

ИЗУЧЕНИЕ ПЕРСПЕКТИВ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СЕКРЕТА СЛЮННЫХ КЛЕТОК МЕДИЦИНСКОЙ ПИЯВКИ *HIRUDO MEDICINALIS* И ПРЕПАРАТА «ПИЯВИТ» КАК АНТИМИКРОБНЫХ КОМПЛЕКСОВ, НЕ ВЫЗЫВАЮЩИХ РЕЗИСТЕНТНОСТИ У МИКРООРГАНИЗМОВ

Павлова И.Б.¹, Юдина Т.Г.¹, Баскова И.П.¹, Го Даньян², Чен Лейли³, Феоктистова Н.А.⁴, Васильев Д.А.⁴, Золотухин С.Н.⁴

¹ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия, e-mail: yudinatg@mail.ru

²Китайский государственный НИИ пищевой и ферментативной промышленности, Пекин, Китай, e-mail: guody@mail.ru

³Шаньдунская академия сельскохозяйственных наук Китая, Цзинань, Китай, e-mail: guody@mail.ru

⁴ФГБОУ ВО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск, Россия, e-mail: feokna@yandex.ru

Установлено *in vitro*, что бактерии *Pseudomonas aeruginosa* и дрожжи *Candida guilliermondii*, способные вызывать у людей и животных заболевания псевдомонозы и кандидозы, соответственно, чувствительны к антимикробному действию растворов секрета слюнных клеток медицинской пиявки *Hirudo medicinalis*, а также водного экстракта из разрешённого к клиническому применению препарата «Пиявит». С помощью электронной микроскопии определены основные стадии лизиса микробных клеток под влиянием изучаемых растворов. Симбионт медицинских пиявок – бактерия *Aeromonas hydrophila*, практически нечувствительна к влиянию растворов как секрета слюнных клеток своего хозяина, так и препарата «Пиявит». Сделан вывод о перспективности использования изучаемых природных антимикробных комплексов, не вызывающих резистентности у микроорганизмов, для лечения заболеваний вместо традиционно используемых антибиотиков.

Ключевые слова: гирудотерапия (ГТ); медицинская пиявка (МП); секрет слюнных клеток (ССК); антимикробные белки и пептиды (АМР); псевдомоноз; кандидоз; сканирующая электронная микроскопия (СЭМ); трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ); дестабилаза-лизосим (Д-Л); *Pseudomonas aeruginosa*; *Aeromonas hydrophila*; *Hirudo medicinalis*; *Candida guilliermondii*.

STUDYING OF PROSPECTS OF USE OF THE SECRET OF SALIVARY CAGES OF THE MEDICAL BLOODSUCKER OF *HIRUDO MEDICINALIS* AND PREPARATION «PIYAVIT» AS THE ANTIMICROBIC COMPLEXES WHICH AREN'T CAUSING RESISTANCE IN MICROORGANISMS

Pavlova I.B.¹, Yudina T.G.¹, Baskova I.P.¹, Guo Danyan², Chen Leyli³, Feoktistova N.A.⁴, Vasilyev D.A.⁴, Zolotukhin S.N.⁴

¹FGBOU VPO "Lomonosov Moscow State University", Moscow, Russia, e-mail: yudinatg@mail.ru

²Chinese state scientific research institute of the food and fermentativny industry, Beijing, China, e-mail: guody@mail.ru

³Shandong academy of agricultural sciences of China, Jinan, China, e-mail: guody@mail.ru

⁴FGBOU WAUGH "The Ulyanovsk GSHA of P. A. Stolypin", Ulyanovsk, Russia, e-mail: feokna@yandex.ru

In vitro is established that bacteria of *Pseudomonas aeruginosa* and the *Candida guilliermondii* yeast capable to cause in people and animals of a disease of a pseudo-monose and candidiases are respectively sensitive to antimicrobial effect of solutions of a secret of salivary cages of a medical bloodsucker of *Hirudo medicinalis*, and also water extract from the preparation "Piyavit" allowed for clinical use. The main stages of a lizis of microbial cages under the influence of the studied solutions are defined by electronic microscopy. Симбионт medical bloodsuckers – *Aeromonas hydrophila* bacterium, is almost tolerant to influence of solutions as secret of salivary cells of the owner, and preparation "Piyavit". The conclusion is drawn on prospects of use of the studied natural antimicrobial complexes which aren't causing resistance in microorganisms for treatment of diseases instead of traditionally used antibiotics.

