

DOI: 10.37988/1811-153X_2024_2_66

[Ю.С. Кипарисов](#)¹,

к.м.н., ассистент кафедры ортопедической стоматологии

[Д.Г. Кипарисова](#)¹,

аспирант кафедры ортопедической стоматологии и ортодонтии

[А.П. Варуха](#)²,

ассистент кафедры организации стоматологической помощи, менеджмента и профилактики стоматологических заболеваний

[М.С. Подпорин](#)³,

к.м.н., м.н.с. лаборатории молекулярно-биологических исследований НИМСИ

[В.Н. Царев](#)³,

д.м.н., профессор, директор НИМСИ

[Е.В. Ипполитов](#)³,

д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-биологических исследований НИМСИ

[В.В. Подпорина](#)³,

студентка V курса лечебного факультета

[С.Д. Арутюнов](#)³,

д.м.н., профессор, зав. кафедрой цифровой стоматологии

¹ ЮУГМУ, 454092, Челябинск, Россия² СтГМУ, 355017, Ставрополь, Россия³ Российский университет медицины, 127006, Москва, Россия

Влияние рекомбинантного лактоферрина на антимикробную активность фитокомпозиции Мукосефт в отношении *S. intermedius* и *C. albicans*

Реферат. Изучали особенности изменения антимикробного действия фитопрепаратов в комплексе с белком лактоферрином в отношении микробных культур. Проверяли гипотезу о возможности профилактического применения данного антимикробного комплекса в отношении патогенов, инициирующих развитие инфекционных заболеваний полости рта. **Материалы и методы.** Заранее подготовленную бактериальную взвесь инокулировали в питательный бульон с предварительным добавлением лактоферрина, а также без него, и добавляли исследуемые образцы фитокомпозиций. В ходе автоматического культивирования в биореакторе RTS-8 (BioSan, Латвия) измеряли оптическую плотность микробной взвеси. Проводили анализ кривых развития культур, построенных по этим данным. **Результаты.** В динамике развития *S. intermedius* и *C. albicans* отмечали статистически достоверно значимые различия максимальной оптической плотности при добавлении Мукосефта относительно Тонзиннала, как с лактоферрином (для *S. intermedius* $p=0,0088$, для *C. albicans* $p=0,0090$), так и без его добавления (для *S. intermedius* $p=0,0086$, для *C. albicans* $p=0,0283$). Добавление лактоферрина в состав питательной среды способствует задержке экспоненциального развития клеток в среднем на 6 часов. При применении Мукосефта отмечались более низкие значения показателей оптической плотности в ключевых точках развития при анализе культивирования бактериальной (среднее снижение на 13%) и грибковой популяции (среднее снижение на 23%) в зависимости от предварительного добавления лактоферрина в питательную среду. **Заключение.** Возможное применение фитокомпозиций с лактоферрин-содержащими препаратами в комплексе пародонтологическом лечении, в том числе пациентов онкологического профиля, может способствовать нормализации микробиотических показателей. Биореактор RTS-8 позволяет получить воспроизводимые результаты, доступен и может быть рекомендован для получения объективных, сравнимых между собой, достоверных сведений о противомикробных свойствах лактоферрина.

Ключевые слова: мукосефт, лактоферрин, мукозит, онкология, биореактор, *S. intermedius*, *C. albicans*

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ:

Кипарисов Ю.С., Кипарисова Д.Г., Варуха А.П., Подпорин М.С., Царев В.Н., Ипполитов Е.В., Подпорина В.В., Арутюнов С.Д. Влияние рекомбинантного лактоферрина на антимикробную активность фитокомпозиции Мукосефт в отношении *S. intermedius* и *C. albicans*. — *Клиническая стоматология*. — 2024; 27 (2): 66—75. DOI: 10.37988/1811-153X_2024_2_66

[Yu.S. Kiparisov](#)¹,

PhD in Medical Sciences, assistant professor of the Prosthodontics Department

[D.G. Kiparisova](#)¹,

postgraduate at the Prosthodontics and orthodontics Department

[A.P. Varukha](#)²,

assistant at the Dental care organization, management, and prevention of dental diseases Department

[M.S. Podporin](#)³,

PhD in Medical Sciences, researcher at the Molecular biology research Laboratory of the Medico-dental research Institute

Effect of recombinant lactoferrin on the antimicrobial activity of phytocomposition Mucosept against *S. intermedius* and *C. albicans*

Abstract. The peculiarities of changes in the antimicrobial action of phytopreparations in complex with the protein lactoferrin with respect to microbial cultures were studied. The hypothesis about the possibility of prophylactic application of this antimicrobial complex against pathogens initiating the development of infectious diseases of the oral cavity was tested. **Materials and methods.** Pre-prepared bacterial suspension was inoculated into nutrient broth with or without preliminary addition of lactoferrin, and the tested samples of phytocompositions were added. The optical density of the microbial suspension was measured during automatic cultivation in an RTS-8 bioreactor (BioSan, Latvia). Culture development curves plotted against these data

V.N. Tsarev³,

PhD in Medical Sciences, professor, director of the Medico-dental research Institute

E.V. Ippolitov³,

PhD in Medical Sciences, professor, leading researcher of the Molecular biology research Laboratory

V.V. Podporina³,

5th year student at the Medical Faculty

S.D. Arutyunov³,

PhD in Medical Sciences, full professor of the Digital dentistry Department

¹ South Ural State Medical University, 454092, Chelyabinsk, Russia

² Stavropol State Medical University, 355017, Stavropol, Russia

³ Russian University of Medicine, 127006, Moscow, Russia

were analyzed. **Results.** In the dynamics of *S. intermedius* and *C. albicans* development, statistically significant differences of maximum optical density were observed when adding Mucosept versus Tonzinal, both with lactoferrin (for *S. intermedius* $p=0.0088$, for *C. albicans* $p=0.0090$) and without its addition (for *S. intermedius* $p=0.0086$, for *C. albicans* $p=0.0283$). Addition of lactoferrin to the nutrient medium composition promotes the delay of exponential cell development for an average of 6 hours. When using Mucosept, lower values of optical density indices at key points of development were observed when analyzing the cultivation of bacterial (average decrease by 13%) and fungal populations (average decrease by 23%) depending on the preliminary addition of lactoferrin to the nutrient medium. **Conclusions.** The possible use of phytocompositions with lactoferrin-containing preparations in complex periodontal treatment, including patients with oncological profile, can contribute to the normalization of microbiotic indices. The RTS-8 bioreactor allows obtaining reproducible results, is available and can be recommended for obtaining objective, comparable, reliable data on antimicrobial properties of lactoferrin.

Key words: mucosept, lactoferrin, mucositis, oncology, bioreactor, *S. intermedius*, *C. albicans*

FOR CITATION:

Kiparisov Yu.S., Kiparisova D.G., Varukha A.P., Podporin M.S., Tsarev V.N., Ippolitov E.V., Podporina V.V., Arutyunov S.D. Effect of recombinant lactoferrin on the antimicrobial activity of phytocomposition Mucosept against *S. intermedius* and *C. albicans*. *Clinical Dentistry (Russia)*. 2024; 27 (2): 66—75 (In Russian). DOI: 10.37988/1811-153X_2024_2_66

ВВЕДЕНИЕ

Все формы цитостатической терапии способны вызывать побочные эффекты, которые оказывают существенное влияние на качество жизни пациентов во время противоопухолевого лечения. Одним из побочных эффектов является острое воспаление тканей слизистой оболочки полости рта — оральный мукозит, одна из наиболее часто встречающихся форм осложнений постлучевого и постхимиотерапевтического воздействия. Обычно он возникает через 7–10 дней после приема цитостатических препаратов. Мукозит проявляется воспалительным отеком и гиперемией, а в последующем — изъязвлением слизистой оболочки рта, кровотечением и сильной болью, что может потребовать даже применения опиатов и парентерального питания. Повреждение тканей, обусловленное мукозитом, также обеспечивает условия для инвазии эндогенных бактерий хозяина в кровоток, провоцируя развитие бактериемии и сепсиса [1, 2]. Патомеханизмы мукозита рта, связанного с химиотерапией, до конца не выяснены, хотя за последнее десятилетие достигнут значительный прогресс в определении каскада деструктивных и воспалительных явлений [3]. Однако за пределами этой парадигмы связь между мукозитом и комменсальной бактериальной микрофлорой до сих пор плохо изучена [4, 5].

