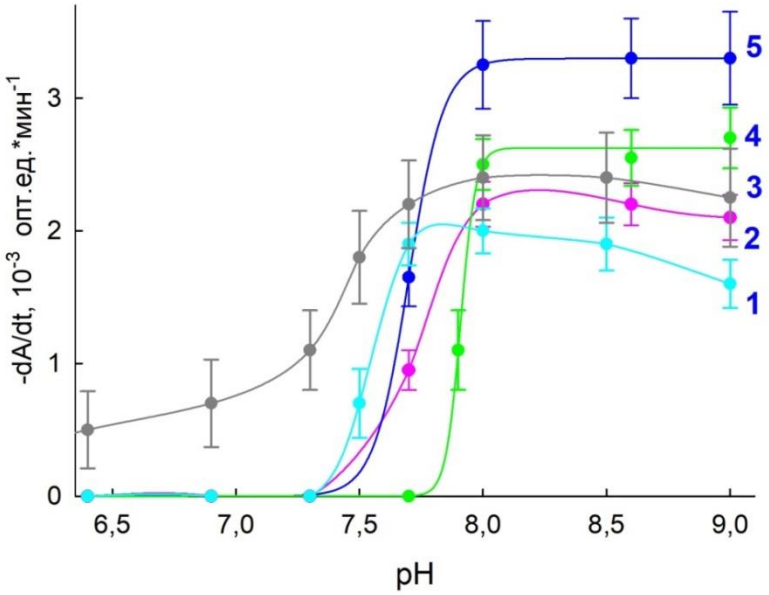

Рисунок 33 – Зависимость начальной скорости лизиса бактерий от pH в присутствии ДСН. 1 – *M.morganii*, 40 мкг/мл; 2 – *P.vulgaris*, 60 мкг/мл; 3 – *L.acidophilus*, 50 мкг/мл; 4 – *P.putida*, 200 мкг/мл; 5 – *S.maltophilia*, 150 мкг/мл

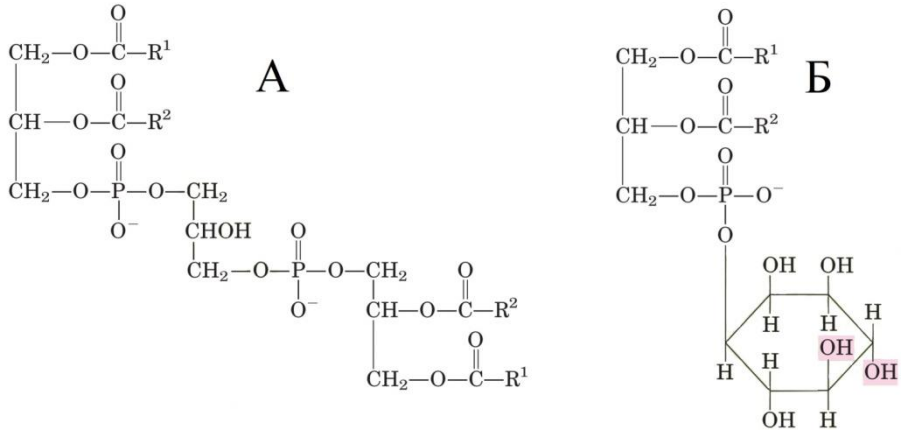

Рисунок 34 – А – кардиолипин, Б – фосфатидилинозитол; R1, R2 – жирные кислоты; розовым выделены гидроксогруппы, которые могут быть заменены на фосфатные группы [409]

4.5. Зависимость начальной скорости лизиса бактерий *E.coli* и *L.plantarum* от инной силы в присутствии интерлейкина-2 и лизоцима

Для дальнейшего изучения бактериолитических свойств IL-2 и лизоцима были выбраны бактерии вида *Escherichia coli* (как типичного представителя грамотрицательных бактерий) и бактерии вида *Lactobacillus plantarum* (как типичного представителя грамположительных бактерий). На Рисунке 35 представлено сравнение влияния ионной силы реакционной смеси на активность IL-2 и лизоцима при действии на микроорганизмы *E.coli* и *L.plantarum*. Можно заметить, что при увеличении ионной силы в реакционной смеси происходит снижение активности как IL-2, так и лизоцима относительно обоих видов бактерий. Уже при концентрации 0,03 М NaCl скорость лизиса IL-2 снижается вдвое, в случае лизоцима при такой концентрации NaCl (0,03М) активность лизоцима меняется незначительно. Только при увеличении концентрации NaCl до 0,06 М скорость лизиса лизоцимом падает практически в два раза. Следовательно, можно заключить, что IL-2 в большей степени чувствителен к повышению ионной силы, по сравнению с лизоцимом. Аналогичная ситуация описана при действии интерлейкина-2 из плазмы крови барана на *E.coli*, где скорость лизиса также падала в значительной степени при увеличении концентрации NaCl до 0,03 М [9].

Согласно литературным данным, увеличение ионной силы реакционной смеси приводит к уменьшению скорости лизиса бактерий *E.coli* и *L.plantarum* при действии лизоцима [171; 182]. Подобный эффект описан при действии интерлейкина-2 из плазмы крови барана на бактериальные клетки *E.coli* [9]. Такое явление уменьшения скорости лизиса при увеличении ионной силы реакционной смеси можно объяснить уменьшением скорости осмотического разрыва клетки.

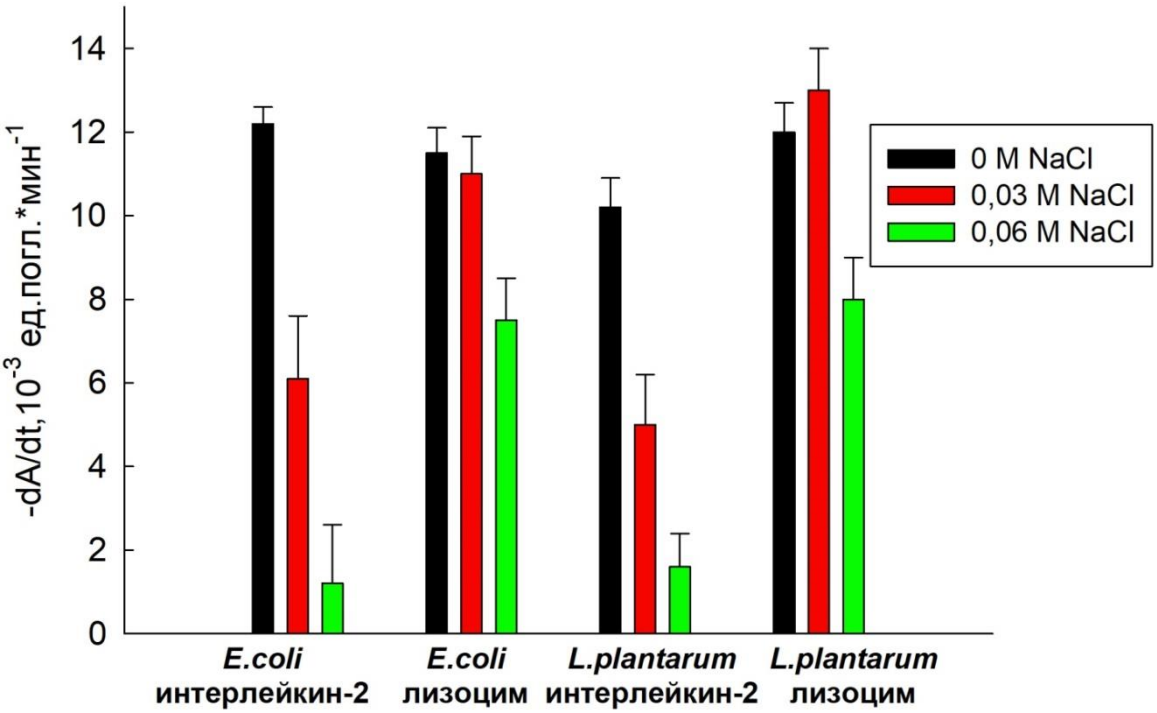

Рисунок 35 – Зависимость начальной скорости лизиса бактерий *E.coli* и *L.plantarum* в присутствии IL-2 и лизоцима от ионной силы раствора. *E.coli* и IL-2, 15 мкг/мл, pH = 8,5; *E.coli* и лизоцим, 0,1 мкг/мл, pH = 8,5; *L.plantarum* и IL-2, 30 мкг/мл, pH = 7,0; *L.plantarum* и лизоцим, 2,5 мкг/мл, pH = 7,0

4.6. Влияние потенциальных эффекторов на активность интерлейкина-2 и лизоцима для бактерий *E.coli*

Для дальнейшего детального исследования влияния низкомолекулярных эффекторов на активность IL-2 и лизоцима был выбран модельный субстрат – бактериальные клетки *E.coli,* поскольку *E.coli* разрушаются в присутствии обоих исследуемых в работе бактериолитических факторов (как IL-2, так и лизоцима); и процесс культивирования бактерий данного вида представляется менее трудоемким, по сравнению с другими видами бактерий, исследованными в данной работе. Кроме того *E.coli* является одним из наиболее изученных видов бактерий. *E.coli* – типичный представитель грамотрицательных бактерий похожий на

распространенные патогены (такие как *Shigella* spp и *Salmonella* spp), при этом работа с данным микроорганизмом относительно безопасна. В качестве потенциальных эффекторов были выбраны: аминокислоты, биогенные амины, антибиотики и комплексообразователь (ЭДТА).

На Рисунке 36 изображены зависимости влияния глицина, лизина, аргинина и глутамата на активность бактериолитических факторов. Активность IL-2 не меняется при добавлении как глицина (Рисунок 36А), так и лизина (Рисунок 36Б). При этом для лизоцима зависимости от глицина и лизина имеют максимум активности при концентрациях 0,5–1 мМ и 15–18 мМ эффектора соответственно. Поскольку глицин и лизин по-разному влияют на активность IL-2 и лизоцима, можно предположить, что механизмы действия бактериолитических факторов различаются. Эффект увеличения активности лизоцима в присутствии глицина не описан в литературе. Несмотря на это, в литературе описаны бактериостатические свойства глицина, как описано в разделе 2.8. Низкомолекулярные эффекторы, потенциально влияющие на лизис бактериальных клеток [339; 340].

Аргинин (Рисунок 36В) в свою очередь значительно увеличивает активность как IL-2, так и лизоцима при концентрациях больше 10мМ. Известно, что аргинин способен препятствовать агрегации белков [410; 411]. Возможно, данный факт объясняет увеличение активности обоих бактериолитических факторов. Значительные отличия в эффекте действия двух положительно заряженных аминокислот (лизина и аргинина) можно объяснить различными полярностями и геометрией боковых цепей данных аминокислот, которые могут быть существенны при связывании лизина и аргинина с поверхностью клетки или белковой глобулы.

Глутамат (Рисунок 36Г), подобно аргинину, увеличивает активность как IL-2 (в три раза), так и лизоцима (в два раза) при концентрациях больше 15мМ. Аналогичное влияние глутамата на IL-2 и лизоцим может быть связано с образованием комплекса между положительно заряженными аминокислотами на поверхности белков и глутаматом, вследствие чего уменьшается непродуктивная сорбция факторов на поверхности бактерий.

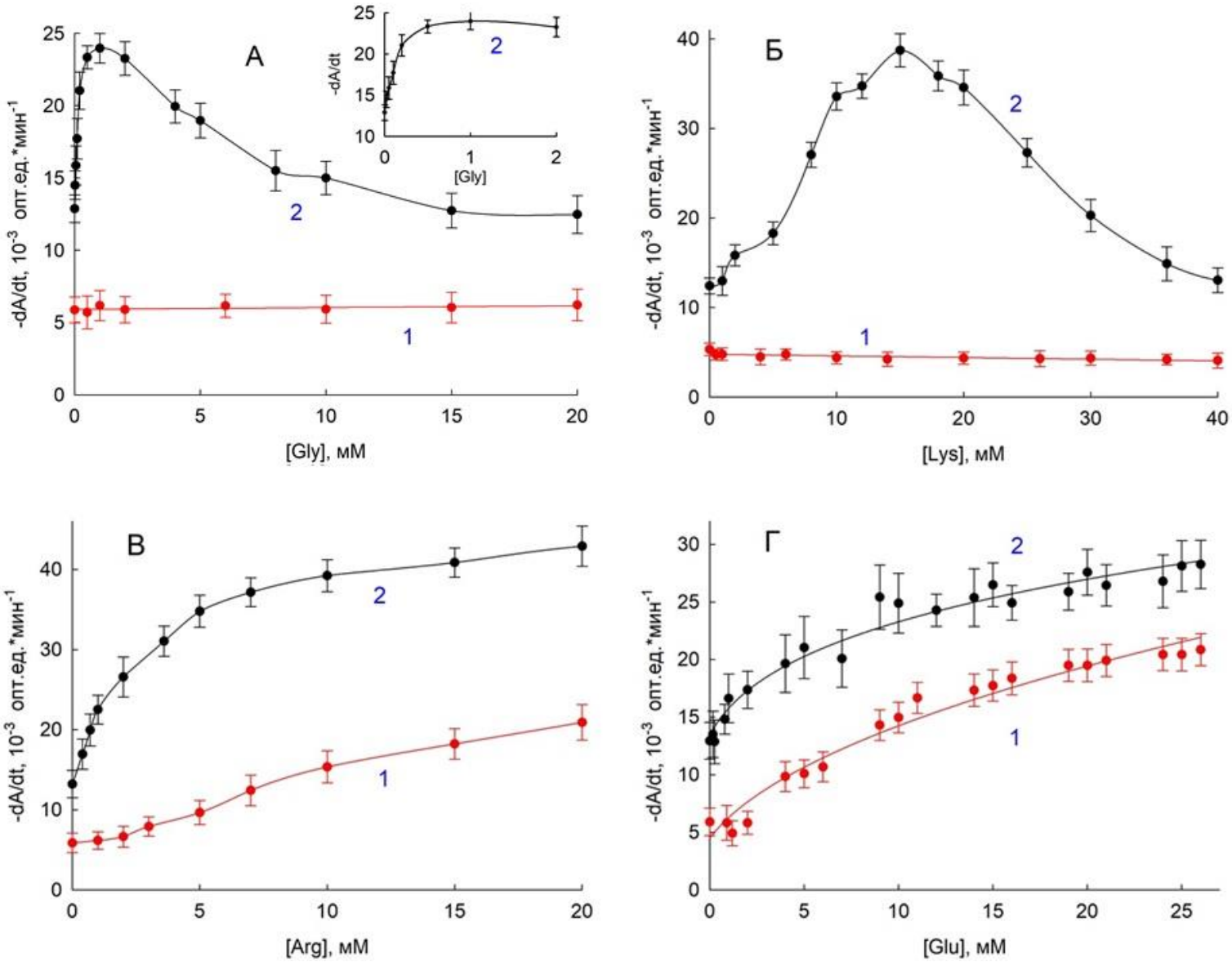

Рисунок 36 – Зависимость начальной скорости лизиса IL-2 и лизоцимом от концентрации глицина (А), лизина (Б), аргинина (В), глутамата (Г). 1 – IL-2, 15 мкг/мл, pH = 8,8; 2 –лизоцим, 0,1 мкг/мл, pH = 8,5

Ароматические аминокислоты (тирозин, триптофан и фенилаланин) в пределах погрешности эксперимента практически не влияют на лизис IL-2 и лизоцимом (Рисунок 37). Для тирозина (Рисунок 37А) активности IL-2 и лизоцима измерены в узком диапазоне концентраций аминокислоты вследствие низкой водорастворимости тирозина. Совершенно иная картина влияния эффекторов наблюдается при переходе от ароматических аминокислот (Рисунок 37А–В) к ароматическим биогенным аминам (триптамину и тирамину) (Рисунок 37).