Keywords: girudoterapiya (GT); medical bloodsucker (MB); secret of salivary cages (SSC); antimicrobial proteins and peptides (AMP); pseudo-monoses; candidiasis; scanning electronic microscopy (SEM); transmission electronic microscopy (TEM); in destabililaza-lizotsy (D-1); *Pseudomonas aeruginosa*; *Aeromonas hydrophila*; *Hirudo medicinalis*; *Candida guilliermondii*.

В последние годы антибиотикорезистентность микроорганизмов стала актуальной проблемой мирового значения. Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) работает в тесном сотрудничестве с Всемирной организацией по охране здоровья животных (МЭБ), Продовольственной и сельскохозяйственной организацией ООН (ФАО) над усовершенствованием методов борьбы с резистентностью к противомикробным препаратам, в том числе – над оптимальным использованием антибиотиков. ВОЗ разработала проект глобального плана действий по борьбе с устойчивостью микроорганизмов к противомикробным средствам [9].

В связи с этим всё более интенсивно изучают антимикробные белки и пептиды (АМР), которые рассматривают, как альтернативу традиционно используемым антибиотикам. Многие из АМР являются важнейшим звеном врождённого иммунитета макроорганизмов. Поэтому в процессе коэволюции бактериальных патогенов и их хозяев у ряда микробов выработалась способность противодействовать некоторым АМР. Один из перспективных подходов для преодоления такого противодействия - использование в качестве лекарственных средств не одного, а сразу нескольких АМР, что значительно уменьшает вероятность развития резистентности. В связи с этим расширяются исследования антимикробной активности природных комплексов, содержащих АМР. Одним из таких комплексов является секрет слюнных клеток медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* (ССК МП), основной гуморальный агент, обеспечивающий высокую эффективность лечения пиявками – гирудотерапии (ГТ). ГТ оказывает многофакторное антикоагулирующее, тромболитическое, противоишемическое, антимикробное, иммуностимулирующее, восстанавливающее микроциркуляцию действие, и ряд других эффектов. Установлено, что в состав ССК МП входит более сотни белков (ферменты, ингибиторы протеиназ, модуляторы, АМР, а также ещё не описанные белки и пептиды) и более 150 низкомолекулярных соединений. Одним из важных и достаточно хорошо изученных компонентов ССК является АМР дестабилаза-лизоцим (Д-Л). Причём, в ССК обычно содержится несколько изоформ Д-Л, лизоцимы других типов, другие литические ферменты. Получены также данные о множестве новых белков в составе ССК [1, 5]

Проведённое нами ранее сравнение антимикробной активности растворов рекомбинантного Д-Л и ССК МП показало более высокую активность последнего, а также более широкий спектр его антимикробного действия [1, 7]. Такие работы имеют большую значимость и в связи с доказанной ролью многих микроорганизмов в развитии атеросклероза сосудов [10]. Исследования антимикробной активности ССК МП, проведённые на первом этапе *in vitro*, актуальны для получения конкретных данных о влиянии ССК на микроорганизмы, играющие ключевую роль при развитии ряда заболеваний, они

необходимы для лечения этих заболеваний с привлечением ГТ. Кроме того, важно сравнительное изучение антимикробного эффекта растворов ССК и водного экстракта из орального лекарственного препарата «Пиявит», который разрешён к клиническому применению с 1994 г. Этот препарат на основе МП содержит все компоненты ССК, практически полностью сохраняющие свои активности при продолжительном хранении. В настоящее время регистрационный номер «Пиявита» Р N000363/02 от 22.05.2008. Производится этот препарат ООО Научно-внедренческой фирмой «Гируд И.Н.», в г. Балаково Саратовской области [1].