В настоящее время общепризнано, что разнообразие микроорганизмов, колонизирующих полость рта, сильно недооценивается [6]. Большинство видов бактерий не причиняют вреда в условиях нормально функционирующего здорового организма. Однако у пациентов со злокачественными новообразованиями хрупкий гомеостаз между защитой хозяина и комменсальными бактериями может быть нарушен самим раком, вторичным иммунодефицитом, связанным с раком, или используемыми фармпрепаратами. Нарушение гомеостаза может способствовать разрушению тканей слизистой оболочки полости рта после химиотерапии.

В исследованиях под руководством Y. Ye (2020) было показано, что бактериальный фон в полости рта у пациентов с развившимся после применения химиотерапии мукозитом, отличался гетерогенностью бактериального сообщества с более высоким микробным разнообразием по сравнению с группой пациентов без мукозита [7]. При этом вполне объяснимы возможные изменения количественного и качественного бактериального состава после начала химиотерапии у пациентов, у которых в дальнейшем развивается оральный мукозит, по сравнению с теми, у кого данной патологии не наблюдается. Это вполне согласуется с мнением о том, что ни один бактериальный таксон не может быть полностью ответственен за влияние на исход мукозита [8, 9].

Факт нарушения равновесия микробиоты полости рта также может быть связан с ослаблением иммунитета хозяина и системно измененной воспалительной реакции, вызванной злокачественными новообразованиями [10, 11]. При этом медиаторы воспаления могут оказывать селективное давление, в результате чего бактерии обладают большей способностью ускользать от фагоцитарной защиты хозяина и более высокой устойчивостью к окислительным состояниям, что характерно для патогенов человека.

Следовательно, профилактика и лечение инфекции в послеоперационном периоде пациентов с приобретенными дефектами головы и шеи онкологического генеза сопряжена с определенными трудностями из-за невозможности проведения полноценной гигиены, с одной стороны, и нарушения взаимоотношения макроорганизма с его микробиомом, с другой [12, 13]. Разработки специальных методологических подходов, а также изучение комплексного влияния препаратов для лечения и профилактики мукозитов и его осложнений должны коррелироваться с позиции изучения патогенеза данного заболевания с акцентом на возможную связь с комменсальными представителями микробиома полости рта, включая грибы, вирусы и бактериофаги [14, 15]. По данным литературы, значительную роль в этих

процессах играют представители стрептококков, анаэробных видов и дрожжевых грибов *Candida* [14].

Результаты данных исследований могут способствовать разработке более эффективных профилактических методов лечения и улучшенных протоколов вмешательства при лечении мукозита полости рта, адаптированных к персонифицированному подходу к пациенту.

Лактоферрин представляет собой железосвязывающий гликопротеин семейства трансферринов (ММ=80 кДа), который входит в состав не только грудного молока, но и молозива, слезной жидкости, слюны, вторичных гранул нейтрофилов, обнаруживается в околоплодных водах [16, 17]. Лактоферрин способен оказывать противомикробное действие по отношению к широкому кругу микроорганизмов, таких как бактерии, грибы, вирусы и паразиты [18, 19]. Одним из механизмов достижения противомикробной активности лактоферрина является его способность к хелатированию, что в результате создает условия по связыванию ионов железа. При воспалительных реакциях свободное двух- и трехвалентное железо в большом количестве выделяется в очаге воспаления из поврежденных клеток и в отсутствие его усвоения способствует росту числа активных кислородных радикалов, что еще больше усугубляет тканевое повреждение. При этом, конкурируя с микроорганизмами за этого важный для них микроэлемент, лактоферрин снижает интенсивность их развития [20].

Цель — экспериментальное обоснование противомикробной эффективности сочетанного применения фитокомпозиционных препаратов и лактоферрина в отношении представителей условно-патогенной микробиоты полости рта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальная модель исследования была реализована за счет автоматизации процессов периодического микробного культивирования с использованием мультиканального биореактора RTS-8 (BioSan, Латвия). Аппарат неинвазивно измеряет оптическую плотность (OD) культуры в режиме реального времени. Регистрация основных точек развития микробной популяции проводилась в единицах мутности по МакФарланду (ед. McF), на основании которых строили график развития клеток. На кривых роста выделяли ключевые этапы культивирования: лаг-фазу, лог-фазу экспоненциально-го роста, стационарную фазу и фазу отмирания.

Для определения противомикробной эффективности выбрали фитокомпозиции Мукосепт (березовый гриб чага, цветы и листья кипрея, цветы календулы, цветы пижмы, цветы ромашки, лист подорожника, лист брусники, лист березы, корень аира, корень солодки, корень лопуха, трава тысячелистника, мята, череда, чистотел) и Тонзилнал (трава зверобоя, цветки календулы, плоды шиповника, трава тысячелистника, корень солодки, морская соль, аскорбиновая кислота, лактоза).

Растворы исследуемых фитокомпозиций готовили по инструкции изготовителя, фильтровали на стерильных мембранных фильтрах и доводили до концентрации

300 мг/мл. В исследовании использовали наработанный биоаналог лактоферрина человека (ИБГ РАН) в конечной концентрации 0,1 мг/мл. В ходе эксперимента проверяли гипотезу о возможности изменения тенденции развития микробных клеток при отсроченном добавлении фитокомпозиций с лактоферрином и без его добавления в период от перехода культуры в лог-фазу до снижения скорости размножения.

В качестве положительного контроля эффективности подавления микробного развития был использован 0,05%-ный раствор хлоргексидина биглюконат при МПК₉₀ 25 мкг/мл.

С учетом данных о качественном составе микробиоты полости рта и закономерностей формирования микробных ассоциаций в качестве приоритетных видов микроорганизмов были выбраны следующие представители условно-патогенной группы:

Streptococcus intermedius — аэротолерантная анаэробная комменсальная бактерия с широким патогенным потенциалом, входящая в группу *Streptococcus anginosus*, и часто ассоциированная с воспалительными процессами в тканях пародонта;

Candida albicans — дрожжеподобный грибок, возбудитель оппортунистических инфекций.

Для каждого микроорганизма микробную взвесь чистой культуры стерильным физраствором доводили до мутности 0,5 ед. McF (примерно $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл). Затем микробные взвеси разбавляли в 1000 раз до $5 \cdot 10^5$ КОЕ/мл и добавляли в стерильный питательный бульон (20 мл) с последующим периодическим добавлением 1 мл исследуемых фитокомпозиций в логарифмический период развития культуры (табл. 1). Логарифмический период развития определяли по развитию микробных популяций в контрольных образцах. Промежуток между первым и вторым добавлением фитокомпозиций определялся длительностью логарифмического периода и составил 4 часа для *S. intermedius* и 3 часа — для *C. albicans*.

При сохранении условий периодического культивирования каждый эксперимент выполнялся в 5 повторах.