Показано, что тирамин (Рисунок 37Г) способен увеличивать бактериолитическую активность IL-2 вдвое при концентрациях выше 5 мМ, при этом не влияя на действие лизоцима. Триптамин (Рисунок 37Д) в свою очередь активирует IL-2, увеличивая скорость лизиса бактерий IL-2 более чем в два раза при концентрациях больше 0,6 мМ. Однако лизоцим ингибируется в присутствии триптамина, уже при концентрации триптамина 0,6 мМ активность лизоцима снижается на 30%. Триптамин аналогично тирозину обладает низкой водорастворимостью, поэтому активность бактериолитических факторов измерена в узком диапазоне концентраций триптамина. Такие различия во влиянии на активность бактериолтических факторов могут говорить в пользу различных механизмов действия IL-2 и лизоцима. Известно, что глобула IL-2 имеет множество гидрофобных участков, поэтому IL-2 потенциально способен связываться с гидрофобными лигандами. Например, в литературе описано связывание IL-2 с мышиными антителами против IL-2 человека посредством гидрофобных взаимодействий [412]. Также было установлено, что область связывания IL-2 с его рецептором имеет гидрофобные участки [413]. Кроме того описана возможность включения IL-2 в липосомы, состоящие из дипальмитоилфосфатидилхолина, также посредством взаимодействия IL-2 с гидрофобными участками фосфолипида [414].

Возможно, тирамин и триптамин посредством гидрофобных взаимодействий связываются с IL-2 и тем самым препятствуют непродуктивной адсорбции белка на поверхности клетки. В случае лизоцима связывание триптамина может приводить к изменению конформации белка и его

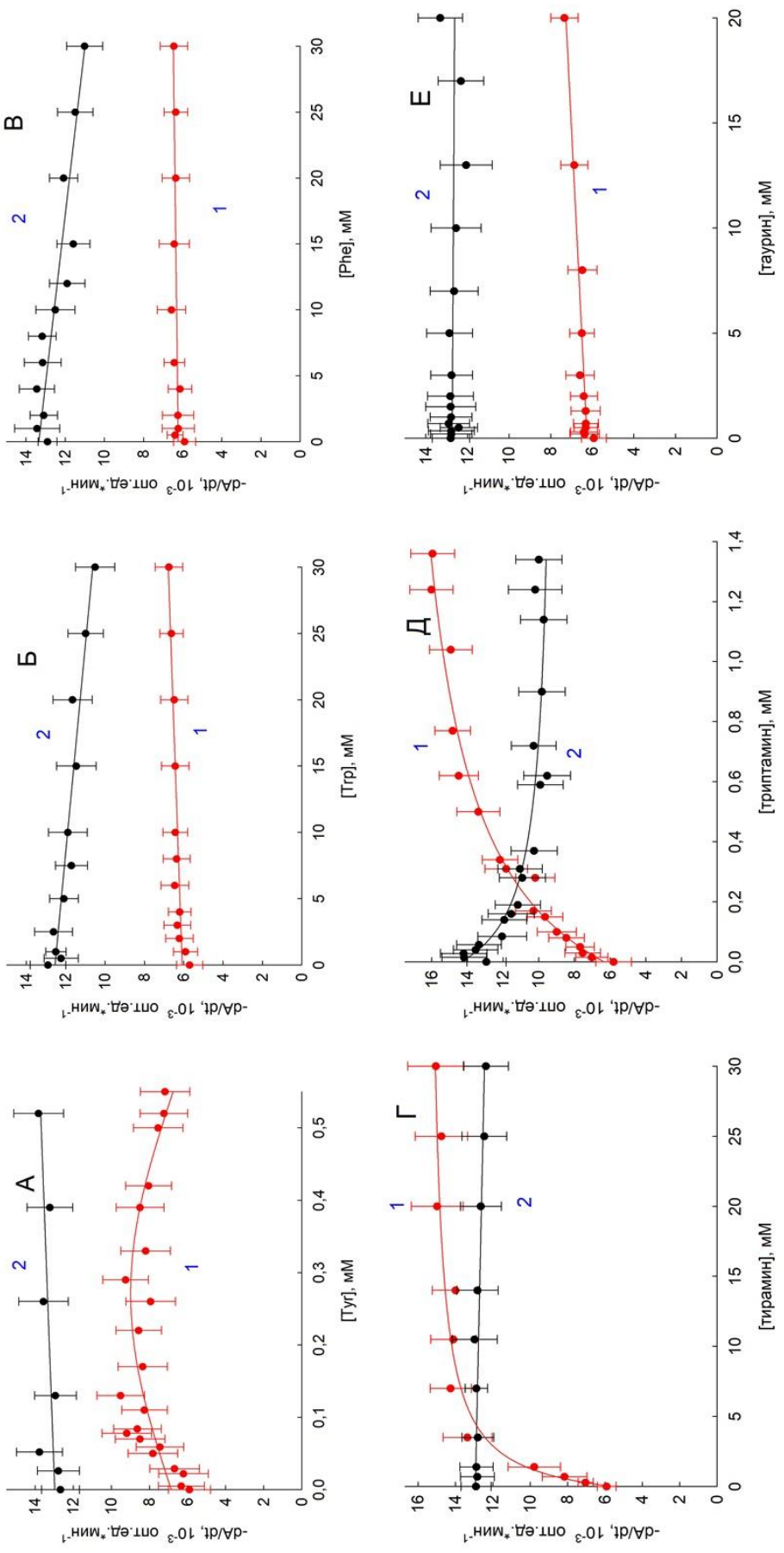

Рисунок 37 – Зависимость начальной скорости лизиса IL-2 и лизоцимом от концентрации тирозина (А), триптофана (Б), фенилаланина (В), тирамина (Г), триптамина (Д), таурина (Е). 1 – IL-2, 15 мкг/мл, pH = 8,8; 2 – лизоцим, 0,1 мкг/мл, pH = 8,5

инактивации. На Рисунке 37 также представлены зависимости в присутствии таурина (Рисунок 37Е), который не влияет на активность как IL-2, так и лизоцима.

На Рисунке 38 показаны зависимости активности IL-2 и лизоцима в присутствии антибиотиков: полимиксина В (Рисунок 38А) и бацитрацина (Рисунок 38Б). Для антибиотиков наблюдается схожая картина – зависимости с максимумом активности при концентрации антибиотика 4–7 мкМ как для IL-2, так и для лизоцима. Бацитрацин и полимиксин В обладают бактериостатическим действием (предотвращают размножение бактерий) [377; 380] и не способны самостоятельно лизировать бактерии [163]. При этом ранее было показано, что полимиксин М способен увеличивать бактериолитическую активность эндолизина, выделенного из фага SPZ7, по отношению к бактериям *Salmonella enteritidis* [163]. Возможно, антибиотики, связываясь с клеткой, увеличивают чувствительность бактерий к действию бактериолитических факторов.

Как видно из Рисунка 38В, милдронат увеличивает активность IL-2 (максимум при 2–4 мМ милдроната) и не влияет на активность лизоцима. Милдронат является структурным аналогом L-карнитина и γ-бутиробетаина и препятствует дальнейшему превращению и транспорту этих веществ в организме человека, ингибируя ферменты γ-бутиробетаингидролазу и L-карнитинацетилтрансферазу. Можно предположить, что милдронат способен связываться с IL-2 и изменять конформацию белка, приводя к увеличению бактериолитической активности IL-2. На Рисунке 38 также приведено влияние комплексообразующего агента ЭДТА (Рисунок 38Г) на активность IL-2 и лизоцима. При концентрациях ЭДТА больше 0,1 мМ активность обоих бактериолитических факторов значительно возрастает (для IL-2 в два раза, для лизоцима в три раза). Данный эффект вероятнее всего связан с деструктивным действием ЭДТА на клетку. Так ЭДТА может образовывать хелатные комплексы с ионами Ca^{2+}, находящимися на поверхности клетки, чем будет дестабилизировать клетку бактерии.

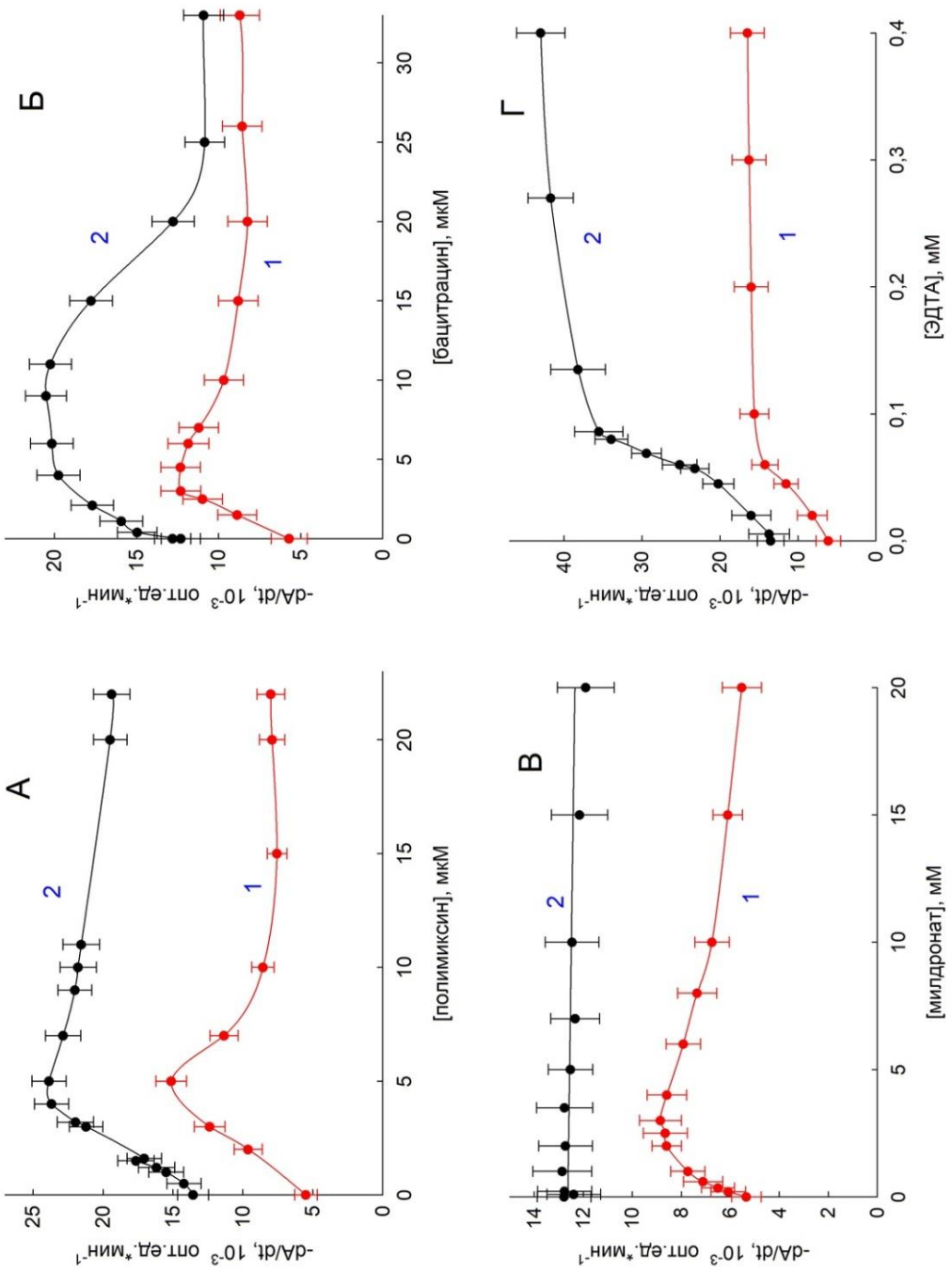

Рисунок 38 – Зависимость начальной скорости лизиса IL-2 и лизоцимом от концентрации полимиксина (А), бацитрацина (Б), милдроната (В), ЭДТА (Г). 1 – IL-2, 15 мкг/мл, pH = 8,8; 2 –лизоцим, 0,1 мкг/мл, pH = 8,5

Из всего выше сказанного можно заключить, что в связи с различным влиянием эффекторов на IL-2 и лизоцим вероятнее всего механизмы бактериолитического действия этих белков различаются (Таблица 5). В дальнейшем эффекторы, увеличивающие бактериолитическую активность, можно использовать при разработке новых лекарственных средств на основе IL-2 и лизоцима.

Таблица 5 – Влияние различных низкомолекулярных эффекторов на действие IL-2 и лизоцима

Эффектор	**IL-2**		**Лизоцим**	
	Эффект	Вид зависимости	Эффект	Вид зависимости
Glu	+300% / 15 мМ	С насыщением	+200% / 15 мМ	С насыщением
Arg	+200% / 10 мМ	С насыщением	+300% / 10 мМ	С насыщением
Gly	Не влияет	Нет зависимости	+200% / 0,5-1 мМ	С максимумом
Lys	Не влияет	Нет зависимости	+300% / 15-18 мМ	С максимумом
Tyr	Не влияет	Нет зависимости	Не влияет	Нет зависимости
Trp	Не влияет	Нет зависимости	Не влияет	Нет зависимости
Phe	Не влияет	Нет зависимости	Не влияет	Нет зависимости
Тирамин	+200% / 5 мМ	С насыщением	Не влияет	Нет зависимости
Триптамин	+250% / 0,6 мМ	С насыщением	-30% / 0,6 мМ	Нет зависимости
Таурин	Не влияет	Нет зависимости	Не влияет	Нет зависимости
Милдронат	+80% / 2-4 мМ	С максимумом	Не влияет	Нет зависимости
Полимиксин	+300% / 4-7 мкМ	С максимумом	+170% / 4-7 мкМ	С максимумом
Бацитрацин	+240% / 4-7 мкМ	С максимумом	+170% / 4-7 мкМ	С максимумом
ЭДТА	+200% / 0,1мМ	С насыщением	+300% / 0,1 мМ	С насыщением

Примечание. В таблице результаты представлены в виде X/Y, где X – увеличение или уменьшение активности бактериолитического фактора в процентах; Y – концентрация эффектора, при которой обнаруживается увеличение или уменьшение активности бактериолитического фактора. Все эффекторы при добавлении к бактериальной суспензии не вызывали уменьшения оптического поглощения бактериальной суспензии в течение 10 минут.