В качестве тест-микроорганизмов при изучении антимикробной активности растворов ССК МП и водного экстракта «Пиявита» мы использовали условно-патогенных представителей грибов и бактерий - *Candida guilliermondii* и *Pseudomonas aeruginosa*, а также бактерию *Aeromonas hydrophila*. Инвазивные штаммы синегнойной палочки вызывают инфекционные заболевания – псевдомонозы (аэромоназы), а также часто осложняют многие патологические процессы инфекционной и неинфекционной этиологии. Ряд представителей р. *Aeromonas* признаны факультативными патогенами для людей с ослабленным иммунитетом. Бактерия *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* известна, как симбионт медицинской пиявки. Грамотрицательные бактерии *Aeromonas* spp. и *Pseudomonas* spp. имеют много сходных признаков, в том числе, у них выявлена широкая резистентность к антибиотикам, тяжёлым металлам, и др. Для некоторых грамотрицательных бактерий установлена резистентность и к АМР [6].

Представители р. *Candida* являются наиболее распространенными грибными патогенами, способными вызывать серьезные системные заболевания у людей с ослабленным иммунитетом, перенёсших операции, принимающих антибиотики широкого спектра действия. Около половины таких заболеваний вызывает *Candida albicans*, однако, растёт распространённость заболеваний, вызываемых и другими представителями этого рода. Например, среди возбудителей онихомикоза всё чаще встречается и *C. guilliermondii* [8].

Поэтому изучение чувствительности *P. aeruginosa* и *A. hydrophila*, а также *C. guilliermondii* к антибиотическому действию ССК МП и лекарственного препарата «Пиявит», содержащих комплексы АМР, является весьма актуальной задачей.

Цель исследования

Целью настоящей работы явилось изучение *in vitro* антибиотического влияния на микроорганизмы растворов ССК МП и водного экстракта из орального лекарственного препарата «Пиявит».

Задачи работы:

1) определить величину антибиотического действия растворов ССК МП и водного экстракта «Пиявита» на условно патогенные микроорганизмы с помощью метода диффузии в агар и контроля жизнеспособности клеток после воздействия на них изучаемых антимикробных агентов;

2) исследовать с помощью СЭМ и ТЭМ картину лизиса микробных клеток, чувствительных к влиянию растворов ССК МП и водного экстракта «Пиявита».

Материал и методы исследования

Отбирали нативный, свободный от примесей, ССК от МП *H. medicinalis* ранее описанным методом, для чего использовали по 20 особей МП, выращенных на биофабрике и купленных в аптеке. Для получения водного экстракта из препарата «Пиявит» суспензию (без капсул) этого препарата хорошо перемешивали, настаивали 3 часа в стерильной дистиллированной воде при комнатной температуре, затем центрифугировали при 11 тыс. об./мин. в течение 15 мин., использовали супернатант. Концентрацию белка в растворах определяли по известному методу Брэдфорд.

Работу проводили с культурами *P. aeruginosa* шт. 47, *C. guillermondii* шт. 327 из Музея культур кафедры микробиологии МГУ им. М.В. Ломоносова (MDMSU), а также *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* шт. 8 из Музея культур Научно-исследовательского инновационного центра микробиологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина».