Культивирование проводили в течение 36 часов в стерильных центрифужных пробирках объемом 50 мл в жидких питательных средах Himedia (Индия): бульоне для стрептококков по Тодд—Хьюиту для *S. intermedius* и среде Сабуро для *C. albicans*. При достижении культурой ключевых точек развития проводили контрольные высевы 0,1 мкл микробной взвеси на плотную питательную среду (кровяной агар для *S. intermedius*, среду Сабуро для *C. albicans*) с целью подтверждения

Таблица 1. Время внесения фитокомпозиций и продолжительность периода логарифмического роста (в ч)

Table 1. Time of application of phytocompositions and duration of the period of logarithmic growth (in hours)

	<i>S. intermedius</i>		<i>C. albicans</i>	
	без ЛФ	с ЛФ	без ЛФ	с ЛФ
Первое добавления	6	8	4	6
Второе добавление	10	12	7	9
Начало и конец лог-фазы	6–12	8–16	4–8	6–12

жизнеспособности популяции, а также сопоставления КОЕ с оптической плотностью микробной взвеси.

Для сравнения скорости изменения оптической плотности в логарифмической фазе рассчитывали межквартильный диапазон (IQR) и вычисляли угол наклона линейного тренда.

При статистическом анализе кривых развития микробных популяций использовали построение полиномиального тренда с проверкой степени соответствия трендовой модели исходным данным (R^2). Для сравнения оптической плотности в ключевых точках использовали критерий Краскела—Уоллиса.

РЕЗУЛЬТАТЫ

По результатам культивирования клинического изолята *S. intermedius* в контрольной пробирке без лактоферрина первоначальные изменения OD были зарегистрированы с 4-го часа эксперимента. Период ускоренного развития популяции (P-1) продолжался на протяжении 2 часов с последующим интенсивным увеличением OD, что было сопоставимо с началом экспоненциальной фазы развития бактериальных клеток. Логарифмический период (P-2), регистрируемый с 6-го по 12-й час, характеризовался повышением скорости бактериального прироста и уменьшением времени генеративной активности клеток, что способствовало наращиванию микробной биомассы и достижению ключевой точки α (12-й час) на пике экспоненциального периода — $3,1 \pm 0,3$ ед. McF. В процессе культивирования популяции происходит изменение состава среды, и, учитывая интенсивный характер развития бактериальной популяции в экспоненциальной фазе (IQR=2,88), в дальнейшем отмечалось удлинение фазы генеративной активности, а также снижение интенсивности клеточного развития. Данный период (P-3)

отмечался на промежутке с 12-го по 14-й час, с последующим постепенным достижением ключевой точки β (14-й час) с $OD=3,4 \pm 0,3$ ед. McF. В стационарной фазе развития (14–22-й час) не отмечалось существенных изменений OD, а ее среднее значение составило $3,4 \pm 0,3$ ед. McF (рис. 1).

При культивировании контрольного образца с лактоферрином отмечали пролонгацию адаптивной фазы развития до 6-го часа с дальнейшим изменением скорости развития бактериальных клеток в период ускоренного развития (до 8-го часа; табл. 2).

Таблица 2. Определение наклона линейной регрессии логарифмической фазы развития при культивировании *S. intermedius* с фитокомпозициями

Table 2. Determination of the slope of linear regression of the logarithmic phase of development during cultivation of *S. intermedius* with phytocompositions

	Временной промежуток, ч	Угол наклона	
		абс.	изменение, %
Без лактоферрина			
<i>S. intermedius</i>	6–12	0,490	0
<i>S. intermedius</i> + физраствор	6–12	0,464	–5,3
<i>S. intermedius</i> + Мукоцепт	6–14	0,333	–32,0
<i>S. intermedius</i> + Тонзилал	6–12	0,421	–14,0
С лактоферрином			
<i>S. intermedius</i> + ЛФ	8–16	0,288	0
<i>S. intermedius</i> + ЛФ + физраствор	8–16	0,269	–6,6
<i>S. intermedius</i> + ЛФ + Мукоцепт	10–18	0,211	–26,7
<i>S. intermedius</i> + ЛФ + Тонзилал	10–16	0,297	3,1

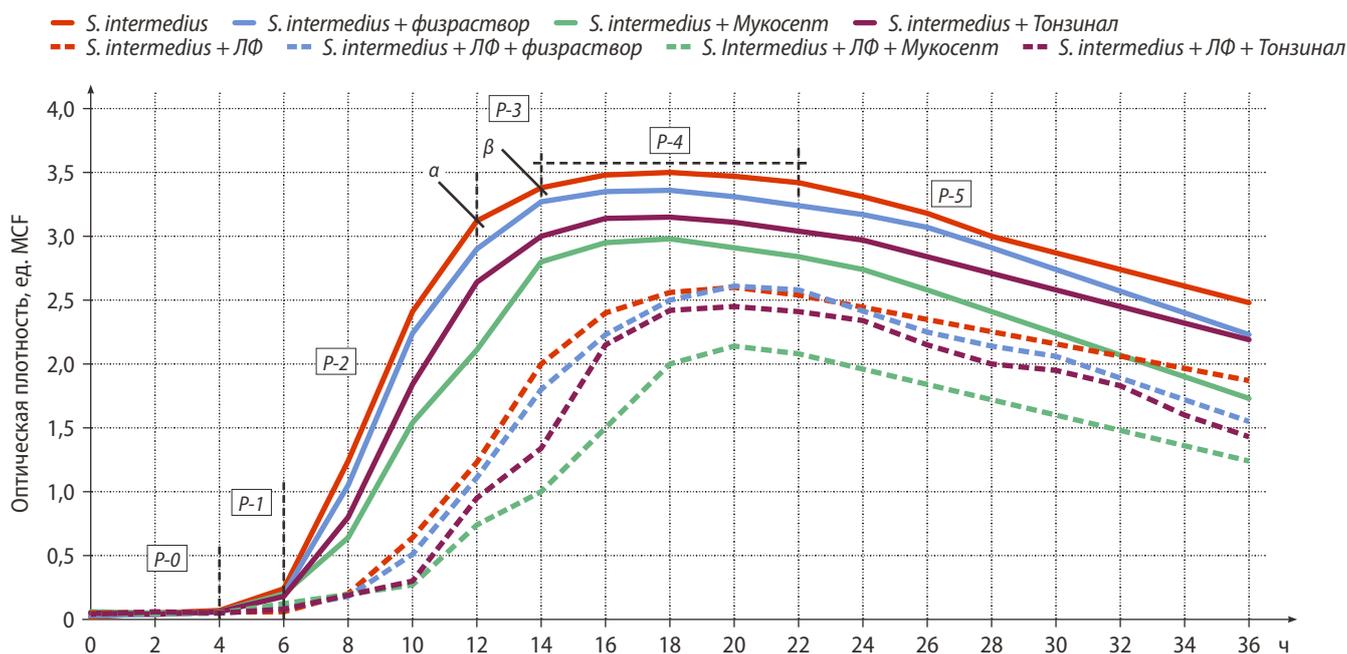


Рис. 1. Оптическая плотность микробной взвеси *S. intermedius* при культивировании с добавлением фитокомпозиций

Fig. 1. Optical density of microbial suspension of *S. intermedius* during cultivation with the addition of phytocompositions

Таблица 3. Межквартильный диапазон (IQR) оптической плотности при культивировании *S. intermedius* с фитокомпозициями

Table 3. Interquartile range (IQR) of optical density when cultivating *S. intermedius* with phytocompositions