4.7. Адсорбция интерлейкина-2 на поверхности клеток *E.coli*

Как было сказано ранее (раздел 2.6. Адсорбция бактериолитических факторов на поверхности бактериальных клеток данной работы), во время лизиса бактерий значительная часть бактериолитического фактора может находиться в связанном с поверхностью клетки состоянии. Нами был изучен процесс адсорбции IL-2 на поверхности бактерий *E.coli*. На Рисунке 39 изображены изотермы адсорбции IL-2 при двух значениях pH (при pH-оптимуме активности IL-2 и физиологическом значении pH), полученные данные были успешно аппроксимированы уравнениями изотермы Лэнгмюра.

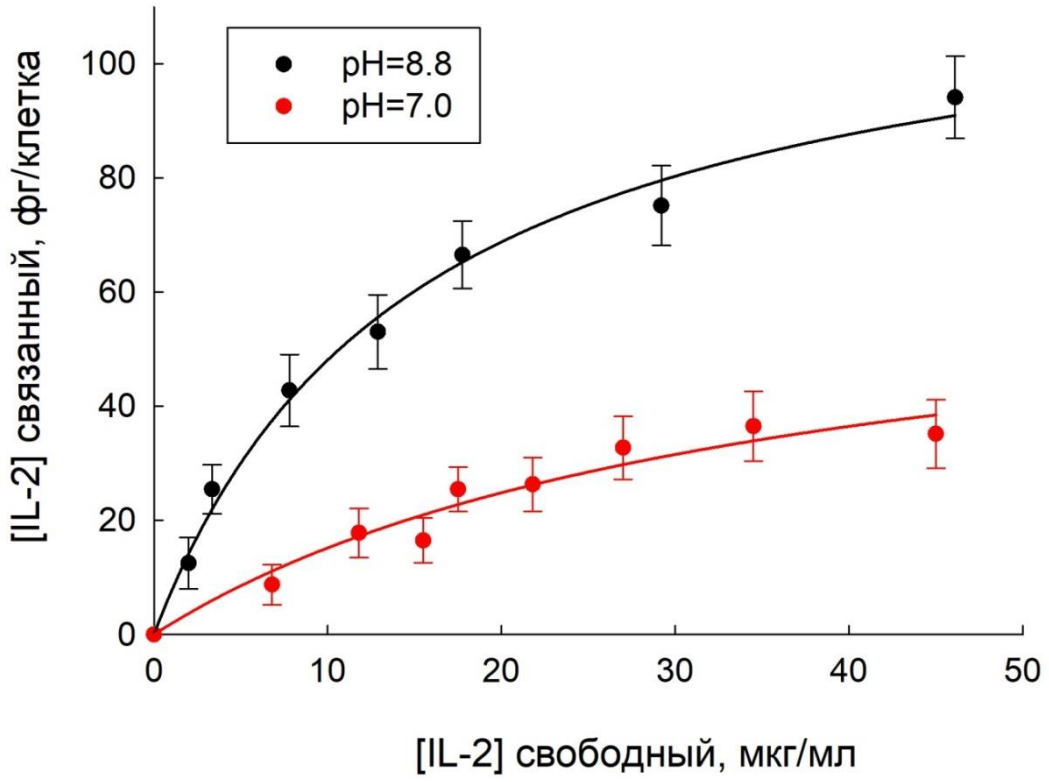

Рисунок 39 – Изотермы адсорбции IL-2 на поверхности бактерий *E.coli* при разных значениях pH. pH = 7,0; 8,8

Из полученных зависимостей были найдены значения констант десорбции и сорбционных емкостей при различных значениях pH (Таблица 6). Как можно заметить, при увеличении значения pH до pH-оптимума активности IL-2 (pH =

8,8) сорбционная емкость возрастает. Данный факт может говорить о том, что в pH-оптимуме преобладает продуктивное связывание IL-2 с клеткой. При этом константа десорбции в pH-оптимуме (pH = 8,8) меньше, чем при pH = 7,0, соответственно при pH = 8,8 IL-2 связывается с поверхностью бактериальных клеток прочнее, чем при pH = 7,0.

Таблица 6 – Сорбционные характеристики IL-2 при связывании с клетками *E.coli* при разных значениях pH

pH	K_d, 10^{-6} M	Сорбционнная емкость, фг/клетка
8,8	1,0±0,2	121±7
7,0	2,3±0,3	35±3

Примечание. Изотермы адсорбции (Рисунок 38) аппроксимировали уравнением изотермы Лэнгмюра: $\Gamma = \frac{\Gamma_{max}[E]}{K_d+[E]}$, где Г – количество связанного фермента, Γ_{max} – максимальное количество связанного фермента (сорбционная емкость), [E] – количество свободного фермента, K_d – константа десорбции. Из уравнения изотермы Лэнгмюра определили сорбционные характеристики данной системы при pH = 7,0; 8,8

Если сравнивать сорбционные характеристики IL-2 с лизоцимом в pH-оптимуме на поверхности бактерий *E.coli*, то для лизоцима сорбционная емкость больше в пять раз по сравнению с IL-2 ((644±10) фг/клетка [149] против (121±7) фг/клетка для IL-2). Лизоцим обладает меньшей константой десорбции, чем IL-2 ((1,2±0,4)×10^{-7} M [149] по сравнению с (1,0±0,2)×10^{-6} M соответственно). Все выше перечисленное говорит о том, что на клетках *E.coli* количество подцентров связывания с лизоцимом больше, чем с IL-2, и для лизоцима характерно более прочное связывание с поверхностью клеток.

Как было показано ранее ДСН способен разрушать бактериальные клетки. В Таблице 7 приведено влияние ДСН на связывание IL-2 с клетками *E.coli*. Из таблицы видно, что при добавлении ДСН в реакционную смесь количество связанного IL-2 возрастает, и уже при концентрации ДСН 0,3 мг/мл в растворе не

остается свободного IL-2. Таким образом, ДСН увеличивает сродство IL-2 к поверхности клеток *E.coli*.

Таблица 7 – Влияние ДСН на связывание IL-2 pH=8,8

ДСН, мг/мл	[IL-2]свободный, мкг/мл	[IL-2]связанный, фг/клетка
0	16±3	66±3
0,05	15±3	67±3
0,1	8±2	76±2
0,3	0	85±5

Примечание. Эксперимент проводили согласно Рисунку 24, при этом на первом этапе в реакционную смесь дополнительно добавляли ДСН до концентраций 0,05, 0,1 и 0,3 мг/мл. Начальная концентрация IL-2 составляла 70 мкг/мл, а начальная концентрация бактерий *E.coli* – $(8,2\pm1,1)\times10^8$ КОЕ/мл.

5. Выводы:

1. Доказана правомерность и корректность использования метода турбидиметрии для определения скоростей лизиса бактериолитических факторов на живых целых бактериях. Показано, что производная количества КОЕ (колониеобразующих единиц) по времени пропорциональна производной оптического поглощения бактериальной суспензии по времени.

2. Определена субстратная специфичность интерлейкина-2 человека на живых бактериях. Обнаружено, что интерлейкин-2 человека эффективно разрушает только те бактерии, которые имеют диаминопимелиновую кислоту в составе полимера клеточной стенки, а именно бактерии семейств энтеробактерий, бацилл и лактобацилл. Лизоцим, в отличие от интерлейкина-2 человека, обладает более широкой субстратной специфичностью.

3. Выявлены низкомолекулярные вещества, которые увеличивают бактериолитическую активность в два-три раза в концентрациях, достигаемых в реальных физиологических условиях. Общими активаторами и интерлейкина-2, и лизоцима являются глутамат и аргинин. Милдронат является активатором только для интерлейкина-2. Лизин и глицин являются активаторами только для лизоцима. Способность активаторов влиять на антибактериальные свойства собственных бактериолитических факторов человека демонстрирует ранее неизвестную их роль в иммунитете, указывая возможный путь разработки новых высокоэффективных лекарственных композиций.

Список сокращений и условных обозначений

IL-2 – интерлейкин-2 человека

NAG – N-ацетилглюкозамин

NAM – N-ацетилмурамовая кислота

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

IFN – интерферон

TNF – фактор некроза опухоли

NK – естественные киллеры

DC – дендритные клетки

IL-2R – рецептор интерлейкна-2 человека

КОЕ – колониеобразующие единицы

ГАФД – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

NADH – никотинамиддинуклеотид, восстановленная форма

ПЦР – полимеразная цепная реакция

A_{ini} – начальная оптическая плотность суспензии

A_t – оптическая плотность суспензии в момент времени t от начала лизиса

A_{min} – оптическая плотность после разрушения всех клеток суспензии

$-\frac{dA}{dt}$ – скорость лизиса

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ИФА – иммуноферментный анализ

ДСН – додецилсульфат натрия

A2pm – диаминопимелиновая кислота

K_d – константа диссоциации

Автор выражает благодарность коллегам, участвовавшим в выполнении исследований на различных этапах работы:

Морозовой Ольге Алексеевне, заведующей бактериологической лабораторией Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова;

Чердынцевой Татьяне Андреевне, сотруднику кафедры микробиологии Биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова;

Овчинниковой Екатерине Дмитриевне, сотруднику Института экспериментальной кардиологии Национального медицинского исследовательского центра кардиологии;

Тишкову Владимиру Ивановичу, профессору кафедры химической энзимологии Химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова;

Белогуровой Наталье Георгиевне, сотруднику кафедры химической энзимологии Химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова;

Атрошенко Денису Леонидовичу, аспиранту кафедры химической энзимологии Химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова;

Смирнову Сергею Александровичу, сотруднику кафедры химической энзимологии Химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Федорчуку Владимиру Витальевичу, сотруднику кафедры химической энзимологии Химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова;

Еремееву Николаю Леонидовичу, профессору кафедры химической энзимологии Химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

6. Список литературы

1. Tagliabue A., Rappuoli R. Changing priorities in vaccinology: antibiotic resistance moving to the top // Frontiers in Immunology. – 2018. – v.9. – pp. 1068–1077.

2. Casals-Pascual C., Vergara A., Vila J. Intestinal microbiota and antibiotic resistance: perspectives and solutions // Human Microbiome Journal. – 2018. – v.9. – pp. 11–15.

3. Morehead M.S., Scarbrough C. Emergence of global antibiotic resistance // Primary Care: Clinics in Office Practice. – 2018. – v.45. – pp. 467–484.

4. Fischetti V.A. Bacteriophage lysins as effective antibacterials // Current Opinion in Microbiology. – 2008. – v.11. – pp. 393–400.

5. Donovan D.M. Bacteriophage and peptidogkycan degrading enzymes with antimicrobial applications // Recent Patents on Biotechnology. – 2007. – v.1. – pp. 113–122.

6. Öhlknecht C., Tegl G., Beer B. et al. Cellobiose dehydrogenase and chitosan based lysozyme responsive materials for antimicrobial wound treatment // Biotechnology and Bioengineering. – 2017. – v.114. – pp. 416–422.

7. Tan H., Jin D., Qu X. et al. A PEG-lysozyme hydrogel harvests multiple functions as a fit-to-shape tissue sealant for internal –use of body // Biomaterials. – 2019. – v.192. – pp. 392–404.

8. Teneback C.C., Scanlon T.C., Wargo M.J. et al. Bioengineered lysozyme reduces bacterial burden and inflammation in a murine model of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* lung infection // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2013. – v.57. – pp. 5559–5565.

9. Седов С.А., Белогурова Н.Г., Шиповсков С.В. и др. Бактериолитические ферменты из плазмы крови барана // Биоорганическая Химия. – 2012. – т.38. – с. 315–323.

10. Levashov P.A., Sedov S.A., Belogurova N.J. et al. Bacteriolytic activity of human interleukin-2 // Biochemistry. – 2012. – v.77. – pp. 1312–1314.

11. Yuzhalin A.E., Kutikhin A.G. Interleukins in cancer biology / A.E. Yuzhalin, A.G. Kutikhin. – Academic press, 2014. – 356 p.

12. Tzianabos A.O., Russell P.L., Onderdonk A.B. IL-2 mediates protection against abscess formation in an experimental model of sepsis // Journal of Immunology. – 1999. – v.163. – pp. 893–897.

13. Кулаев И.С. Бактериолитические ферменты микробного происхождения в биологии и медицине // Соросовский журнал. – 1997. – №3. – стр. 23–31.

14. Laschtschenko P. Über die keimtötende und entwicklungshemmende Wirkung Hühnereiweiß // Z. Hyg. InfektKrankh. – 1909. – v. 64. – pp. 419–427.

15. Fleming A. On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions // The Journal of Biological Chemistry. – 1922. – pp. 306–317.

16. Couniot N., Vanzieleghem T., Rasson J. et al. Lytic enzymes as selectivity means for label-free, microfluidic and impedimetric detection of whole-cell bacteria using ALD-Al_2O_3 passivated microelectrodes // Biosensors and Bioelectronics. – 2015. – v.67. – pp. 154–161.

17. Borysowski J., Górski A. Fusion to cell-penetrating peptides will enable lytic enzymes to kill intracellular bacteria // Medical Hypotheses. – 2010. – v.74. – pp. 164–166.

18. Coleman J.P., Smith J.C. Structure and composition of microbes // Reference Module in Biomedical Science. – 2014. – pp. 1–6.

19. Coleman J.P., Smith J.C. Microbial cell wall synthesis and permeability // xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. – 2007. – pp. 1–4.

20. Гусев М.В. Микробиология: Учебник для студентов биологических специальностей вузов / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – 4ое изд., стер. – М: Академия, 2003. – 464 с.

21. Nikaido H. Outer membrane, Gram-negative bacteria // Encyclopedia of Microbiology. – 2009. – pp. 439–452.

22. Poxton I.R. Teichoic acids, lipoteichoic acids and other secondary cell wall and membrane polysaccharides of gram-positive bacteria // Molecular Medical Microbiology. – 2015. – pp. 91–103.

23. Bron P.A., Tomita S., Merceiner A. et al. Cell surface-associated compounds of probiotic *Lactobacilli* sustain the strain-specificity dogma // Current Opinion in Microbiology. – 2013. – v.16. – pp. 262–269.

24. Vollmer W., Bertsche U. Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli* // Biochimica et Biophysica acta. – 2008. –v.1778. – pp. 1714–1734.