Бактерий выращивали при 37° С в течение суток на агаризованной питательной среде следующего состава: K_2HPO_4 – 7,0; KH_2PO_4 – 2,0; цитрат натрия - 0,4; $MgSO_4$ - 0,05; $(NH_4)_2SO_4$ – 1,0; H_2O дист.; pH 7,1. К среде добавляли 10 г/л триптозного бульона и 10 г/л глюкозы; а также 15 г/л высокоочищенного агара («Sigma, или «Difco», США). Дрожжи выращивали на агаризованной среде Чапека. На этих же средах определяли антимикробную активность изучаемых растворов с известной концентрацией белков методом диффузии в агар, учитывая размер зоны подавления роста тест-культуры от конца лунки. Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) растворов определяли путем учета антибиотических активностей ряда разведений. МИК выражали в мкг/мл раствора белка, внесенного в лунку. Жизнеспособность микроорганизмов определяли известным способом путём подсчёта колоний, выросших из сохранивших жизнеспособность клеток после влияния на них изучаемых растворов [4]. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программ Microsoft Excel; достоверность различий $p < 0,05$.

Подготовку тест-микроорганизмов для электронной микроскопии проводили общепринятыми методами [4]. Для исследования в просвечивающем (трансмиссионном) электронном микроскопе (ТЭМ) клетки тест-микроорганизмов (контрольные и

лизирующиеся под влиянием изучаемых растворов) фиксировали 2 ч. в 0,1 М фосфатном буферном растворе, pH 7,2 с 2,5%-ным глутаровым альдегидом. Затем образцы отмывали 2 раза в этом же буфере и помещали на 3 ч. в 1%-ный раствор OsO₄. После этого препараты отмывали 3 раза в 50%-ном этаноле (пока раствор не становился прозрачным). Образцы оставляли на ночь при 4°C в 2%-ном растворе уранилацетата в 70%-ном этаноле. Проводку в спиртах заканчивали: в 80%-ном – 2 раза по 30 мин.; в 96%-ном – 1 раз 1ч.; в абсолютном спирте (100%-ном) – 1 ч. Затем обезвоживание проводили в абсолютном ацетоне – 2 раза по 30 мин. Заливку и пропитку препаратов в эпоне проводили общепринятым способом. Срезы на формваровых пленках просматривали в ТЭМ Geol 1011, (Япония) при ускоряющем напряжении 80 кV после их контрастирования уранилацетатом и реактивом Рейнольса.

Для приготовления бактериальных препаратов методом негативного контрастирования каплю суспензии клеток *P.aeruginosa* после их инкубации с исследуемыми растворами (в которых определена концентрация белка), а также суспензию - контроль наносили на сеточки с формваровыми пленками. Через одну минуту избыток жидкости удаляли фильтровальной бумагой. Затем наносили на сеточки каплю 2%-ного раствора фосфовольфрамовой кислоты. Через 1 мин избыток жидкости удаляли.

Препараты клеток, приготовленные этими разными способами, просматривали в трансмиссионном микроскопе Geol JEM 1011 (Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ, с помощью Erlangshen ES 500 W Model 782, gatan, с программой Gatan Digital Micrograph.

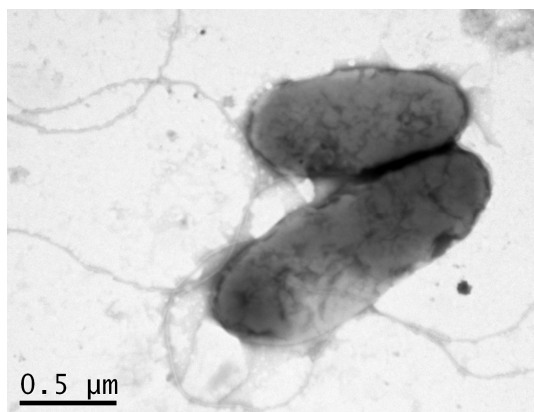
Для изучения в сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) фиксацию контрольных и опытных клеточных суспензий проводили 2,5%-ным глутаровым альдегидом в течение 1 ч; после чего исследуемый материал обезвоживали в спиртах возрастающих концентраций (20%, 50%, 70% - по 30 минут, 96% - 1 час, абсолютный спирт – 1 час), а затем в абсолютном ацетоне 1 час, и высушивали в критической точке. Напыление образцов проводили платиной на приборе фирмы LKB (Швеция). Форму и поверхность исследуемого материала изучали с помощью микроскопов «JSM-6380» (Япония) и «CamScan» (Великобритания) при ускоряющем напряжении 20 кV.