	Временной промежуток, ч	IQR, ед. McF	
		абс.	изменение, %
Без лактоферрина			
<i>S. intermedius</i>	4–14	2,88	0
<i>S. intermedius</i> + физраствор	4–14	2,69	–6,6
<i>S. intermedius</i> + Мукосепт	4–16	2,59	–10,0
<i>S. intermedius</i> + Тонзилал	4–14	2,46	–14,6
С лактоферрином			
<i>S. intermedius</i> + ЛФ	6–18	2,19	0
<i>S. intermedius</i> + ЛФ + физраствор	6–18	2,05	–6,4
<i>S. intermedius</i> + ЛФ + Мукосепт	6–18	1,32	–39,7
<i>S. intermedius</i> + ЛФ + Тонзилал	6–18	1,84	–16,0

Тенденция развития бактериальной популяции при добавлении исследуемых образцов фитокомпозиций без лактоферрина не способствовала пролонгации адаптивной фазы культивирования при сравнении с положительным (эталонным) контролем, а также с образцом в присутствии физраствора в качестве отягощающего фактора. На протяжении логарифмического периода (6–12-й час) после первичного добавления фитокомпозиций, не отмечалось достоверной разницы изме-

нения скорости развития популяции, однако после повторного добавления образца Мукосепт на промежутке с 10-го по 14-й час отмечалось незначительное падение интенсивности увеличения значения OD, что способствовало более позднему достижению ключевой точки α (14-й час). При анализе развития образца с добавлением фитопрепарата Тонзилал, подобных временных изменений ключевых значений оптической плотности не выявлено. При сравнении межквартильного размаха оптической плотности интенсивность развития культуры была несколько ниже для образца Тонзилал (2,46 ед. McF), однако в точке β оптическая плотность обоих образцов составила 2,9 и 3,0 ед. McF соответственно ($p=0,3443$). Относительное отклонение значения OD в точке β от контрольного образца – 9–12%, что статистически значимо ($p=0,0012$; табл. 3).

При анализе развития бактериальной популяции с фитокомпозициями и предварительным добавлением к питательному бульону белка лактоферрина в образце с добавлением сбора Мукосепт была отмечена наименьшая интенсивность увеличения показателя оптической плотности по сравнению с образцом Тонзилал (рис. 2), что подтверждалось меньшим значением межквартильного диапазона в экспоненциальной фазе и большим углом наклона прямой в логарифмическом периоде. Экспоненциальная фаза регистрировалась на промежутке 6–18 часов с регистрацией пролонгированных ключевых точек развития. М-концентрация для образцов Мукосепт и Тонзилал была достигнута к 18-му часу с OD $2\pm 0,3$ и $2,42\pm 0,3$ ед. McF соответственно, что статистически отличалось между собой ($p=0,0090$), а также от аналогичных ключевых точек в контрольном образце ($p=0,0030$; табл. 4).

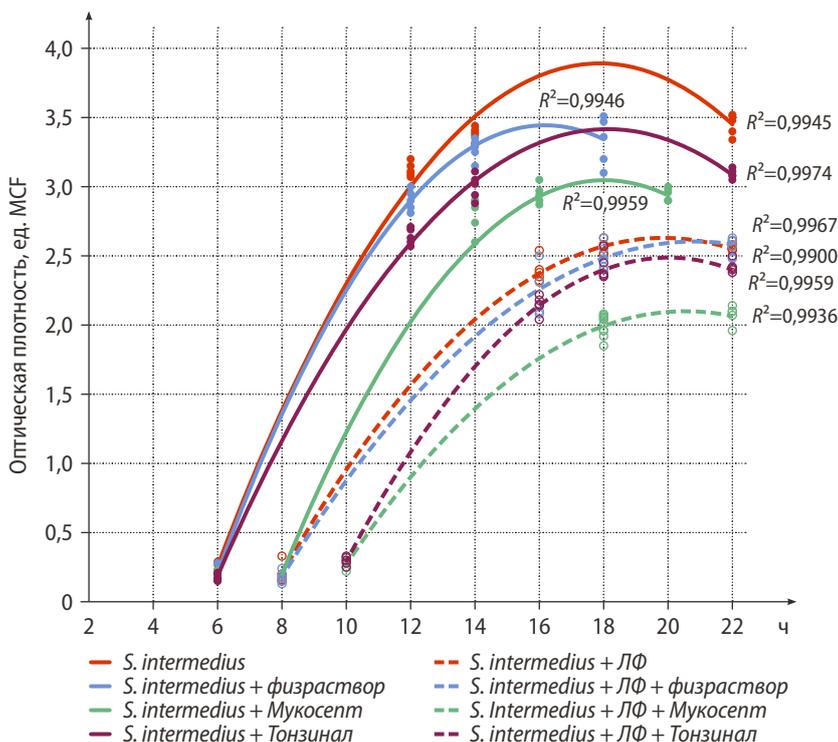


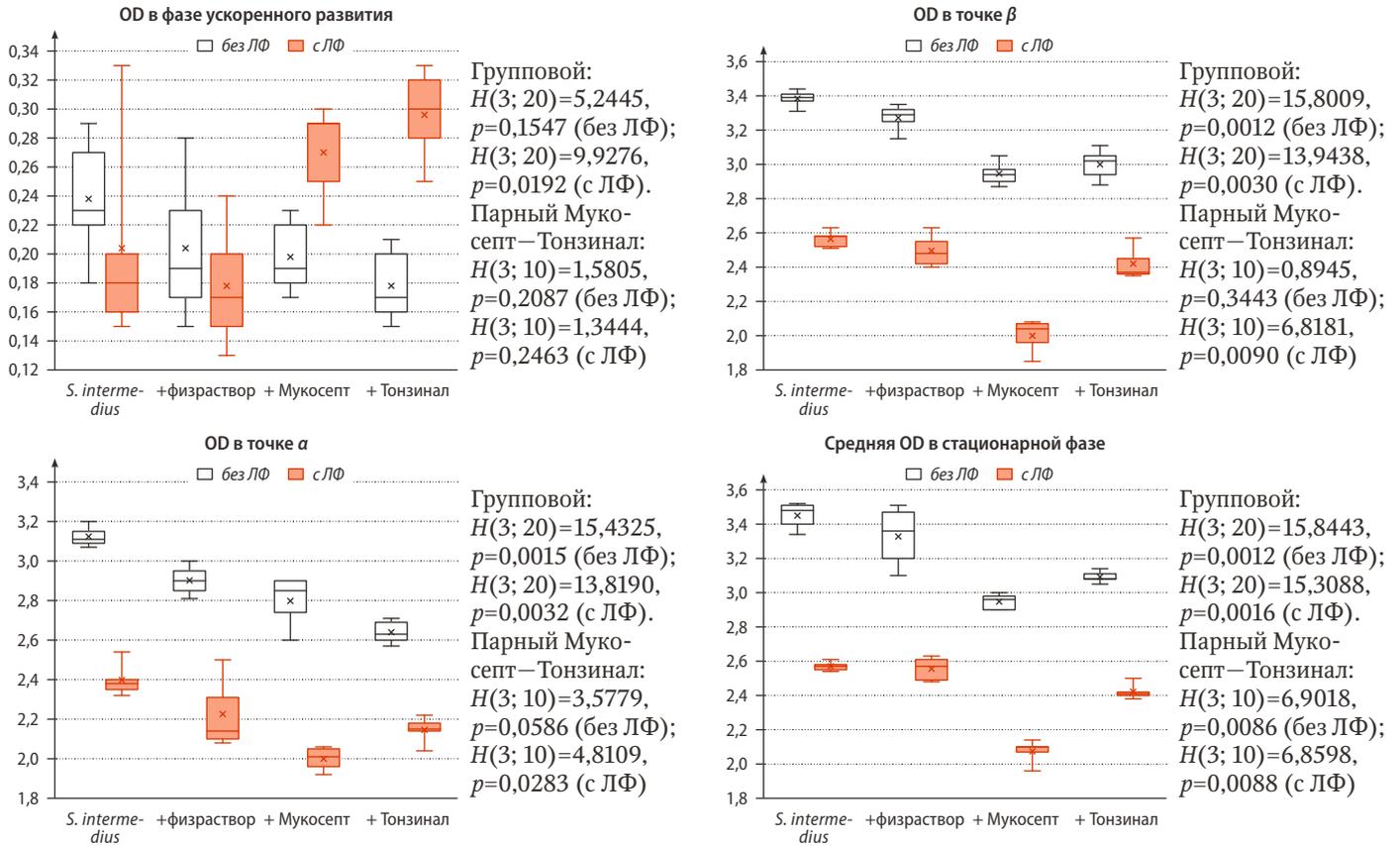
Рис. 2. Полиномиальный тренд и расчет коэффициента аппроксимации при культивировании *S. intermedius*