25. Sobhanifar S., King D.T., Strynadka N. Fortifying the wall: synthesis, Regulation and degradation of bacterial peptidoglycan // Current Opinion in Structural Biology. – 2013. – v.23. – pp. 695–703.

26. Pedro M.A. Peptidoglycan (murein) // Encyclopedia of Microbiology. – 2009. – pp. 453–469.

27. Реннеберг Р. Элексиры жизни. Новейшие результаты в области исследования ферментов / Р. Реннеберг. – М.: Мир, 1987 –152 с.

28. Le Moynihan P.J., Sychantha D., Clarke A.J. Chemical biology of peptidoglycan acetylation and deacetylation // Bioorganic Chemistry. – 2014. – v.54. – pp. 44–50.

29. Vollmer W., Born P. Bacterial cell envelope peptidoglycan // Microbial Glycobiology. – 2010. – pp. 15–28.

30. Vollmer W. Peptidoglycan // Molecular Medical Microbiology. – 2015. – v.1. – pp. 105–124.

31. Hsu Y.P., Meng X., VanNieuwenhze M.S. Methods for visualization of peptidoglycan biosynthesis // Methods in Microbiology. – 2016. – v.43. – pp. 3–48.

32. Schumann P. Peptidoglycan structure // Methods in Microbiology. – 2011. – v.38. – pp. 101–129.

33. Heijenoort J. Biosynthesis of bacterial peptidoglycan // Microbial Glycobiology. – 2010. – pp. 287–304.

34. Lortal S., Chapot-Chartier M.P. Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese // International Dairy Journal. – 2005. – v.15. – pp. 857–871.

35. Lee T.K., Huang K.C. The role of hydrolases in bacterial cell wall growth // Current Opinion in Microbiology. – 2013. – v.6. – pp. 760–766.

36. Salazar O., Asenjo J.A. Enzymatic lysis of microbial cells // Biotechnology Letters. – 2007. – v.29. – pp. 985–994.

37. Wyckoff T.J., Taylor J.A., Salama N.R. Beyond growth: novel functions for bacterial cell wall hydrolases // Trends in Microbiology. – 2012. – v.20. – pp. 540–547.

38. Sharma A.K., Kumar S., Harish K. et al. Prediction of peptidoglycan hydrolases – a new class of antibacterial proteins // BMC Genomics. – 2016. – v.17. – pp. 411–423.

39. Alcorlo M., Martínez-Caballero S., Molina R. et al. Carbohydrate recognition and lysis by bacterial peptidoglycan hydrolases // Current Opinion in Structural Biology. – 2017. – v.44. – pp. 87–100.

40. Heijenoort J. Peptidoglycan hydrolases of *Escherichia coli* // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2011. – v.75. – pp. 636–663.

41. Pérez-Dorado I., González A., Morales M. et al. Insights into pneumococcal fratricide from the crystal structures of the modular killing factor LytC // Nature Structural & Molecular Biology. – 2010. – v.17. – pp. 576–582.

42. López R., García E. Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes and bacteriophage // FEMS Microbiology Reviews. – 2004. – v.28. – pp. 553–580.

43. Чертков О.В., Армеев Г.А., Упоров И.В. Второй активный центр в эндолитической трансгликозилазе gp144 бактериофага phiKZ // Acta Naturae. – 2017. – №1. – стр. 87–94.

44. Dik D.A., Marous D.R., Fisher J.F. et al. Lytic transglycosylases: concinnity in concision of the bacterial cell wall // Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. – 2017. – v.52. – pp. 503–542.

45. Artola-Recolons C., Lee M., Bernardo-García N et al. Structure and cell wall cleavage by modular lytic transglycosylase MltC of *Escherichia coli* // ACS Chemical Biology. – 2014. – v.9. – pp. 2058–2066.

46. Domínguez-Gil T., Molina R., Alcorlo M. et al. Renew or die: The molecular mechanisms of peptidoglycan recycling and antibiotic resistance in Gram-negative pathogens // Drug Resistance Updates. – 2016. – v.28. – pp. 91–104.

47. Scheurwater E., Reid C.W., Clarke A.J. Lytic transglycosylases: Bacterial space-making autolysins // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. – 2008. – v.40. – pp. 586–591.

48. Uehara T., Bernhardt T.G. More than just lysins: peptidoglycan hydrolases tailor the cell wall // Current Opinion in Microbiology. – 2011. – v.14. – pp. 698–703.

49. Bütner F.M., Renner-Schneck M., Stehle T. X-ray crystallography and its impact on understanding bacterial cell wall remodeling processes // International Journal of Medical Microbiology. – 2015. – v.305. – pp. 209–216.

50. Johnson J.W., Fisher J.F., Mobashery S. Bacterial cell wall recycling // Annals of The New York Academy of Science. – 2013. – v.1277. – pp. 54–75.

51. Sharma U., Vipra A., Channabasappa S. Phage-derived lysins as potential agents for eradicating biofilms and persisters // Drug Discovery Today. – 2018. – v.23. – pp. 848–856.

52. Kakasis A., Panitsa G. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2018. In Press.

53. Fischetti V.A. Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives // Trends in Microbiology. – 2005. – v.13. – pp. 491–496.

54. Young R. Phage lysis: do we have the hole story yet? // Current Opinion in Microbiology. – 2013. – v.16. – pp. 790–797.

55. Young R. Phage lysis: three steps, three choices, one outcome // Journal of Microbiology. – 2014. – v.52. – pp. 243–258.

56. Ramanculov E., Young R. Genetic analysis of the T4 holin: timing and topology // Gene. – 2001. – v.265. – pp. 25–36.

57. Dewey J.S., Struck D.K., Young R. Thiol protection in membrane protein purifications: a study with phage holins // Analytical Biochemistry. – 2009. – v.390. – pp. 221–223.

58. Young R., White R.L. Lysis of the host by bacteriophage // Encyclopedia of Virology. – 2008. – pp. 248–258.

59. Anany H., Brovko L.Y., El-Arabi T. et al. Bacteriophages as antimicrobials in food products: history, biology and application // Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality. – 2015. – pp. 69–87.

60. Wang I., Smith D.L., Young R. Holins: the protein clocks of bacteriophage infection // Annual Reviews of Microbiology. – 2000. – v.54. – pp. 799–825.

61. Martínez B., García P., Rodríguez A. Swapping the roles of bacteriocins and bacteriophages in food biotechnology // Current Opinion in Biotechnology. – 2018. – v.56. – pp. 1–6.

62. Van Tassel M.L., Daum M.A., Kim J.S. et al. Creative lysins: Listeria and the engineering of antimicrobial enzymes // Current Opinion in Biotechnology. – 2016. – v.37. – pp. 88–96.

63. Loessner M.J. Bacteriophage endolysins – current state of research and application // Current Opinion in Microbiology. – 2005. – v.8. – pp. 480–487.

64. Kikkawa H., Fujinami Y., Suzuki S. et al. Identification of the amino acid residues critical for specific binding of the bacteriolytic enzyme of γ-phage, PlyG, *Bacillus anthracis* // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2007. – v.363. – pp. 531–535.

65. Cavera V.L., Arthur T.D., Kashtanov D. et al. Bacteriocins and their in the next wave of conventional antibiotics // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2015. – v.46. – pp. 494–501.

66. Villa T.J., Feijoo-Siota L., Rama J.L.R. et al. Enzybiotics: application in food packaging // Antimicrobial Food Packaging. – 2016. – pp. 491–502.

67. Santos V.L., Nardi Drummond R.M., Dias-Souza M.V. Bacteriocins as antimicrobial and antibiofilm agents // Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. – 2017. – pp. 403–436.

68. Kim Y.C., Tarr A.W., Penfold C.N. Colicin import into E.coli cells: a model system for insights into the import mechanisms of bacteriocins // Biochimica et Biophysica acta. – 2014. –v.1843. – pp. 1717–1731.

69. Gillor O., Kirkup B.C., Riley M.A. Colicins and microcins: the next generation of antimicrobials // Advances in Applied Microbiology. – 2014. – v.54. – pp. 403–436.

70. Rebuffat S. Handbook of biologically active peptides: Microcins / A.J. Kastin. – Elsevier, 2013. – 2032 p.

71. Ahmad V., Khan M.S., Jamal Q.M.S. et al. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2017. – v.49. – pp. 1–11.

72. Zou J., Jiang H., Cheng H. et al. Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins // International Journal of Biological Macromolecules. – 2018. – v.117. – pp. 781–789.

73. Martin-Visscher L.A., Gong X., Duszyk M. et al. The three-dimensional structure of carnocyclin A reveals that many circular bacteriocins share a common structural motif // The Journal of Biological Chemistry. – 2009. –v.284. – pp. 28674–28671.

74. Oppegard C., Rogne P., Kristiansen P.E. Structure analysis of the two-peptide bacteriocin lactococcin G by introducing D-amino acid residues // Microbiology. – 2010. – v.156. – pp. 1883–1889.

75. Mak P. Staphylococcal bacteriocins // Pet-To-Man Travelling Staphylococci. – 2018. – pp. 161–171.

76. Ojha S.C., Imtong C., Meetum K. et al. Purification and characterization of the antibacterial peptidase lysostaphin from *Staphylococcus simulans*: Adverse influence of Zn^{2+} on bacteriolytic activity // Protein Expression and Purification. – 2018. – v.151. – pp. 106–112.

77. Nithya S., Nimal T.R., Baranwal G. et al. Preparation, characterization and efficacy of lysostaphin-chitosan gel against *Staphylococcus aureus* // International Journal of Biological Macromolecules. – 2018. – v.110. – pp. 157–166.

78. Chikindas M.L., Weeks R., Drider D. et al. Functions and emerging applications of bacteriocins // Current Opinion in Biotechnology. – 2018. – v.49. – pp. 23–28.

79. Nesargikar P.N., Spiller B., Chavez R. The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors // European Journal of Microbiology and Immunology. – 2012. – v.2. – pp. 103–111.

80. Chen T., Tan L., Hu N. et al. C-lysozyme contributes to antiviral immunity in Bombyx mori against nucleopolyhedrovirus infection // Journal of Insect Physiology. – 2018. – v.108. – pp. 54–60.

81. Swaminathan R., Ravi V.K., Kumar S. et al. Lysozyme: A model protein for amyloid research // Advances in Protein Chemistry and Structural Biology. – 2011. – v.84. – pp. 63–111.

82. Wohlkönig A., Huet J., Looze Y. et al. Structural Relationships in the lysozyme superfamily: significant evidence for glycoside hydrolase signature motifs // PLoS One. – 2010. – v.5. – pp. 1–10.

83. Sheng L., Wang J., Huang M. et al. The changes of secondary structures and properties of lysozyme along with the egg storage // International Journal of Biological Macromolecules. – 2016. – v.92. – pp. 600–606.

84. Tribst A.A.L., de Morais M.A.B., Tominaga C.Y. et al. How high pressure pre-treatments affect the function and structure of hen egg-white lysozyme // Innovative Food Science & Emerging Technologies. – 2018. – v.47. – pp. 195–203.

85. Phillips D.C. The hen-egg white lysozyme molecule // Proceedings of the National Academy of Science. – 1967. – v.57. – pp. 483–495.

86. Bowman A.L., Grant I.M., Mulholland A.J. QM/MM simulations predict a covalent intermediate in the hen egg white lysozyme reaction with its natural substrate // Chemical Communication. – 2008. – v.37. – pp. 4425–4427.

87. Koshland D.E. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reaction // Biological Reviews. – 1953. – v.28. – pp. 416–436.

88. Silvetti T., Morandi S., Hintersteiner M. et al. Use of hen-egg white lysozyme in the food industry // Egg Innovations and Strategies for Improvements. – 2017. – pp. 233–242.

89. Held J., van Smaalen S. The active site of hen-egg white lysozyme: flexibility and chemical bonding // Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography. – 2014. – v.70. – pp. 1136–1146.

90. Hadfield A.T., Harvey D.J., Archer D.B. et al. Crystal structure of the mutant D52S hen egg white lysozyme with an oligosaccharide product // Journal of Molecular Biology. – 1994. – v.243. – pp. 856–872.

91. Vocadlo D.J., Davies G.J., Laine R. et al. Catalysis by hen-egg white lysozyme proceeds via a covalent intermediate // Nature. – 2001. – v.412. – pp. 835–838.

92. Wu T., Li Y., Yuan C. et al. Preparation and characterization of calcium alginate-chitosan complexes loaded with lysozyme // Journal of Food Engineering. – 2018. – v.233. – pp. 109–116.

93. Radziejewska R., Leśnierowski G., Kijowski J. Properties and application of egg white lysozyme and its modified preparations // Polish Journal of Food and Nutritional Sciences. – 2008. – v.58. – pp. 5–10.

94. Alhazmi A., Stevenson J.W., Amartey S. et al. Discovery, modification and production of T4 lysozyme for industrial and medical uses // International Journal of Biology. – 2014. – v.6. – pp. 45–63.

95. Ávila M., Gómez-Torres N., Hernández M. et al. Inhibitory activity of reuterin, nisin, lysozyme and nitrite against vegetative cells and spores of dairy-related *Clostridium* species // International Journal of Food Microbiology. – 2014. – v.172. – pp. 70–75.

96. Liburdi K., Benucci I., Esti M. Lysozyme in wine: an overview of current and future application // Comprehensive Reviews Food Science and Food Safety. – 2014. – v.13. – pp. 1062–1073.

97. Silvetti T., Brasca M., Lodi R. et al. Effects of lysozyme on the microbiological stability and organoleptic properties of unpasteurized beer // Journal of the Institute of Brewing. – 2010. – v.116. – pp. 33–40.

98. Kovacs-Nolan J., Phillips M., Mine Y. Advances in the value of eggs and egg components for human health // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2005. – v.63. – pp. 8421–8431.

99. Tenovuo J. Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: efficacy and safety // Oral Diseases. – 2002. – v.8. – pp. 23–29.

100. Lee-Huang S., Huang P.L., Sun Y. et al. Lysozyme and RNases as anti-HIV components in β-core preparations of human chorionic gonadotropin // Proceedings of the National Academy of Science. – 1999. – v.96. – pp. 2678–2681.

101. Park Y., Cheong H. Expression and production of recombinant human interleukin-2 in potato plants // Protein Expression and Purification. – 2002. – v.25. – pp. 160–165.

102. Chung K.F. Cytokines // Asthma and COPD: Basic Mechanism and Clinical Management. – 2009. – pp. 327–341.

103. Feldmann M. Encyclopedia of Immunology / P.J. Delves. – Academic press, 1998. – 3072 p.

104. Schirmer M., Kumar V., Netea M.G. et al. The causes and consequences of variation in human cytokine production in health // Current Opinion in Immunology. – 2018. – v.54. – pp. 50–58.