Результаты исследования и их обсуждение

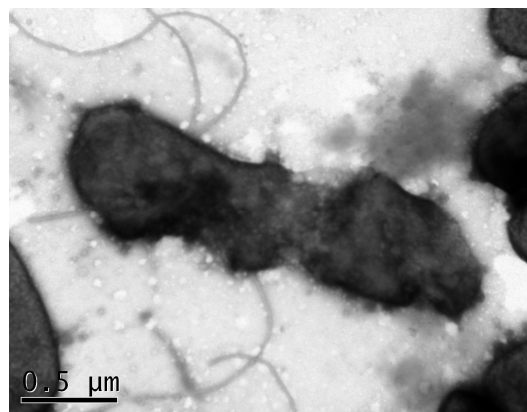
Ранее мы сообщили [6, 7], что бактерии *A. hydrophila* – симбионты кишечника *H. medicinalis*, оказались практически устойчивы к влиянию раствора ССК МП в используемых концентрациях (до 100 мкг/мл). Основной причиной такой устойчивости является, по-видимому, эволюционная приспособленность бактерий-симбионтов к обитанию в организме своего хозяина – МП. В настоящем исследовании мы определили влияние на этих бактерий растворов ССК и водного экстракта «Пиявита»: они проявили слабую (следы)

антимикробную активность в концентрации 150 мкг/мл. Как известно, биологическая активность разных партий ССК и «Пиявита» может существенно отличаться [1, 6].

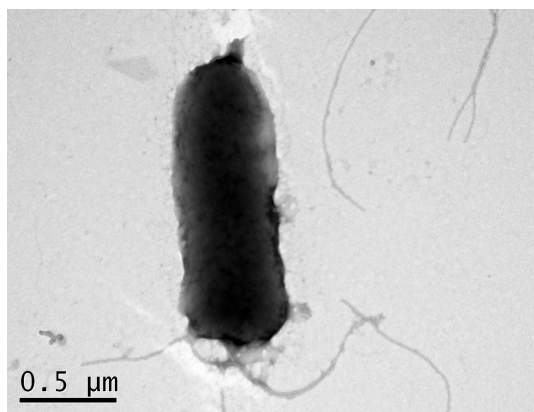
Клетки *P. aeruginosa* чувствительны к антибиотической активности ССК, как мы определили ранее [6]. Эти клетки лизируются и под влиянием раствора водного экстракта «Пиявита». На рис. 1 представлена картина лизиса бактерий *P. aeruginosa* под влиянием 35 мкг/мл (при 37° С, через 10 мин.) растворов ССК (рис. 1, б) и водного экстракта «Пиявита» (рис. 1, в). Видно, что, по сравнению с контролем (рис. 1, а), у бактерий нарушена целостность клеточной стенки и мембран. Эти клетки уже через 10 мин. лизируются под влиянием раствора ССК (рис. 1, б), хотя под влиянием раствора водного экстракта «Пиявита» за это время только незначительная часть клеток лизировалась, а у большинства клеток появились признаки изменения морфологии, увеличилось число мембранных везикул (рис. 1, в). Картина практически полного лизиса бактериальных клеток представлена на рис. 1, г.