Fig. 2. Polynomial trend and calculation of the approximation coefficient for the cultivation of *S. intermedius*

Развитие бактериальных клеток в образцах с добавлением антисептика и в контрольном образце стерильного питательного бульона не наблюдали.

По результатам культивирования клинического изолята *C. albicans* в контрольной пробирке без лактоферрина заметная интенсивность клеточного развития отмечалась уже со 2-го часа культивирования. Непродолжительный период ускоренного развития популяции (P-1) быстро перешел в эффективное экспонентное развитие клеток (IQR=3,79), с последующей регистрацией ключевых точек культивирования в контрольном образце: в точке α – $3,4\pm 0,3$ ед. McF (8-й час), в точке β – $4,3\pm 0,3$ ед. McF (12-й час). В процессе накопления биомассы было отмечено замедление скорости размножения популяции (8–12-й час) и увеличение времени генерации. Истощение питательной среды привело к установлению баланса отмирающих и вновь образующихся клеток. Средний показатель значения OD в стационарной фазе развития (период P-4) – $4,3\pm 0,3$ ед. McF (12–20-й час). В результате истощения

Таблица 4. Значения непараметрического критерия Краскала — Уоллиса (H) в ключевых точках культивирования *S. intermedius* при добавлении фитокомпозиций
Table 4. Values of the nonparametric Kruskal—Wallis criterion (H) at key points of cultivation of *S. intermedius* with the addition of phytocompositions



питательного бульона и накопления большого количества токсических продуктов метаболизма дальнейший процесс культивирования характеризовался пролонгированной фазой отмирания (рис. 3).

При культивировании контрольного образца с предварительным добавлением лактоферрина отмечалась значительная пролонгация фазы ускоренного развития клеток, что было отмечено более низким значениями

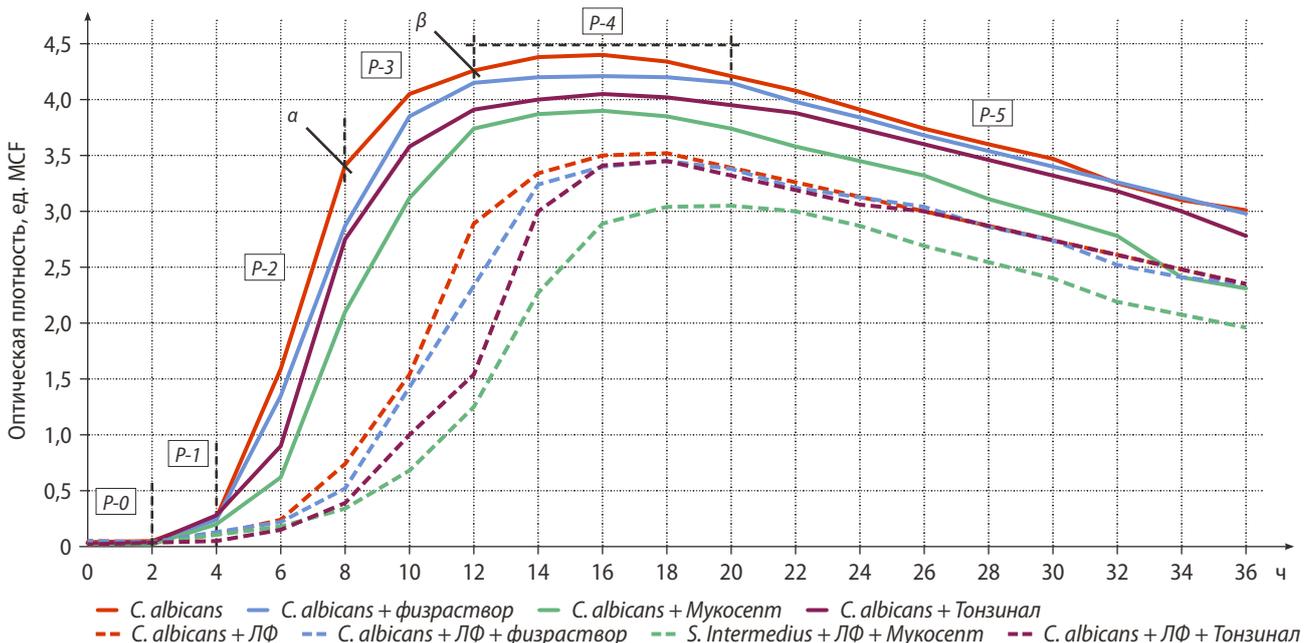


Рис. 3. Оптическая плотность микробной взвеси *C. albicans* при культивировании с добавлением фитокомпозиций

Fig. 3. Optical density of the microbial suspension of *C. albicans* when cultivated with the addition of phytocompositions