105. Sherbet M.G. Growth factors and their receptors in cell differentiation, cancer and cancer therapy / M.G. Sherbet. – Elsevier, 2011. – 249 p.

106. Zhang J.M., An J. Cytokines, inflammation and pain // International Anesthesiology Clinics. – 2007. – v.45. – pp. 27–37.

107. McInnes I.B. Kelley and Firestein’s textbook of rheumatology / G.S. Firestein, S.E. Gabriel, J.R O’Dell, R.C. Budd, I.B. McInnes. – Elsevier, 2017. – 1973 p.

108. Morgan D.A., Ruscetti F.W., Gallo R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows // Science. – 1976. – v.193. – pp. 1007–1008.

109. Taniguchi T., Matsui H., Fujita T. et al. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2 // Nature. – 1983. – v.302. – pp. 305–310.

110. Asao H. Encyclopedia of endocrine diseases: Interleukin-2 / L. Martini. – Academic press, 2004. – 3043 p.

111. Zhao Z., Zhang X., Su L. et al. Fine tuning subsets of CD4+ T cells by low-dosage of IL-2 and a new therapeutic strategy for autoimmune diseases // International Immunopharmacology. – 2018. – v.56. – pp. 269–276.

112. Thorpe R. Cytokines: Interleukin-2 / A.R. Mire-Sluis, R. Thorpe. – Academic press, 1998. – 609 p.

113. Smith K.A. Interleukin-2: inception, impact and implications // Science. – 1988. – v.240. – pp. 1169–1176.

114. Browning J.L., Mattaliano R.J., Chow E.P. et al. Disulfide scrambling of interleukin-2: HPLC resolution of the three possible isomers // Analytical Biochemistry. – 1986. – v.155. – pp. 123–128.

115. Wang Q.R., Ma L., Zhou M.Q. et al. Expression, refolding, purification and bioactivity of recombinant bifunctional protein, hIL-2/GM-CSF // Protein Expression and Purification. – 2005. – v.39. – pp. 131–136.

116. Théze J. Encyclopedia of Immunology / P.J. Delves. – Academic press, 1998. – 3072 p.

117. Arkin M.R., Randal M., DeLano W.L. et al. Binding of small molecules to an adaptive protein-protein interface // Proceedings of the National Academy of Science. – 2003. – v.100. – pp. 1603–1608.

118. Liao W., Lin J.-X., Leonard W.J. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance and immunotherapy // Immunity. – 2013. – v.38. – pp. 13–25.

119. Beenhouwer D.O. Molecular pathology / W.B. Coleman, G.J. Tsongalis. – Academic press, 2018. – 802 p.

120. Sprent J. Encyclopedia of Immunology / P.J. Delves. – Academic press, 1998. – 3072 p.

121. Zhang N., Bevan M.J. $CD8^+$ T cells: foot soldiers of the immune system // Immunity. – 2011. – v.35. – pp. 161–169.

122. Diefenbach A. Antibody Fc / M.E. Ackerman, F. Nimmerjahn. – Academic press, 2014. – 358 p.

123. Luckashenak N., Elsenlohr L.C. Cancer immunotherapy / G.C. Prendergast, E.M. Jaffee. – Academic press, 2013. – 684 p.

124. Nigrovich P.A. Kelley and Firestein's textbook of rheumatology / G.S. Firestein, S.E. Gabriel, J.R O'Dell, R.C. Budd, I.B. McInnes. – Elsevier, 2017. – 1973 p.

125. Dembic Z. The cytokines of immune system / Z. Dembic. – Academic press, 2015. – 320 p.

126. Fehniger T.A., Cooper M.A., Caligiuri M.A. Interleukin-2 and interleukin-15 immunotherapy for cancer // Cytokines & Growth Factor Reviews. – 2002. – v.13. – pp. 169–183.

127. Buchbinder E.I., McDermott D.F. Interferon, interleukin-2, and other cytokines // Hematology/Oncology Clinics of North America. – 2014. – v.28. – pp. 571–583.

128. Arenas-Ramirez N., Woytschak J., Boyman O. Interleukin-2: biology, design and application // Trends in Immunology. – 2015. – v.36. – pp. 763–777.

129. Ellery J.M., Nicholls P.J. Alternate signaling pathways from the interleukin-2 receptor // Cytokines & Growth Factor Reviews. – 2002. – v.13. – pp. 27–40.

130. Malek T.R., Castro I. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity // Immunity. – 2010. – v.33. – pp. 153–166.

131. Burchill M.A., Yang J., Vang K.B. Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis // Immunology Letters. – 2007. – v.114. – pp. 1–8.

132. Gómez-Martín D., Díaz-Zamudio M., Crispín J.C. Interleukin-2 and systemic lupus erythematosus: beyond the transcriptional regulatory net abnormalities // Autoimmunity Reviews. – 2009. – v.9. – pp. 34–39.

133. Yuzhalin A.E., Kutikhin A.G. Interleukins in cancer biology / A.E. Yuzhalin, A.G. Kutikhin. – Academic press, 2014. – 356 p.

134. Shaker M.A., Younes H.M. Interleukin-2: evaluation of routes of administration and current delivery systems in cancer therapy // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2009. – v.98. – pp. 2268–2299.

135. Rosenberg S.A. IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer // Journal of Immunology. – 2014. – v.192. – pp. 5451–5458.

136. Chemaly R.F., Sharma P.S., Youssef S. et al. The efficacy of catheters coated with minocycline and rifampin in the prevention of catheter-related bacteremia in cancer patients receiving high-dose interleukin-2 // International Journal of Infection Diseases. – 2010. – v.14. – pp. 548–552.

137. Floros T., Tarhini A.A. Anticancer cytokines: biology and clinical effects of interferon-α2, interleukin (IL)-2, IL-15, IL-21, IL-12 // Seminars in Oncology. – 2015. – v.42. – pp. 539–548.

138. Gills J., Parker W.P., Pate S. et al. The role of high-dose interleukin-2 in the erf of targeted therapy // Journal of Urology. – 2017. – v.3. – pp. 538–545.

139. Petrella T., Quirt I., Verma S. et al. Single-agent interleukin-2 in the treatment of metastatic melanoma: a systematic review // Cancer Treatment Reviews. – 2007. – v.33. – pp. 484–496.

140. Shevach E.M. Application of IL-2 therapy to target T regulatory cell function // Trends in Immunology. – 2012. – v.33. – pp. 626–633.

141. Giedlin M.A., Zimmerman R.J. The use of recombinant human interleukin-2 in treating infection diseases // Current Opinion in Biotechnology. – 1993. – v.4. – pp. 722–726.

142. Pau A.K., Tavel J.A. Therapeutic use of interleukin-2 in HIV-infected patients // Current Opinion in Pharmacology. – 2002. – v.2. – pp. 433–439.

143. Charland M.B. Management of adverse effects associated with the use of interleukin-2 in patients with HIV infection // Journal of the Association of Nurses in AIDS Care. – 2003. – v.14. – pp. 89–95.

144. Joly M., Odloak D. Modeling interleukin-2-based immunotherapy in AIDS pathogenesis // Journal of Theoretical Biology. – 2013. – v.335. – pp. 57–78.

145. Conrad A. Interleukin-2 – Where are we going? // Journal of the Association of Nurses in AIDS Care. – 2003. – v.14. – pp. 83–88.

146. Roca B. Interleukin-2 treatment in HIV-1 infection // The Lancet. – 2006. – v.367. – p. 1054.

147. Tzianabos A.O., Russell P.L., Onderdonk A.B. IL-2 mediates protection against abscess formation in an experimental model of sepsis // Journal of Immunology. – 1999. – v.163. – pp. 893–897.

148. Рабинович М.Л., Клесов А.А., Березин И.В. Кинетика ферментативных реакций в гетерогенных системах. II Бактериолитческое действие лизоцима на клетки *Micrococcus lysodeikticus* // Биоорганическая химия. – 1976. – т.2. – с. 689–700.

149. Sedov S.A., Belogurova N.G., Shipovskov S. et al. Lysis of *Escherichia coli* cells by lysozyme: discrimination between adsorption and enzyme action // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2011. – v.88. – pp. 131–133.

150. Van Herreweghe J.M., Vanderkelen L., Callewaert L. et al. Lysozyme inhibitor conferring bacterial tolerance to invertebrate type lysozyme // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2010. – v.67. – pp. 1177–1188.

151. Um S.H., Kim J.S., Kim K. et al. Structural basis for the inhibition of human lysozyme by PliC from *Brucella abortus* // Biochemistry. – 2013. – v.52. – pp. 9385–9393.

152. Leysen S., Van Herreweghe J.M., Callewaert L. et al. Volecular basis of dacteria defence against host lysozymes: X-ray structures of periplasmic lysozyme inhibitors PliI and PliC // Journal of Molecular Biology. – 2011. – v.405. – pp. 1233–1245.

153. Callewaert L., Van Herreweghe J.M., Vanderkelen L. et al. Guards of the great wall: bacterial lysozyme inhibitors // Trends in Microbiology. – 2012. – v.20. – pp. 501–511.

154. Derde M., Nau F., Lechevalier V. et al. Native lysozyme and dry heated lysozyme interactions with membrane lipid monolayers: lateral reorganization of LPS monolayer, model of the *Escherichia coli* outer membrane // Biochimica et Biophysica acta. – 2015. –v.1848. – pp. 174–183.

155. Gorbenko G.P., Ioffe E.M., Kinnunen P.K.J. Binding of lysozyme to phospholipid bilayers: evidence for protein aggregation upon membrane association // Biophysical Journal. – 2007. –v.93. – pp. 140–153.

156. Gorbenko G.P., Ioffe E.M., Molotkovsky J.G. et al. Resonance energy transfer study of lysozyme-lipid interactions // Biochimica et Biophysica acta. – 2008. – v.1778. – pp. 1213–1221.

157. Zhang J., Feng Y., Mi J. et al. Photothermal lysis of pathogenic bacteria by platinum nanodots decorated gold nanorods under near infrared irritation // Jounal of Hazardous Materials. – 2018. –v.342. – pp. 121–130.

158. Shetty P., Ghosh D., Paul D. Thermal lysis and isothermal implification of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv in one tube // Journal of Microbiological Methods. – 2017. –v.143. – pp. 1–5.

159. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical Biochemistry. – 1976. –v.72. – pp. 248–254.

160. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent // The Journal of Biological Chemistry. – 1951. –v.193. – pp. 265–275.

161. Levashov P.A., Sutherland D.S., Besenbacher F. et al. A robust method of determination of high concentrations of peptides and proteins // Analytical Biochemistry. – 2009. –v.395. – pp. 111–112.

162. Taylor P.V. Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against Gram-negative bacteria // Microbiological Reviews. – 1983. –v.47. – pp. 46–83.

163. Левашов П.А., Попов Д.В., Попова В.М. и др. Бактериолитические ферменты фага SPZ7: выделение и свойства // Биохимия. – 2010. – т.75. – с. 1299–1304.

164. Flaender M., den Dulk R., Flegeau V. et al. Grinding lysis: a microfluidic device for sample enrichment and mechanical lysis in one // Sensors and Activators B: Chemical. – 2018. –v.258. – pp. 148–155.

165. Cappannella E., Benucci I., Lombardelli C. et al. Immobilized lysozyme for the continuous lysis of lactic bacteria in wine: bench-scale fluidized-bed reactor study // Food Chemistry. – 2016. –v.210. – pp. 49–55.

166. Kitatsuji K., Miyta H., Fukase T. Lysis of filamentous bacteria by surfactants // Water Science Technology. – 1996. –v.34. – pp. 145–153.

167. Deckers D., Vanlint D., Callewaert L. et al. Role of the lysozyme inhibitor Ivy in growth or survival of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria in hen egg white and in human saliva and breast milk // Applied and Enviromental Microbiology. – 2008. –v.74. – pp. 4434–4439.

168. Cheng H., Asakura Y., Kanda K. et al. Dynamic bacterial community changes in autothermal thermophilic aerobic digestion process with cell lysis activities, shaking and temperature increase // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2018. –v.126. – pp. 196–204.

169. Ercan D., Demirci A. Recent advances for the production and recovery methods of lysozyme // Critical Reviews in Biotechnology. – 2015. –v.36. – pp. 1078–1088.

170. Dalgaard P., Ross T., kamperman L. et al. Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data // International Journal of Food Microbiology. – 1994. –v.23. – pp. 391–404.

171. Levashov P.A., Sedov S.A., Shipovskov S. et al. Quantitative turbidimetric assay of enzymatic Gram-negative bacteria lysis // Analytical Chemistry. – 2010. –v.82. – pp. 2161–2163.

172. Mitchell G.J., Nelson D.C., Weitz J.C. Quantifying enzymatic lysis: estimating the combined effects of chemistry, physiology and physics // Physical Biology. – 2010. –v.7. – pp. 1–12.

173. Moldoveanu S.C., David V. Selection of the HPLC method in chemical analysis / S.C. Moldoveanu, V. David. – Elsevier, 2017. – 598 p.

174. Mie G. Beiträge zur optic trűber medien, speziell kolloidaler metallösungen // Annalen der Physik. – 1908. –v.3. – pp. 25–94.

175. Lawler D.M. Encyclopedia of analytical sciences / P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole. – Elsevier, 2005. – 5000 p.

176. Crawley G., Cournil M., di Benedetto D. Size analysis of fine particle suspensions by spectral turbidimetry: potential and limits // Powder Technology. – 1997. –v.91. – pp. 197–208.

177. Elsayed M.M.A., Cevc G. Turbidity spectroscopy for characterization of submicroscopic drug carriers, such as nanoparticles and lipid vesicles: sixe determination // Pharmaceutical Research. – 2011. –v.28. – pp. 2204–2222.

178. Lavine B.K., Oxenford L., Kim M. et al. Novel turbidimetric method to study polimer swelling // Microchemical Journal. – 2012. –v.103. – pp. 97–104.

179. Thomar P., Nicolai T. Dissociation of native casein micelles induced by sodium caseinate // Food Hydrocolloids. – 2015. –v.49. – pp. 224–231.

180. Walker M.B., Retzinger A.C., Retzinger G.S. A turbidimetric method for measuring the activity of trypsin and its inhibition // Analytical Biochemistry. – 2006. – v.351. – pp. 114–121.

181. Blirup-Jensen S. Protein standardization III: method optimization basic principles for quantitive determination of human serum proteins on automated instruments based on turbidimetry or nephelometry // Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. – 2001. –v.39. – pp. 1098–1109.

182. Матолыгина Д.А., Осипова Е.Э., Смирнов С.А. и др. Определение активности и измерение сорбции бактериолитического фермента в системе живых клеток *Lactobacillus plantarum* // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. – 2015. – т.56. – №6. – с. 365-371.