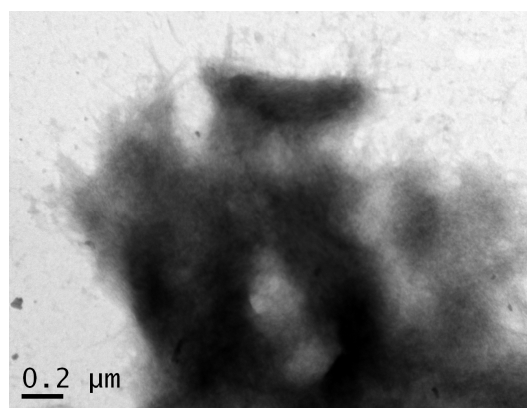
а)



б)



в)



г)

Рис. 1. Вид в ТЭМ контрастированных клеток *P. aeruginosa*, лизирующихся под влиянием растворов ССК МП и водного экстракта «Пиявита» (50 мкг/мл, 37° С, через 10 мин.): а) – контроль; б) – лизирующаяся под влиянием ССК клетка с нарушенной целостностью клеточной стенки и мембран; в) клетка с изменённой поверхностью, увеличенным числом мембранных везикул в результате влияния раствора водного экстракта «Пиявита»; г) остатки лизировавшихся под влиянием ССК клеток.

Определение в двух разных опытах жизнеспособности клеток бактерий после действия на них изучаемых растворов одинаковой концентрации (50 мкг/мл, при 37° С) привело к результатам, представленным в табл. 1.

Таблица 1

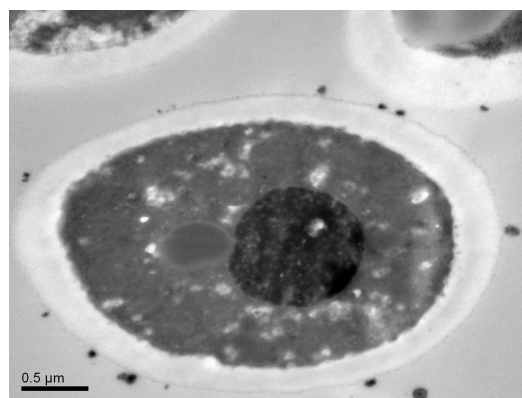
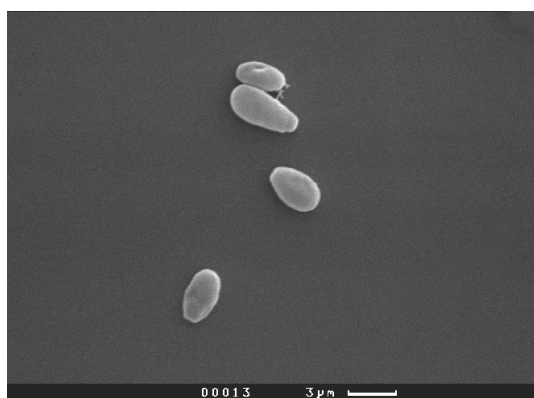
Выживаемость клеток *Pseudomonas aeruginosa* после действия на них растворов ССК МП и водного экстракта «Пиявита»

Время действия изучаемых растворов на клетки, мин.	% выросших колоний <i>P. aeruginosa</i> (по сравнению с контролем) после действия на бактериальные клетки растворов (в концентрации 50 мкг/мл):	
	ССК МП	Водного экстракта «Пиявита»
10	31,5 ± 1,32	83,1 ± 3,87
60	0,8 ± 0,07	50,7 ± 0,31
120	0	31,5 ± 0,24

Из полученных данных видно, что под действием изучаемых растворов практически все клетки *P. aeruginosa* теряют жизнеспособность и лизируются через 1 час в инкубационной среде с ССК. Однако, за это время теряет жизнеспособность только половина клеток в инкубационной среде с водным экстрактом «Пиявита». Треть клеток бактерий сохраняют жизнеспособность и через 2 часа влияния последнего, через 3 часа инкубации количество жизнеспособных клеток уменьшается, благодаря действию раствора «Пиявита», примерно ещё вдвое (до 15 %).