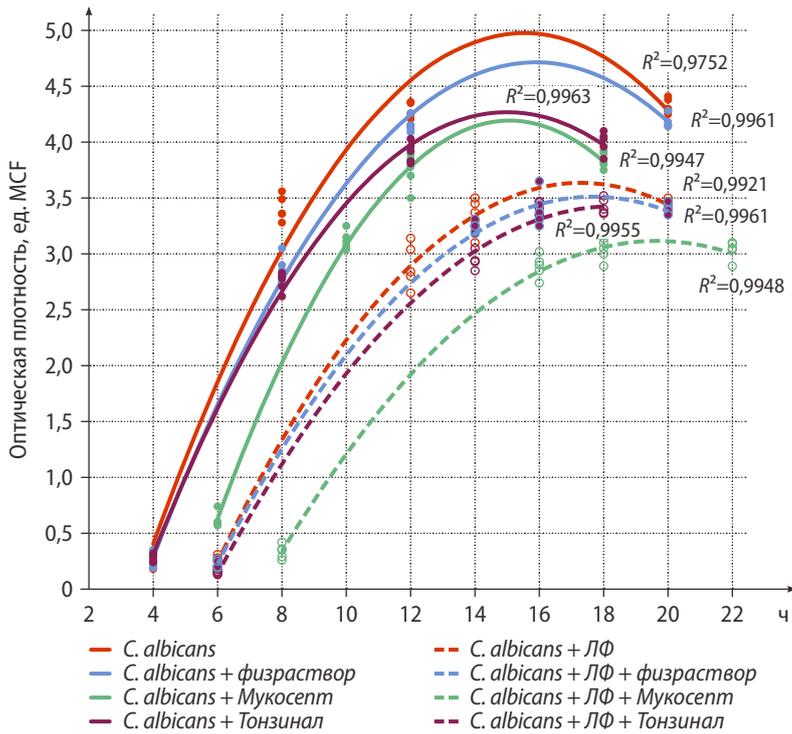


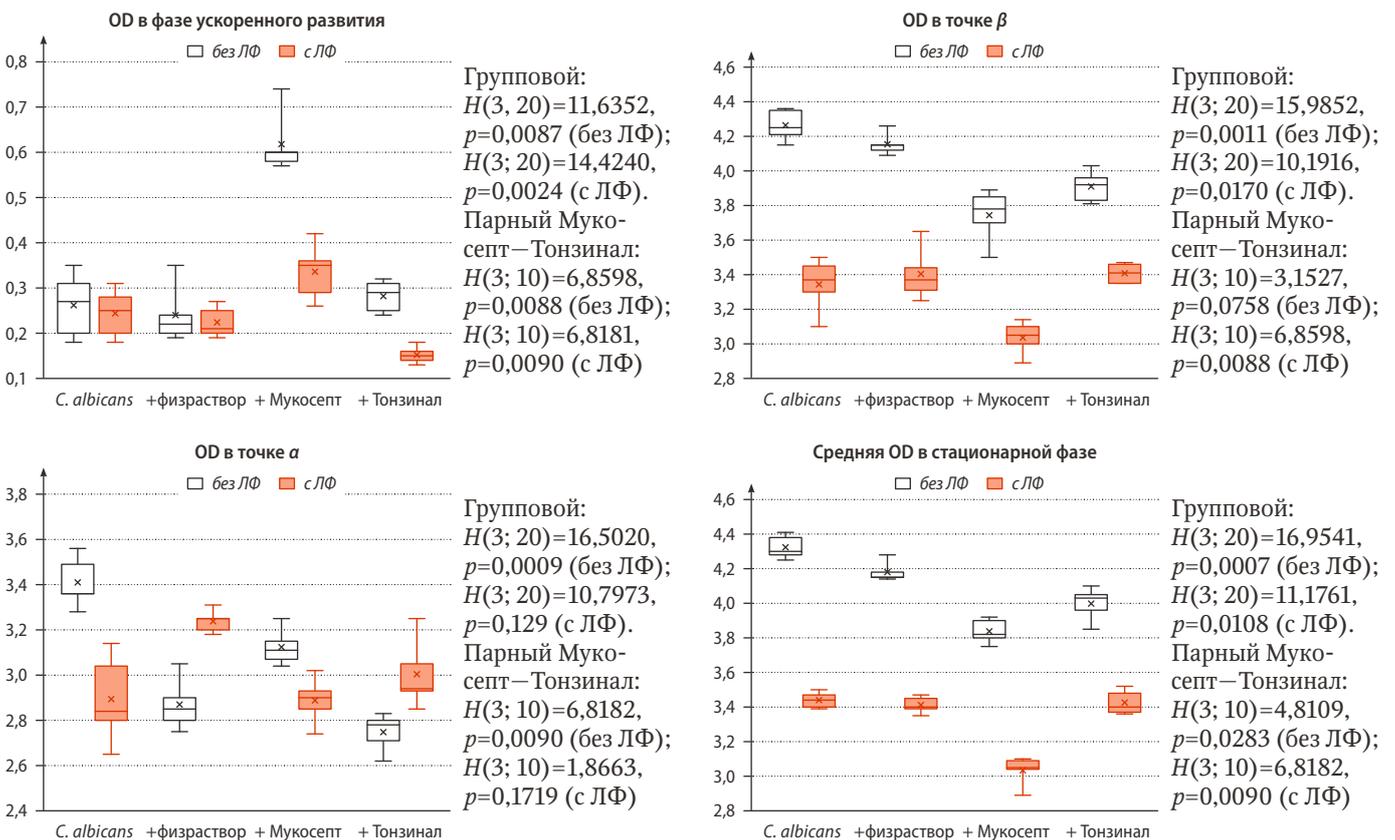
Рис. 4. Полиномиальный тренд и расчет коэффициента аппроксимации при культивировании *C. albicans*

Fig. 4. Polynomial trend and calculation of the approximation coefficient for the cultivation of *C. albicans*

межквартильного диапазона. При этом за счет задержки экспоненциального развития клеток, ключевые точки развития культуры были значительно отсрочены, а регистрируемые значения OD статистически значимыми, относительно образца без добавления лактоферрина в питательный бульон: показатель $\alpha - 2,8 \pm 0,3$ ед. МСФ (12-й час), показатель $\beta - 3,4 \pm 0,3$ ед. МСФ (14-й час). В сравнении с предыдущим образцом, относительное отклонение среднего значения показателя оптической плотности в стационарной фазе развития составило 20,4% (рис. 4).

Характер развития грибковой популяции при добавлении исследуемых образцов фитокомпозиций без комбинации с лактоферрином отражал незначительную задержку начала экспоненциальной фазы развития клеток у обоих образцов за счет удлинения периода ускоренного развития (до 6-го часа эксперимента). При этом относительно контрольного образца статистически значимой разницы в скорости увеличения оптической плотности периода экспоненты не отмечено. Учитывая нестабильность по увеличению показателя оптической плотности, следует предположить, что скорость роста и скорость генерации клеток в данном эксперименте была непостоянной и в момент повторного добавления фитокомпозиций в образец

Таблица 5. Значения непараметрического критерия Краскела — Уоллиса (H) в ключевых точках культивирования *C. albicans* при добавлении фитокомпозиций
Table 5. Values of the non-parametric Kruskal—Wallis test (H) at key points of cultivation of *C. albicans* with the addition of phytocompositions



с применением сбора Мукосефт была сохранена тенденция замедления скорости увеличения оптической плотности, что способствовало отсроченному достижению ключевой точки α ($3,1 \pm 0,3$ ед. McF на 10-й час) относительно образца «Тонзинал», и это было статистически значимо ($p=0,0090$). При этом время достижения ключевой точки культивирования при М-концентрации было зарегистрировано одновременно для Мукосефта — $3,7 \pm 0,3$ ед. McF (12-й час) и для Тонзинала — $3,9 \pm 0,3$ ед. McF (12-й час). Отмечена статистически значимая разница в значении OD в данной точке относительно контрольного образца, где был использован физраствор в качестве отягощающего фактора ($p=0,0011$).

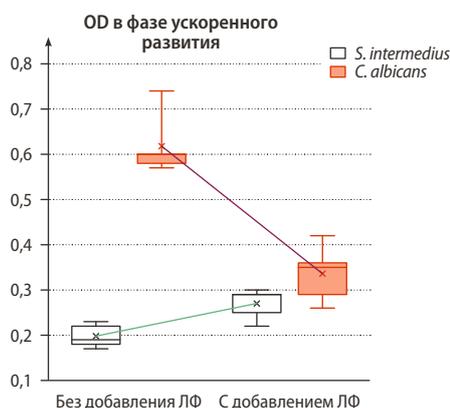
При анализе развития грибковой популяции с фитокомпозициями и лактоферрином в образце, где был использован Мукосефт, по аналогии с предыдущим экспериментом наблюдалось падение интенсивности по увеличению OD в результате пролонгации периода ускоренного развития. При наблюдаемой сопоставимой тенденции развития микробной популяции контрольного образца с лактоферрином в данном варианте дополнительно к измененным показателям генеративной активности, выраженных в значениях IQR и в расчете угла наклона кривой (табл. 5, 6) справедливы и статистически значимы более низкие значения оптической плотности в ключевых точках развития культуры ($p=0,0088$): показатель α (16-й час) — $2,9 \pm 0,3$ ед. McF, показатель β

Таблица 6. Межквартильный диапазон (IQR) оптической плотности при культивировании *C. albicans* с фитокомпозициями
Table 6. Interquartile range (IQR) of optical density when cultivating *C. albicans* with phyto compositions