183. Garrity G.M. Bergey’s manual of systematic bacteriology: volume II / G.M. Garrity, D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.R. Staley. – Spinger, 2005. – 2816 p.

184. Tena D., Fernández C., Lago M.R. *Alcalignes faecalis*: an unusual cause of skin and soft tissue infection // Japanese Journal of Infectious Diseases. – 2015. –v.68. – pp. 128–130.

185. Batt C.A. Encyclopedia of food microbiology / C.A. Batt, M.L. Tortorello. – Academic press, 2014. – 3248 p.

186. Sawant A.C., Srivatsa S.S., Castro L.J. *Alcalignes xylosoxidans* endocarditis of a prothetic valve and pacemaker // Texas Heart Institute Journal. – 2013. –v.40. – pp. 95–98.

187. Wisplinghoff H. Infectious diseases / J. Cohen, W.G. Powderly, S.M. Opal. – Elsevier, 2017. – 2016 p.

188. Grutsch A.A., Nimmer P.S., Pittsley R.S. et al. Foodborn diseases: volume 15 / A. Grumezescu, A-M. Holban. – Academic press, 2018. – 564 p.

189. Ludwig W., Schleifer K-H., Whitman W.B. Bergey’s manual of systematic bacteriology: volume III / P. Vos, G.M. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K-H. Schleifer, W.B. Whitman. – Spinger, 2009. – 1450 p.

190. Delbrassinne L., Mahillon J. Encyclopedia of food and health / B. Caballero, P.M. Finglas, F. Toldorá. – Academic press, 2016. – 4006 p.

191. Cote C.K., Heffron J.D., Bozue J.A. et al. Molecular Medical Microbiology / Y-W. Tang, A. Sails. – Academic press, 2014. – 2216 p.

192. Cutting S.M. *Bacillus* probiotics // Food Microbiology. – 2011. – v.28. – pp. 214–220.

193. Schultz M., Burton J.P., Chanyi R.M. The microbiota in gastrointestinal pathophysiology / M.H. Floch, Y. Ringel, W.A. Walker. – Academic press, 2017. – 442 p.

194. Wang T., Liang Y., Wu M. et al. Natural products from *Bacillus subtilis* with antimicrobial properties // Chinese Journal of Chemical Engineering. – 2015. – v.23. – pp. 744–754.

195. Yu G.Y., Sinclair J.B., Hartman G.L. et al. Production of iturin by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani* // Soil Biology & Biochemistry. – 2002. – v.34. – pp. 955–963.

196. Kumar P., Patel S.K.S., Lee J-K. et al. Extending the limits of *Bacillus* for novel biotechnological applications // Boitechnology Advances. – 2013. – v.31. – pp. 1543–1561.

197. Arnaouteli S., MacPhee C.E., Stanley-Wall N.R. Just in case it rains: building a hydrophobic biofilm the *Bacillus subtilis* way // Current Opinion in Microbiology. – 2016. – v.34. – pp. 7–12.

198. Granum P.E., Arnesen L.S., From C. Encyclopedia of food safety / Y. Motarjemy. – Academic press, 2014. – 2304 p.

199. Mattarelli P., Biavati B. The Bifidobacteria and related organisms / P. Mattarelli, B. Biavati, W.H. Holzapfel, B.J.B. Wood. – Academic press, 2018. – 324 p.

200. Shah N.P. Encyclopedia of dairy science / H. Roginski. – Academic press, 2002. – 2500 p.

201. Quigley E.M.M. The microbiota in gastrointestinal pathophysiology / M.H. Floch, Y. Ringel, W.A. Walker. – Academic press, 2017. – 442 p.

202. O'Callaghan A., van Sinderen D. Bifidobacteria and they role as members of human gut microbiota // Frontiers in Microbiology. – 2016. – v.7. – pp. 925–948.

203. Papigadeh M., Rohani M., Nahrevanian H. et al. Probiotic characters of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* are a result of ongoing gene acquisition and genoma minimization evolutionary trends // Microbial Pathogenesis. – 2017. – v.111. – pp. 118–131.

204. Petrova P., Petrov K. Food bioconversion / A.M. Grumezescu, A.M. Holban. – Academic press, 2017. – 550 p.

205. Martinez F.A.C., Balciunas E.M., Converti A. Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. // Biotechnology Advances. – 2013. – v.31. – pp. 482–488.

206. Silvetti T., Morandi S., Brasca M. Growth factors affecting gas production and reduction potential of vegetative cell and spore inocula of dairy-related Clostridium species // LWT – Food Science and Technology. – 2018. – v.92. – pp. 32–39.

207. Brook I. Principles and practice of pediatric infectious diseases / S.S. Long, S.G. Prober, M. Fischer. – Elsevier, 2018. – 1688 p.

208. Beard M., Chaddock J.A. Molecular Medical Microbiology / Y-W. Tang, D. Liu, J. Schwartzman, M Sussman, I. Poxton. – Academic press, 2015. – 2216 p.

209. Krutova M., Kinross P., Barbut F. et al. How to: surveillance of *Clostridium difficile* infections // Clinical Microbiology and Infection. – 2018. – v.24. – pp. 469–475.

210. Moore S.C. *Clostridium difficile* more challenging then ever // Critical Care Nursing Clinics of North America. – 2018. – v.30. – pp. 41–53.

211. Cohen J.E., Wang R., Shen R-F. et al. Comparative pathogenomics of *Clostridium tetani* // Public Library of Science. – 2017. – v.12. – pp. 909–933.

212. Num S.M., Useh N.M. *Clostridium*: pathogenic roles, industrial uses and medicinal prospects of natural products as ameliorative agents againct pathogenic species // Jordan Journal of Biological Sciences. – 2014. – v.7. – pp. 81–94.

213. Nagahama M., Oda M., Tsuge H. et al. Molecular Medical Microbiology / Y-W. Tang, D. Liu, J. Schwartzman, M Sussman, I. Poxton. – Academic press, 2015. – 2216 p.

214. Lagier J-C. Gut microbiota and *Clostridium difficile* unfections // Human Microbiome Journal. – 2016. – v.2. – pp. 10–14.

215. Aureli P., Franciosa G., Scalfaro C. Encyclopedia of dairy science / J.W. Fuquay. – Academic press, 2011. – 4170 p.

216. Olguín-Araneda V., Banawas S., Sarker M.R. et al. Recent advances in germination of Clostridium spores // Research in Microbiology. – 2015. – v.166. – pp. 236–243.

217. Carter G.R. Diagnostic procedure in veterinary bacteriology and mycology / G.R. Carter, J. Cole. – Academic press, 1990. – 620 p.

218. Tsuzukibashi O., Uchibori S., Shinozaki-Kuwahara N. et al. A selective medium for the isolation of *Corynebacterium* species in oral cavities // Journal of Microbiological Methods. – 2014. –v.104. – pp. 67–71.

219. Harrington A.T., Clarridge J.E., Mahlen S.D. Molecular Medical Microbiology / Y-W. Tang, D. Liu, J. Schwartzman, M Sussman, I. Poxton. – Academic press, 2015. – 2216 p.

220. Cavalieri S.J., Knoop F.C. xPharm: the comprehensive pharmacology reference / S.J. Enna, D.B. Bylund. – Elsevier, 2008. – 1688 p.

221. Yanai M., Ogasawasa M., Hayashi Y. Retrospective evaluation of the clinical characteristics associated with *Corynebacterium* species bacteremia // The Brazilian Journal of Infectious Diseases. – 2018. – v.22. – pp. 24–29.

222. Kuriyan A.E., Sridhar J., Flynn H.W. et al. Endophthalmitis caused by *Corynebacterium* species: clinical features, antibiotic susceptibility and treatment outcomes // Ophthalmology Retina. – 2017. – v.1. – pp. 200–205.

223. Dalen G., Rachah A., Norstebo H. et al. Transmission dynamics of intramammary infections caused by *Corynebacterium* species // Journal of Dairy Science. – 2018. – v.101. – pp. 472–479.

224. Imhoff J.F. Bergey's manual of systematic bacteriology: volume II / G.M. Garrity, D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.R. Staley. – Spinger, 2005. – 2816 p.

225. Rogers L., Power K., Gaora P.O. et al. Encyclopedia of food and health / B. Caballero, P.M. Finglas, F. Toldorá. – Academic press, 2016. – 4006 p.

226. Sandle T. Encyclopedia of food microbiology / C.A. Batt, M.L. Tortorello. – Academic press, 2014. – 3248 p.

227. Jenkins C., Rentenaar R.J., Landraud L. et al. Infectious diseases / J. Cohen, W.G. Powderly, S.M. Opal. – Elsevier, 2017. – 2016 p.

228. Rock C., Donnenberg M.C. Human pathogenic Enterobacteriaceae // Reference Module in Biomedical Science. – 2014. – pp. 1–8.

229. Duman M., Saticioglu I.B., Buyukekiz A.G. et al. molecular characterization and antimicrobial resistance profile of atypical *Citrobacter gillenii* and *Citrobacter* sp. isolated from diseased rainbow trout // Journal of Global Antimicrobial Resistance. – 2017. – v.10. – pp. 136–142.

230. Kus J.V., Borrows L.L. xPharm: the comprehensive pharmacology reference / S.J. Enna, D.B. Bylund. – Elsevier, 2008. – 1600 p.

231. Antonara S., Ardura M.I. Principles and practice of pediatric infectious diseases / S.S. Long, S.G. Prober, M. Fischer. – Elsevier, 2018. – 1688 p.

232. Liu L-H., Wang N-Y., Wu A.W-J. et al. *Citrobacter freundii* bacteremia: risk factors of mortality and prevalence of resistance genes // Journal of Microbioogy, Immunology and Infection. – 2018. – v.51. – pp. 566–572.

233. Hirai J., Uechi K., Hagihara M. et al. Bacterimia due to *Citrobacter braakii*: a case report and literature review // Journal of Infection and Chemotherapy. – 2016. – v.22. – pp. 819–821.

234. Luperchio S.A., Schauer D.B. Molecular pathogenesis of *Citrobacter rodentium* and transmissible murine colonic hyperplasia // Microbes and Infection. – 2001. – v.3. – pp. 333–340.

235. Roy R., Kumar P.P., Malathi J. et al. Endophthalmitis caused by *Citrobacter* species: a case series // Canadian Journal of Ophthalmology. – 2013. – v.48. – pp. 216–217.

236. Lien C.-Y., Lee J.-J., Chien C.-C. et al. Clinical characteristics of *Citrobacter* meningitis in adults: high incidence in patients with a postneurosergical state and strains not susceptible to third-generation cephalosporins // Journal of Clinical Neuroscience. – 2018. – v.54. – pp. 83–87.

237. Cooney S., Iversen C., Healy B. et al. Encyclopedia of dairy science / J.W. Fuquay. – Academic press, 2011. – 4170 p.

238. Cunningham D.J., Leber A. Principles and practice of pediatric infectious diseases / S.S. Long, S.G. Prober, M. Fischer. – Elsevier, 2018. – 1688 p.

239. Dalben M., Varkulja G., Basso M. et al. Investigation of an outbreak of *Enterobacter cloacae* in a neonatal unit and review of the literature // Journal of Hospital Infection. – 2008. – v.70. – pp. 7–14.

240. Leung J.M., Gallant C.V. Infections due to Escherichia and Shigella // Reference Module in Biomedical Science. – 2014. – pp. 121–130.

241. Liu D. *Esherichia coli* // Reference Module in Biomedical Science. – 2014. – pp. 237–250.

242. Neidhardt F.C. Brenner’s encyclopedia of genetics / S. Maloy, K. Hughes. – Academic press, 2013. – 4368 p.

243. Schaechter M. Encyclopedia of microbiology / M. Schaechter – Academic press, 2009. – 4600 p.

244. Barson W.J., Leber A. Principles and practice of pediatric infectious diseases / S.S. Long, S.G. Prober, M. Fischer. – Elsevier, 2018. – 1688 p.

245. Wu M., Li X. Molecular Medical Microbiology / Y-W. Tang, D. Liu, J. Schwartzman, M Sussman, I. Poxton. – Academic press, 2015. – 2216 p.

246. Wyres K.L., Holt K.E. *Klebsiella pneumoniae* population genomics and antimicrobial-resistance clones // Trends in Microbiology. – 2016. – v.24. – pp. 944–956.

247. Ahmad T.A., El-Sayed L.H., Haroun M. et al. Development of immunization trials against *Klebsiella pneumoniae* // Vaccine. – 2012. – v.30. – pp. 2411–2420.

248. Doorduijn D.J., Rooijakkers S.H.M., van Schaik W. et al. Complement resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* // Immonubiology. – 2016. – v.221. – pp. 1102–1109.

249. Fazili T., Sharngoe C., Endy T. et al. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: an emerging disease // The American Journal of the Medical Science. – 2016. – v.351. – pp. 297–305.

250. Liu H., Zhu J., Hu Q. et al. *Morganella morganii* a non-negligent opportunistic pathogen // International Journal of Infection Diseases. – 2016. – v.50. – pp. 10–17.

251. Barson W.J., Antonara S. Principles and practice of pediatric infectious diseases / S.S. Long, S.G. Prober, M. Fischer. – Elsevier, 2018. – 1688 p.

252. Erlanger D., Assous M.V., Wiener-Well Y. et al. Clinical manifistations, risk factors and prognosis of patients with *Morganella morganii* sepsis // Journal of Microbioogy, Immunology and Infection. In Press.

253. Abdalla J., Saad M., Sammani I. Central nervous system infection caused by *Morganella morganii* // The American Journal of the Medical Science. – 2006. – v.331. – pp. 44–47.

254. Wang Y., Pan X. Encyclopedia of food safety / Y. Motarjemy. – Academic press, 2014. – 2304 p.

255. Heimer S.R., Mobley H.L.T. Encyclopedia of Immunology / P.J. Delves. – Academic press, 1998. – 3072 p.

256. Fox-Moon S.M., Shirtliff M.E. Molecular Medical Microbiology / Y-W. Tang, D. Liu, J. Schwartzman, M Sussman, I. Poxton. – Academic press, 2015. – 2216 p.

257. Okimoto N., Hayashi T., Ishiga M. et al. Clinical features of *Proteus mirabilis* pneumonia // Journal of Infection and Chemotherapy. – 2010. – v.16. – pp. 364–366.

258. Schaffer J.N., Pearson M.M. *Proteus mirabilis* and urinary tract infections // Microbiology Spectrum. – 2015. – v.3. – pp. 17–56.

259. Hejazi A., Falkiner F.R. *Serratia marcescens* // Journal of Medical Microbiology. – 1997. – v.46. – pp. 903–912.

260. Cooney S., O; Brien S., Iversen C. et al. Encyclopedia of food safety / Y. Motarjemy. – Academic press, 2014. – 2304 p.

261. Song E., Mejias A., Antonara S. Principles and practice of pediatric infectious diseases / S.S. Long, S.G. Prober, M. Fischer. – Elsevier, 2018. – 1688 p.

262. Percival S., Chalmers R., Embrey M. et al. Microbiology of waterborn diseases / S. Percival, M. Embrey, J. Sellwood, R. Chalmers, P. Hanter. – Academic press, 2004. – 480 p.

263. Rehaiem A., Fhoula I., Slim A.F. et al. Prevalence, acquired antibiotic resistance and bacteroicin production of *Enterococcus* spp. isolated from Tunisian fermented food products // Food Control. – 2016. – v.63. – pp. 259–266.

264. García de Fernando G. Reference Module in Biomedical Science. – 2016. – pp. 137–145.

265. Haslam D.B., Geme J.W.S. Principles and practice of pediatric infectious diseases / S.S. Long, S.G. Prober, M. Fischer. – Elsevier, 2018. – 1688 p.

266. Chajecka-Wierzchowska W., Zadernowska A., Laniewska-Trokenheim L. Virulence factors of *Enterococcus* spp. presented in food // LWT – Food Science and Technology. – 2017. – v.75. – pp. 670–676.

267. Pidot S.J., Gao W., Buultjens A.H. et al. Increasing tolerance of *Enterococcus faecium* to handwash alcohols // Science Translational Medicine. – 2018. – v.10. – pp. 61–72.

268. Schleifer K-H. Bergey's manual of systematic bacteriology: volume III / P. Vos, G.M. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K-H. Schleifer, W.B. Whitman. – Spinger, 2009. – 1450 p.

269. De Angelis M., Gobbetti M. *Lactobacillus* spp: general chaacteristics // Reference Module in Food Science. – 2014. – pp. 112–124.

270. Heeney D.D., Gareau M.G., Marco M.L. Intestinal *Lactobacillus* in health and disease, a driver or just along for the ride? // Current Opinion in Biotechnology. – 2018. – v.49. – pp. 140–147.

271. Abriouel H., Muňoz M.C.C., Lerma L.L. et al. New insights in antibiotic resistance of *Lactobacillus* species from fermented foods // Food Research International. – 2015. – v.78. – pp. 465–481.

272. Jones R.M. The microbiota in gastrointestinal pathophysiology / M.H. Floch, Y. Ringel, W.A. Walker. – Academic press, 2017. – 442 p.

273. Le B., Yang S.H. Efficacy of in prevention of inflammatory bowel diseases // Toxicology Reports. – 2018. – v.5. – pp. 314–317.

274. Slover C.M., Danzigger L. *Lactobacillus* // Clinical Microbiology Newsletter. – 2008. – v.30. – pp. 23–27.

275. Corsetti A., Ciarrocchi A., Prete R. Lactic acid bacteria // Reference Module in Food Science. – 2016. – pp. 20–28.

276. De Silva S.S., Vitolo M. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria // Food Research International. – 2014. – v.64. – pp. 527–536.

277. Canon J.P., Lee T.A., Bolanos J.T. et al. Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases // European Journal of Clinical Microbiology and Infection Diseases. – 2005. – v.24. – pp. 31–40.

278. De Vries M.C., Vaughan E.E., Kleerebezem M. *Lactobacillus plantarum* – survival, functional and potentional probiotic properties in the human intestinal tract // International Diary Journal. – 2006. – v.16. – pp. 1018–1028.

279. Nuňez M. Encyclopedia of food microbiology / C.A. Batt, M.L. Tortorello. – Academic press, 2014. – 3248 p.

280. Dib J.R., Liebl W., Wagenknecht M. et al. Extrachromosomal genetic elements in *Micrococcus* // Journal of Applied Microbiology and Biotechnology. – 2013. – v.97. – pp. 63–75.

281. Greenblatt C.L., Baum J., Klein B.Y. et al. *Micrococcus luteus* – survival in amber // Microbial Ecology. – 2004. – v.48. – pp. 120–127.

282. Hetem D.J., Rooijakkers S.H.M., Ekkelekamp M.B. Infectious diseases / J. Cohen, W.G. Powderly, S.M. Opal. – Elsevier, 2017. – 2016 p.

283. Austin B. Bergey's manual of systematic bacteriology: volume V / W. Whitman, M. Goodfellow, P. Kampfer, H-J. Busse, M. Trujillo. – Spinger, 2012. – 2083 p.

284. Maraki S., Papadakis I.S. *Rothia mucilaginosa* pneumonia // Infectious Diseases. – 2015. –v.47. – pp. 125–129.

285. Abidi M.Z., Ledeboer N., Banerjee A. et al. Morbidity and mortality attributable to *Rothia* bacteremia in neutropenic and nonneutropenic patients // Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases. – 2016. –v.85. – pp. 116–120.

286. Mahobia N., Chaudhary P., Kamat Y. *Rothia* prothetic knee joint infection: report and mini-review // New Microbes and New Infections. – 2013. –v.1. – pp. 2–5.

287. Almasaudi S.B. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogenes: epidemiology and resistance features // Saudi Journal of Biological Scinces. – 2018. –v.25. – pp. 586–596.

288. Erdem G., Leber A. Principles and practice of pediatric infectious diseases / S.S. Long, S.G. Prober, M. Fischer. – Elsevier, 2018. – 1688 p.

289. Towner K.J. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy // Journal of Hospital Infection. – 2009. – v.73. – pp. 355–363.

290. Bergogne-Bérézin E. *Acinetobacter* // Reference Module in Food Science. – 2014. – pp. 337–342.

291. Percival S., Williams D.W. Microbiology of waterborn diseases / S. Percival, D.W. Williams, N.F. Gray, M.V. Yates, R. Chalmers. – Academic press, 2014. – 696 p.

292. Petrosillo N., Drapeau C.M., Bella S.D. Emerging infectious diseases / Ö. Ergönűl, F. Can, L. Madoff, M. Akova. – Elsevier, 2014. – 420 p.

293. Meyer T.F., Hill S.A. Antigenic variation / A. Craig, A.Scherf. – Academic press, 2003. – 464 p.

294. Tonjum T., van Putten J. Infectious diseases / J. Cohen, W.G. Powderly, S.M. Opal. – Elsevier, 2017. – 2016 p.

295. Ison C., Robertson B. Encyclopedia of Immunology / P.J. Delves. – Academic press, 1998. – 3072 p.

296. Hsu K.K., Wangu Z. Principles and practice of pediatric infectious diseases / S.S. Long, S.G. Prober, M. Fischer. – Elsevier, 2018. – 1688 p.

297. Pollard A.J., Finn A. Principles and practice of pediatric infectious diseases / S.S. Long, S.G. Prober, M. Fischer. – Elsevier, 2018. – 1688 p.

298. Hossain Z. Encyclopedia of food safety / Y. Motarjemy. – Academic press, 2014. – 2304 p.

299. Burns J.L. Principles and practice of pediatric infectious diseases / S.S. Long, S.G. Prober, M. Fischer. – Elsevier, 2018. – 1688 p.

300. Adreani N.A., Fasolato L. The microbiological quality of food / A. Bevilacqua, M.R. Corbo, M. Sinigaglia. –Woodhaed Publishing, 2017. – 348 p.

301. Azam M.V., Khan A.U. Updates in pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa* // Drug Discovery Today. In Press.

302. Golemi-Kotra D. xPharm: the comprehensive pharmacology reference / S.J. Enna, D.B. Bylund. – Elsevier, 2008. – 1688 p.

303. Valentiny M., Gonzalez D., Mavridou D.A. et al. Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* // Current Opinion in Microbiology. – 2018. – v.41. – pp. 15–20.

304. Zago A., Chugani S. Encyclopedia of microbiology / M. Schaechter – Academic press, 2009. – 4600 p.

305. Karlowsky J.A., Hoban D.J., Hackel M.A. et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative ESKAPE pathogenes isolated from hospitalized patients with intra-abdominal and urinary tract infections in Asia-Pacific countries // Microbiology Society. – 2017. – v.66. – pp. 61–69.

306. Wu W., Jin Y., Bai F. et al. Molecular medical microbiology / Y-W. Tang, D. Liu, J. Schwartzman, M Sussman, I. Poxton. – Academic press, 2015. – 2216 p.

307. Schleifer K-H., Bell J.A. Bergey's manual of systematic bacteriology: volume III / P. Vos, G.M. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K-H. Schleifer, W.B. Whitman. – Spinger, 2009. – 1450 p.

308. Rubab M., Shahbaz H.M., Olaimat A.N. et al. Biosensors for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* in food // Biosensors and Bioelectronics. – 2018. – v.105. – pp. 49–57.

309. Gillaspy A.F., Iandolo J.J., Tang Y-W. et al. *Staphylococcus* // Reference Module in Biomedical Science. – 2014. – pp. 253–265.

310. Hennekinne J-A., Le Loir Y. Encyclopedia of food microbiology / C.A. Batt, M.L. Tortorello. – Academic press, 2014. – 3248 p.

311. Gillaspy A.F., Iandolo J.J. Encyclopedia of food microbiology / C.A. Batt, M.L. Tortorello. – Academic press, 2014. – 3248 p.

312. Horn J., Stelzner K., Rudel T. et al. Inside job: *Staphylococcus aureus* host-pathogen interactions // International Journal of Medical Microbiology. – 2018. – v.308. – pp. 607–624.

313. Mohammed Y.H.E., Manukmar H.M., Rakesh K.P. Vision for medicine: *Staphylococcus aureus* biofilm war and unlocking key's for anti-biofilm drug development // Microbial Pathogenesis. – 2018. – v.123. – pp. 339–347.

314. Zhang X., Hu X., Rao X. Apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* toxins // Microbiological Research. – 2017. – v.205. – pp. 19–24.

315. Mousavi M.N.S., Mehramuz B., Sadeghi J. et al. The pathogenesis of *Staphylococcus aureus* in autoimmune disease // Microbial Pathogenesis. – 2018. – v.123. – pp. 339–347.

316. Hossain Z. Encyclopedia of food safety / Y. Motarjemy. – Academic press, 2014. – 2304 p.

317. Peters J., Price J., Llewelyn M. *Staphylococcal* and *Streptococcal* infections // Medicine Journal. – 2017. – v.45. – pp. 727–734.

318. Gobbetti M., Classo M. Encyclopedia of food microbiology / C.A. Batt, M.L. Tortorello. – Academic press, 2014. – 3248 p.

319. Edwards M.S., Baker C.J. Principles and practice of pediatric infectious diseases / S.S. Long, S.G. Prober, M. Fischer. – Elsevier, 2018. – 1688 p.

320. Kotloff K.L. Plotkin's vaccines / S.A. Plotkin, P.A. Offit, W.A. Orenstein, K.M. Edwards. – Elsevier, 2018. – 1720 p.

321. Wilkening R.V., Federle M.J. Evolutionary constrainst shaping Streptococcus pyogenes host interactions // Trends in Microbiology. – 2017. – v.25. – pp. 562–572.

322. Teuber M. Bergey's manual of systematic bacteriology: volume III / P. Vos, G.M. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K-H. Schleifer, W.B. Whitman. – Spinger, 2009. – 1450 p.

323. Batt C.A. Encyclopedia of food microbiology / C.A. Batt, M.L. Tortorello. – Academic press, 2014. – 3248 p.

324. Mills S., Ross R.P., Coffey A. Lactic acid bacteria. *Lactococcus lactis* // Reference Module in Food Science. – 2011. – pp. 132–137.

325. Demarigny Y. Encyclopedia of food microbiology / C.A. Batt, M.L. Tortorello. – Academic press, 2014. – 3248 p.

326. Zhang X-Q., Ying Y., Ye Y. et al. *Thermus arciformis* sp.nov., a thermophilic species from geothermal area // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2010. – v.60. – pp. 834–839.

327. Brock T.D., Edwards M.R. Fine structure of *Thermus aquaticus*, an extreme thermophile // Journal of Bacteriology. – 1970. – v.104. – pp. 509–517.

328. Williams R.D.A., Smith K.E., Welch S.J. et al. DNA relatedness of *Thermus* strains, description of *Thermus brockianus* sp.nov., and proposal to reestablish *Thermus thermophilus* // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1995. – v.45. – pp. 495–499.

329. Kumwenda B., Litthauer D., Reva O. Analysis of genomic rearrangements, horizontal gene transfer and role of plasmids in the revolution of industrial important *Thermus* species // Genomics. – 2014. – v.15. – pp. 813–826.

330. Falagas M.E., Kastoris A.C., Vouloumanou E.K. et al. Atributable mortality of *Stenotrophomonas maltophilia* infections // Future Microbiology. – 2009. – v.4. – pp. 1103–1109.

331. Abbott I.J., Slavin M.A., Turnidge J.D. et al. *Stenotrophomonas maltophilia*: emerging disease patterns and challenges for treatment // Expert Review of Anti-infective Therapy. – 2011. – v.9. – pp. 471–488.

332. Penzak S.R., Abate B.J. *Stenotrophomonas maltophilia*: a multidrug-resistant nosocomial pathogen // Pharmacotherapy. – 1997. – v.17. – pp. 291–301.

333. Gherardi G., Creti R., Pompilio A. et al. An overview of various typing methods for clinical epidemiology of the emerging pathogen *Stenotrophomonas maltophilia* // Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases. – 2015. –v.81. – pp. 219–226.

334. Garazi M., Singer C., Tai J. et al. Bloodstream infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: a seven-year review// Journal of Hospital Infection. – 2012. – v.81. – pp. 114–118.

335. Osawa K., Shigemura K., Kitagawa K. et al. Risk factors for death from bacteremia // Journal of Infection and Chemotherapy. – 2018. – v.24. – pp. 632–636.

336. Harsing L.G., Matyus P. Mechanism of glycine release, which build up synaptic and extrasynaptic glycine levels: the role of synaptic and non-synaptic glycine transporters // Brain Research Bulletin. – 2013. – v.93. – pp. 110–119.

337. Zhong X., Li X., Qian L. et al. Glycine attenuates myocardial ischemia – reperfusion injury by inhibiting myocardial apoptosis in rats // Journal of Biomedical Research. – 2012. – v.26. – pp. 346–354.

338. Busanello E.N.B., Moura A.P., Viegas C.M. et al. Neurichemical evidence that glycine induces bioenergetical dysfunction // Neurochemistry International. – 2010. – v.56. – pp. 948–954.

339. Minami M., Ando T., Hashikawa S. Effect of glycine on *Helicobacter pylori* in vitro // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2004. – v.48. – pp. 3782–3788.

340. Hammes W., Schleifer K.H., Kandler O. Mode of action of glycine on the biosynthesis of peptidoglycan // Journal of Bacteriology. – 1973. – v.116. – pp. 1029–1053.