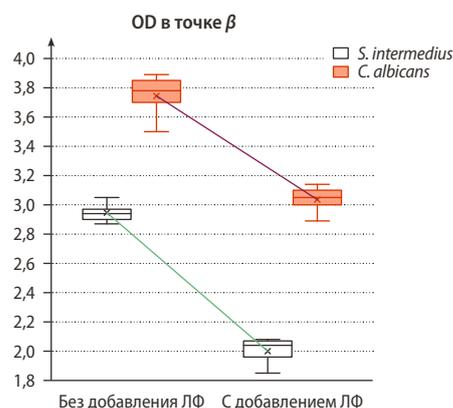
	Временной промежуток, ч	IQR, ед. McF	
		абс.	изменение, %
Без лактоферрина			
<i>C. albicans</i>	2–12	3,79	0
<i>C. albicans</i> + физраствор	2–12	3,61	-4,7
<i>C. albicans</i> + Мукосефт	2–12	2,92	-22,9
<i>C. albicans</i> + Тонзинал	2–12	3,3	-12,9
С лактоферрином			
<i>C. albicans</i> + ЛФ	4–14	2,65	0
<i>C. albicans</i> + ЛФ + физраствор	2–16	2,63	-0,7
<i>C. albicans</i> + ЛФ + Мукосефт	2–18	2,44	-7,9
<i>C. albicans</i> + ЛФ + Тонзинал	4–16	2,85	7,5

при М-концентрации (18-й час) — $3 \pm 0,3$ ед. McF. В случае использования Тонзинала не удалось определить значимых статистических различий относительно применения исключительно лактоферрина при культивировании, однако относительно эталонного контрольного образца отличия были показательны и наглядны.

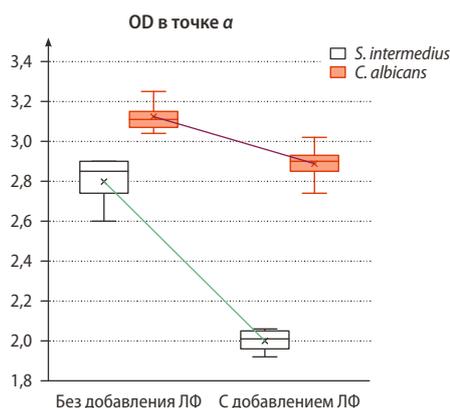
Таблица 7. Значения непараметрического критерия Краскела—Уоллиса (H) в ключевых точках культивирования *S. intermedius* и *C. albicans* при добавлении Мукосефта с лактоферрином и без него
Table 7. Values of the non-parametric Kruskal—Wallis test (H) at key points of cultivation of *S. intermedius* and *C. albicans* with the addition of Mucosept with and without lactoferrin



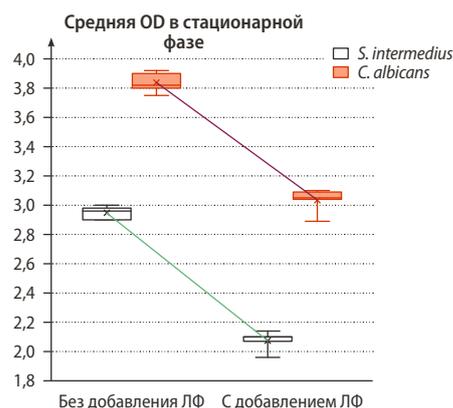
S. intermedius:
 $H(1, 10)=5,3448$,
 $p=0,0208$
C. albicans:
 $H(1, 10)=6,8598$,
 $p=0,0088$



S. intermedius:
 $H(1, 10)=6,8181$,
 $p=0,0090$
C. albicans:
 $H(1, 10)=6,8148$,
 $p=0,0084$



S. intermedius:
 $H(1, 10)=6,8598$,
 $p=0,0088$
C. albicans:
 $H(1, 10)=6,8182$,
 $p=0,0090$



S. intermedius:
 $H(1, 10)=6,9018$,
 $p=0,0086$
C. albicans:
 $H(1, 10)=6,8182$,
 $p=0,0090$

Развития микробной популяции в образцах с добавлением антисептика и в контрольном образце стерильности питательного бульона не наблюдалось.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данном эксперименте наглядно продемонстрирована разница в показателе оптической плотности при сравнении ключевых точек развития популяции с добавленными фитокомпозициями, в частности с Мукосептом, как в случае с предварительным введением лактоферрина в питательную среду, так и без него (см. табл. 6). При использовании лактоферрина в ключевых точках α и β отмечалось статистически значимое снижение OD, что позволяет рассуждать о более низких значениях КОЕ при культивировании микробной популяции (табл. 7).

В проведенных экспериментах это было отражено в расчете межквартильного индекса (IQR) динамики изменения показателя оптической плотности в экспоненциальной фазе развития (см. табл. 3). Данный метод описательной статистики является мерой статистической дисперсии, которая представляет собой разброс средних 50% значений на выбранном промежутке.

Более низкие значения межквартильного индекса показывают, что интенсивность увеличения показателя оптической плотности при добавлении отягощающего фактора (лактоферрин/фитокомпозиция) была снижена, а следовательно, скорость развития микробных клеток была вариабельна в проведенных экспериментах. Во всех случаях культивирования с предварительным добавлением лактоферрина в питательный бульон отмечалось статистически значимое снижение значения IQR, а при использовании фитокомпозиций — чаще только в отношении Мукосепта.

Для устранения метаболических нарушений и ослабления местного иммунитета, возникающих при онкологических заболеваниях, широкое применение получили фитокомпозиции, которые обладают лимфодренажным, детоксицирующим, антимикробным и мягким иммуномодулирующим воздействием [21]. По результатам проведенных экспериментов следует отметить, что фитокомпозиция Мукосепт способствует более продолжительной задержке развития микробных

клеток в начальных этапах культивирования популяции, а также при повторных добавлениях, что способствует изменению тенденции развития клеток в сравнении с контрольным образцом и образцом сравнения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенных экспериментов следует заключить, что фитокомпозиция Мукосепт в сочетании с белком-лактоферрином способствует более продолжительной задержке развития микробных клеток в начальных этапах культивирования популяции, а также способствует частичному ингибированию микробных клеток при их интенсивном развитии. При анализе данных проведенных экспериментов предположение более выраженного бактериостатического действия используемых фитокомпозиций отмечены для препарата Мукосепт.

Таким образом, возможные способы профилактического и лечебного применения в полости рта как человеческого лактоферрина, в том числе в виде рекомбинантного препарата, так и лактоферрина животных разнообразны и зависят от особенностей патологического процесса, но практически все они получили подтверждение эффективности на клиническом уровне при отсутствии побочного действия.