341. Tapias A., Wang Z-Q. Lysine acetylation and deacetylation in brain development and neuropathies // Genomics, Proteomics and Bioinformatics. – 2017. – v.15. – pp. 19–36.

342. Azevedo K., Saiardi A. Why always lysine? The ongoing tale of one of the most modified amino acid // Advances in Biological Regulation. – 2016. – v.60. – pp. 144–150.

343. Guridi J., Borgatello C., Scremin O.U. Arginine NO-dependent and NO-independent effects on hemodynamics // European Journal of Pharmacology. – 2014. – v.729. – pp. 138–143.

344. Albaugh V.L., Stewart M.K., Barbul A. Nutritional and functional foods for healthy aging/ R.R. Watson. – Academic press, 2017. – 386 p.

345. Gad M.Z. Anti-aging effects of L-arginine // Journal of Advanced Research. – 2010. – v.1. – pp. 169–177.

346. Platt S.R. The role of glutamate in central nervous system health and disease // The Veterinary Journal. – 2007. – v.173. – pp. 278–286.

347. Meldrum B.S. Glutamate as neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology // The Journal of Nutrition. – 2000. – v.130. – pp. 1007–1015.

348. Nedergaard M., Takano T., Hansen A.J. Beyond the role of glutamate as neurotransmitter // Nature Reviews. Neuroscience. – 2002. – v.3. – pp. 748–755.

349. Romani C., Palermo L., MacDonald A. et al. The impact of phenylalanine levels on cognitive outcome in adults with phenylketonuria: effects across tasks and developmental stages // Neuropsycology. – 2017. – v.31. – pp. 242–254.

350. Singh V., Rai R.K., Arora A. et al. Therapeutic implication of L-phenylalanine aggregation mechanism and its modulation by D-phenylalanine in phenylketonuria // Scientific Reports. – 2014. – v.4. – pp. 3875–3883.

351. Glushakov A.V., Dennis D.M., Sumners C. et al. L-phenylalanine selectively depresses currents at glutamatergic excitatory synapses // Journal of Neuroscience Research. – 2003. – v.72. – pp. 116–124.

352. Jongkese B.J., Hommel B., Colzato L.S. et al. Effect of tyrosine supplementation on clinical and healthy populations under stress or cognitive demands // Journal of Psychiaric Research. – 2015. – v.70. – pp. 50–57.

353. Hase A., Jung S.E., Rot M. Behavioral and cognitive effects of tyrosine intake in healthy human adults // Pharmacology, Biochemistry and Behaviour. – 2015. – v.133. – pp. 1–6.

354. Van de Rest O., Bloemendaal M., Heus R. et al. Dose-dependent effects of oral tyrosine administration on plasma tyrosine levels and cignition in aging // Nutrients. – 2017. – v.9. – pp. 1279–1293.

355. Richard D.M., Dawes M.A., Mathias C.W. et al. L-tryptophan: basic metabolic functions, behavorial research and therapeutic indications // Internation Journal of Tryptophan Research. – 2009. – v.2. – pp. 45–60.

356. Kaluzna-Czaplinska J., Gatarek P., Chirumbolo S. et al. How important is tryptophan in human health? // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2017. – v.58. – pp. 2794–2850.

357. Jenkins T.A., Nguyen J.C.D., Polglaze K.E. et al. Influence of tryptophan and serotonin on mood and cognition with a possible role of the gut-brain axis // Nutrients. – 2016. – v.8. – pp. 56–71.

358. Del Rio B., Redruello B., Linares D.M. et al. The dietary biogenic amines tyramine and histamine show synergistic toxicity towards intestinal cells in culture // Food Chemistry. – 2017. – v.218. – pp. 249–255.

359. Yadav T., Mukherjee V. et al. Structural modeling and spectroscopic investigation of isolated and hydrochloride tyramine neurotransmitter // Journal of Molecular Structure. – 2017. – v.1147. – pp. 702–713.

360. Linares D.M., Del Rio B., Redruello B. et al. Comparative analysis of the in vitro cytotoxicity of the dietary biogenic amines tyramine and histamine // Food Chemistry. – 2016. – v.197. – pp. 658–663.

361. Finberg J.P.M., Gillman K. et al. Selective inhibitors of monoamine oxidase type B and the “Cheese effect” // International Review of Neurobiology. – 2011. – v.100. – pp. 169–121.

362. McCabe-Sellers B.J., Staggs C.J., Bogle M.L. et al. Tyramine in foods and monoamine oxidase drugs: a crossroad where medicine, nutrition, pharmacy and food industry converged // Journal of Food Composition and Analysis. – 2006. – v.19. – pp. 58–65.

363. Shimazu S., Miklya I. Pharmacological studies with endogenous enhancer substances: β-phenyletylamine, tryptamine and their synthetic derivatives // Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry. – 2004. – v.28. – pp. 421–427.

364. Jones R.S.G. Tryptamine: a neuromodulator or neurotransmitter in mammalian brain? // Progress in Neurobiology. – 1982. – v.19. – pp. 117–139.

365. Khan M.Z., Nawaz W. The emerging roles of human trace amines and human trace amine-associated receptors in central nervous system // Biomedicine & Pharmacology. – 2016. – v.83. – pp. 439–449.

366. Sarkar P., Basak P., Ghosh S. et al. Prophylactic role of taurine and its derivatives against diabetis mellitus and its related complications // Food and Chemical Toxicology. – 2017. – v.110. – pp. 109–121.

367. Oja S.S., Saransaari P. Taurine and epilepsy // Epilepsy Research. – 2013. – v.104. – pp. 187–194.

368. Froger N., Moutsimilli L., Cadetti L. et al. Taurine: the comeback of a neutroceutical in the prevention of retinal degeneration // Progress in Retinal and Eye Research. – 2014. – v.41. – pp. 44–63.

369. Stapleton P.P., Charles L.P., Redmond H.P. et al. Tautine and human nutrition // Clinical Nutrition. – 1997. – v.16. – pp. 103–108.

370. Hamper B. August's consultations in feline internal medicine / S.E. Little. – Saunders, 2016. – 1072 p.

371. Dambrova M., Liepinsh E., Kalvinsh I. Mildronate: cardioprotective action through carnitine lowering effect // Trends in Cardiovascular Medicine. – 2002. – v.12. – pp. 275–279.

372. Meher B.R., Das S., Mohanty R.R. Meldonium: drug which brought disrepute to the sport // International Journal of Basic & Clinical Pharmacology. – 2017. – v.6. – pp. 1841–1846.

373. Jaudzems K., Kuka J., Gutsaits A. et al. Inhibition of carnitine acetyltransferase by mildronate, a regulator of energy metabolism // Journal of Enzyme Inhibition and Medical Chemistry. – 2009. – v.24. – pp. 1269–1275.

374. Sjakste N., Gutcaits A., Kalvinsh I. Mildroate: an antiishemic drug for neurological indications // CNS Drug Reviews. – 2005. – v.11. – pp. 151–168.

375. Dambrova M., Makrecka-Kuka M., Vilskersts R. et al. Pharmacological effects of meldonium: biochemical mechanism and biomarkers of cardiometabolic activities // Pharmacological Research. – 2016. – v.113. – pp. 771–780.

376. Oka H., Ito Y. Encyclopedia of separation science / I.D. Wilson. – Academic press, 2000. – 4502 p.

377. Kumar P. Pharmacology and therapeutics for dentistry / F.J. Dowd, B.S. Johnson, A.J. Mariotti. – Mosby, 2000. – 713 p.

378. Vardanyan R., Hruby V. Synthesis of Best-Seller Drugs / R. Vardanyan, V. Hruby. – Academic press, 2016. – 868 p.

379. Papich M.G. Saunder's handbook of veterinary drugs / M.G. Papich. – Saunders, 2016. – 1002 p.

380. Wiese A., Gutsmann T., Seydel U. Symmetric and asymmetric planar lipid bilayers of various lipid composition: a tool for studying mechanisms and lipid specificity of peptide/membrane interactions // Planar Lipid Bilayers and their Applications. – 2003. – v.20. – pp. 569–588.

381. Satlin M.J., Jenkins S.G. Infectious diseases / J. Cohen, W.G. Powderly, S.M. Opal. – Elsevier, 2017. – 2016 p.

382. Brown P., Dawson M.J. A perspective in the next generation of antibacterial agents derived by manipulation of natural products // Progress in medical chemistry. – 2015. – v.54. – pp. 135–184.

383. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. и др. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов. – М.: Академия, 2005. – 608 с.

384. De Man J.D., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of *Lactobacill* // Journal of Applied Bacteriology. – 1960. – v.23. – pp. 130–135.

385. Галынкин В.А., Заикина Н.А., Кочеровец В.И., Курбанова И.З. Питательные среды для микробиологического контроля качства лекарственных средств и пищевых продуктов / В.А. Галынкин, Н.А. Заикина, В.И. Кочеровец, И.З. Курбанова. – СПб.: Проспект Науки, 2006. – 336 с.

386. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual / J. Sambrook. – Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1987. –1546 p.

387. Srikannathan V., English G., Bui N.K. et al. Structural basis for type VI secreted peptidoglycan DL-endopeptidase function, specificity and neutralization in *Serratia marcescence* // Acta Crystallographica. – 2013. – v.69. – pp. 2468–2482.

388. Glauner B., Höltje J-V., Schwarz U. The composition of murein in Escherichia coli // The Journal of Biological Chemistry. – 1988. – v.263. – pp. 10088–10095.

389. Schleifer K.H., Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implication // Bacteriological Reviews. – 1972. – v.36. – pp. 407–477.

390. Gally D.L., Hancock I.C., Harwood C.R. et al. Cell wall assembly in *Bacillus megaterium*: incorporation of ntw peptidoglycan by monomer edition process // The Journal of Bacteriology. – 1991. – v.173. – pp. 2548–2555.

391. Whittle P.J., Anderson J.C. The likage of diaminopimelic acid in the peptidoglycan of *Bacillus megaterium* NCTC7581 // Biochimica et Biophysica Acta. – 1969. –v.192. – pp. 165–174.

392. Atrih A., Bacher G., Allmaier G. et al. Analysis of peptidoglycan structure from vegetative cells of *Bacillus subtilis* 78 and role of PBP 5 in peptidoglycan maturation // The Journal of Bacteriology. – 1999. – v.181. – pp. 3956–3966.

393. Dajkovich A., Tesson B., Chauhan S. et al. Hydrolysis of peptidoglycan is modulated by amidation of meso-diaminopimelic acid and Mg^{2+} in *Bacillus subtilis* // Molecular Microbiology. – 2017. – v.104. – pp. 972–988.

394. Chapot-Chartier M.P., Kulakauskas S. Cell wall structure and function in lactic acid bacteria // Microbial Cell Factories. – 2014. – v.13. – pp. 9–32.

395. Coyette J., Ghuysen J-M. Structure of the walls of *Lactobacillus acidophilus* // Biochemistry. – 1970. – v.9. – pp. 2935–2944.

396. Kandler O. Amino acid sequence of the murein and taxonomy of the genera *Lactobacillus, Bifidobacterium, Leuconostoc* and *Pediococcus* // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1970. – v.20. – pp. 491–507.

397. Leisico F., Vieira V., Figueirido T.A. et al. First insights of peptidoglycan amidation in Gram-positive bacteria – the high resolution crystal structure of *Staphylococcus aureus* glutamine aminotransferase GatD // Scientific Reports. – 2018. – v.8. – pp. 5331–5344.

398. Navarre W.W., Schneewend O. Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope // Microbiology and Molecular BiologyReviews. – 1999. – v.63. – pp. 174–229.

399. Park W., Matsuhashi M. *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus* peptidoglycan transglycolases that are not penicillin-binding proteins // Journal of Bacteriology. – 1984. – v.157. – pp. 538–544.

400. Muňoz E., Ghuysen J-M., Heymann H. Cell walls of *Streptococcus pyogenes* type 14 C polysaccharide-peptidoglycan and G polysaccharide-peptidoglycan complexes // Biochemistry. – 1967. – v.6. – pp. 3659–3670.

401. Shang G., Liu X., Lu D. et al. Structure insight into how *Pseudomonas aeruginosa* peptidoglycan hydrolase Tse1 and its immunity protein Tsi1 function // Biochemistry Jounal. – 2012. – v.448. – pp. 201–211.

402. Lee M., Batueqas M.T., Tomoshige S. et al. Exolytic and endolytic turnover of peptidoglycan by lytic transglycosylase Slt of *Pseudomonas aeruginosa* // Proceedings of the National Academy of Science. – 2018. – v.115. – pp. 4393–4398.

403. Fleck J., Mock M., Minck R. et al. The cell envelope of Proteus vulgaris isolation and characterization of the peptidoglycan component // Biochimica et Biophysica Acta. – 1971. –v.233. – pp. 489–503.

404. Olofsson G., Sparr E. Ionization constants of cardiolipin // PLoS One. – 2013. – v.8. – pp. 3040–3046

405. Sathappa M., Alder N.N. The ionization properties of cardiolipin and its variants in model bilayers // Biochimica et Biophysica Acta. – 2016. –v.1858. – pp. 1362–1372.

406. Graber Z.T., Thomas J., Johnson E. et al. Effect of H-bond donor lipids on phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate ionization and clustering // Biophysical Journal. – 2018. –v.114. – pp. 126–136.

407. Sohlenkamp C., Geiger O. Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways // FEMS. – 2016. –v.40. – pp. 133–159.

408. López-Lara I.M., Geiger O. Bacterial lipid diversity // Biochimica et Biophysica Acta. – 2017. –v.1862. – pp. 1287–1299.

409. Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M. Principles of biochemistry / D.L. Nelson, M.M. Cox. – Wort Publishers, 2004. – 1120 p.

410. Shah D., Shaikh A.R. Interaction of arginine, lysine and guanidine with surface residues of lysozyme: implication to protein stability // Journal of Biomolecule Structure and Dynamics. – 2016. – v.34. – pp. 104–114.

411. Smirnova E., Safenkova I., Stein-Margolina B. L-arginine induces protein aggregation and transformation of supramolecular structures of the aggregates // Amino Acids. – 2013. – v.45. – pp. 845–855.

412. Afonin P.V., Fokin A.V., Tsygannik A.N. Crystal structure of an anti-interleukin-2 monoclonal antibody Fab complexed with an antigenic nonapeptide // Protein Science. – 2001. – v.10. – pp. 1514–1521.

413. Waal N.D., Yang W., Oslob J.D. Identification of nonpeptidic small-molecule inhibitors of interleukin-2 // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2005. – v.15. – pp. 983–987.

414. Pellequer Y., Ollivon M., Barratt G. Formulation of liposomes associated with recombinant interleukin-2: effect on interleukin-2 activity // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2004. – v.58. – pp. 162–167.