Исследовательский поиск по совершенствованию процессов профилактики и лечения дисбиотических осложнений химиолучевой терапии пациентов онкологического профиля с применением фитокомпозиции Мукосепт манифестирует новое осмысление данных процессов и коррекцию возможных осложнений с использованием эффективного синергизма лечебных воздействий, что будет способствовать повышению уровня качества жизни этого контингента пациентов.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Поступила: 20.01.2024 **Принята в печать:** 16.06.2024

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.
Received: 20.01.2024 **Accepted:** 16.06.2024

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES:

1. Sonis S.T. Oral mucositis in cancer therapy. — *J Support Oncol.* — 2004; 2 (6 Suppl 3): 3—8. PMID: 15605918
2. Scully C., Sonis S., Diz P.D. Oral mucositis. — *Oral Dis.* — 2006; 12 (3): 229—41. PMID: 16700732
3. Sonis S.T. The pathobiology of mucositis. — *Nat Rev Cancer.* — 2004; 4 (4): 277—84. PMID: 15057287
4. Napeñas J.J., Brennan M.T., Bahrani-Mougeot F.K., Fox P.C., Lockhart P.B. Relationship between mucositis and changes in oral microflora during cancer chemotherapy. — *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* — 2007; 103 (1): 48—59. PMID: 17178494
5. van Vliet M.J., Harmsen H.J., de Bont E.S., Tissing W.J. The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. — *PLoS Pathog.* — 2010; 6 (5): e1000879. PMID: 20523891
6. Keijsers B.J., Zaura E., Huse S.M., van der Vossen J.M., Schuren F.H., Montijn R.C., ten Cate J.M., Crielaard W. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. — *J Dent Res.* — 2008; 87 (11): 1016—20. PMID: 18946007
7. Ye Y., Carlsson G., Agholme M.B., Wilson J.A., Roos A., Henriques-Normark B., Engstrand L., Modéer T., Pütsep K. Oral bacterial community dynamics in paediatric patients with malignancies in relation to chemotherapy-related oral mucositis: a prospective study. — *Clin Microbiol Infect.* — 2013; 19 (12): E559—67. PMID: 23829394

8. van Vliet M.J., Tissing W.J., Dun C.A., Meessen N.E., Kamps W.A., de Bont E.S., Harmsen H.J. Chemotherapy treatment in pediatric patients with acute myeloid leukemia receiving antimicrobial prophylaxis leads to a relative increase of colonization with potentially pathogenic bacteria in the gut. — *Clin Infect Dis.* — 2009; 49 (2): 262—70. [PMID: 19514856](#)
9. Stringer A.M., Gibson R.J., Logan R.M., Bowen J.M., Yeoh A.S., Hamilton J., Keefe D.M. Gastrointestinal microflora and mucins may play a critical role in the development of 5-Fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis. — *Exp Biol Med (Maywood).* — 2009; 234 (4): 430—41. [PMID: 19176868](#)
10. Ascierto M.L., De Giorgi V., Liu Q., Bedognetti D., Spivey T.L., Murtas D., Uccellini L., Ayotte B.D., Stroncek D.F., Chouchane L., Manjili M.H., Wang E., Marincola F.M. An immunologic portrait of cancer. — *J Transl Med.* — 2011; 9: 146. [PMID: 21875439](#)
11. Ye Y., Carlsson G., Agholme M.B., Karlsson-Sjöberg J., Yucel-Lindberg T., Pütsep K., Modéer T. Pretherapeutic plasma pro- and anti-inflammatory mediators are related to high risk of oral mucositis in pediatric patients with acute leukemia: a prospective cohort study. — *PLoS One.* — 2013; 8 (5): e64918. [PMID: 23741421](#)
12. Ogiwara H., Takeuchi K., Majima Y. Risk factors of postoperative infection in head and neck surgery. — *Auris Nasus Larynx.* — 2009; 36 (4): 457—60. [PMID: 19111412](#)
13. Ramos-Zayas A., López-Medrano F., Urquiza-Fornovi I., Zubilaga I., Gutiérrez R., Sánchez-Aniceto G., Acero J., Almeida F., Galdona A., Morán M.J., Pampin M., Cebrián J.L. The impact of healthcare-associated infections in patients undergoing oncological microvascular head and neck reconstruction: A prospective multicentre study. — *Cancers (Basel).* — 2021; 13 (9): 2109. [PMID: 33925543](#)
14. Арутюнов А.С., Царев В.Н., Седракий А.Н., Савкина Н.И., Покровский В.Н. Анализ видового состава микрофлоры биопленки на базисах зубочелюстных протезов у онкологических пациентов с послеоперационными дефектами челюстей. — *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.* — 2009; 2 (76): 11—19 [Arutyunov A.S., Tsarev V.N., Sedrakyan A.N., Savkina N.I., Pokrovsky V.N. Analysis of biofilm microflora species on jaw and tooth prosthesis base in cancer patients with postoperative jaw defects. — *Journal of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS.* — 2009; 2 (76): 11—19 (In Russian)]. [eLibrary ID: 12883861](#)
15. Нуриева Н.С., Важенин А.В. Роль профилактических ортопедических устройств как метода вторичной профилактики радиомукозитов слизистой оболочки полости рта. — *Естественные и технические науки.* — 2009; 4 (42): 145—148 [Nurieva N.S., Vazhenin A.V. Role of preventive orthopedic devices as method of secondary preventive maintenance radiomucous oral cavity mucous membrane. — *Natural and technical sciences.* — 2009; 4 (42): 145—148 (In Russian)]. [eLibrary ID: 13024006](#)
16. Farnaud S., Evans R.W. Lactoferrin — a multifunctional protein with antimicrobial properties. — *Mol Immunol.* — 2003; 40 (7): 395—405. [PMID: 14568385](#)
17. Legrand D., Ellass E., Carpentier M., Mazurier J. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. — *Cell Mol Life Sci.* — 2005; 62 (22): 2549—59. [PMID: 16261255](#)
18. Царев В.Н., Макеева И.И., Садчикова Е.Р., Подпорин М.С., Трефилова Ю.А., Арзуканян А.В., Гольдман И.Л. Методика оценки активности полифункционального белка трансферрина ряда при экспериментальном моделировании кинетики развития *Staphylococcus aureus*. — *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* — 2021; 6: 617—627 [Tsarev V.N., Makeeva I.M., Sadchikova E.R., Podporin M.S., Trefilova Yu.A., Arzukanyan A.V., Goldman I.L. Method for the estimation of antibacterial activity of the polyfunctional protein from transferrin family in the experimental model of the kinetics of *Staphylococcus aureus* development. — *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* — 2021; 6: 617—627 (In Russian)]. [eLibrary ID: 47500360](#)
19. Подпорин М.С., Царев В.Н., Ипполитов Е.В., Царева Т.В., Вишленкова В.В., Гольдман И.Л., Садчикова Е.Р. Экспериментальное обоснование разработки лекарственной формы лактоферрина с производными эмалевого матрикса для применения в пародонтологии. — *Клиническая стоматология.* — 2022; 4: 74—80 [Podporin M.S., Tsarev V.N., Ippolitov E.V., Tsareva T.V., Vishlenkova V.V., Goldman I.L., Sadchikova E.R. Experimental substantiation of the development of the dosage form of lactoferrin with enamel matrix derivatives for use in periodontology. — *Clinical Dentistry (Russia).* — 2022; 4: 74—80 (In Russian)]. [eLibrary ID: 49940618](#)
20. Rascón-Cruz Q., Espinoza-Sánchez E.A., Siqueiros-Cendón T.S., Nakamura-Bencomo S.I., Arévalo-Gallegos S., Iglesias-Figueroa B.F. Lactoferrin: A Glycoprotein Involved in Immunomodulation, Anticancer, and Antimicrobial Processes. — *Molecules.* — 2021; 26 (1): 205. [PMID: 33401580](#)
21. Важенин А.В., Кипарисова Д.Г., Кипарисов Ю.С., Подпорин М.С., Пономарева А.Г., Царев В.Н., Арутюнов С.Д. Экспериментальное обоснование эффективности применения новой фитокомпозиции в профилактике и стоматологическом лечении онкологических пациентов с осложнениями химио- и лучевой терапии. — *Клиническая стоматология.* — 2023; 4: 80—90 [Vazhenin A.V., Kiparisova D.G., Kiparisov Yu.S., Podporin M.S., Ponomareva A.G., Tsarev V.N., Arutyunov S.D. Experimental substantiation of the effectiveness of the use of a new phyto-composition in the prevention and dental examination of cancer patients with complications of chemotherapy and radiation therapy. — *Clinical Dentistry (Russia).* — 2023; 4: 80—90 (In Russian)]. [eLibrary ID: 59397995](#)