Таким образом, раствор водного экстракта «Пиявита» оказывает антимикробный эффект на клетки возбудителей аэромоназов в опыте *in vitro*, хотя и менее интенсивно (за больший промежуток времени), чем раствор ССК МП. Следует подчеркнуть, что прямое количественное сравнение антимикробного действия изучаемых растворов мы не проводили, так как известно об отличиях биологической активности разных партий ССК, а, следовательно – и содержащего ССК препарата «Пиявит».

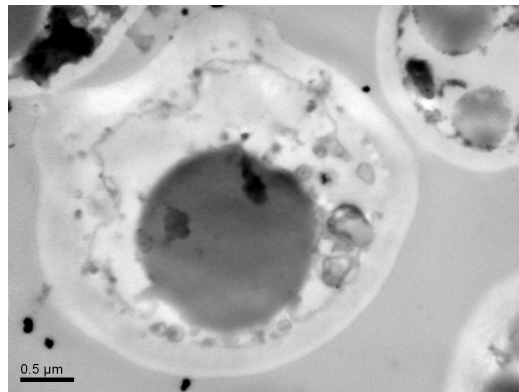
Эукариотические клетки дрожжей *S. guilliermondii* также чувствительны к антимикробному влиянию растворов ССК МП и водного экстракта «Пиявита». Вид этих лизирующихся клеток в СЭМ и в ТЭМ представлен на рис. 2.



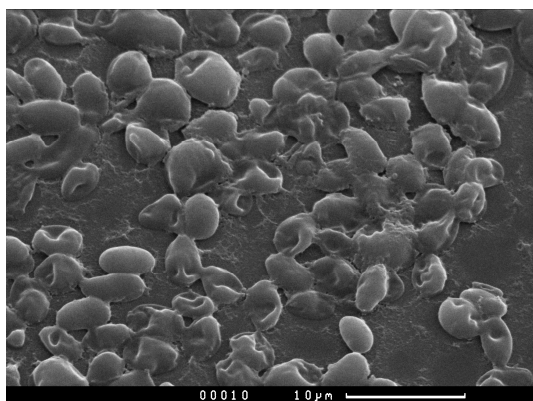
а)



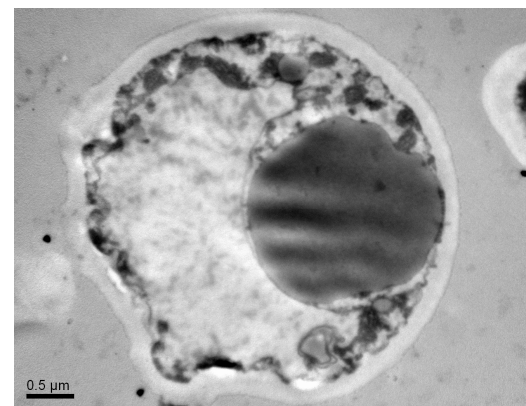
б)



в)



г)



д)



е)

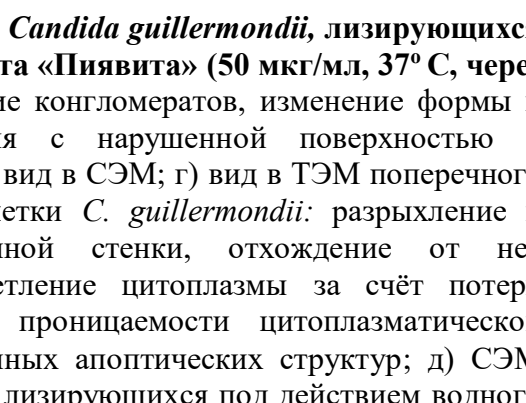


Рис. 2. Вид в СЭМ (а, в, д) и в ТЭМ (б, г, е) клеток *Candida guilliermondii*, лизирующихся под влиянием растворов ССК МП и водного экстракта «Пиявита» (50 мкг/мл, 37° С, через 60 мин.): а, б) - контроль; в) – скопление, образование конгломератов, изменение формы и лизис дрожжевых клеток, остатков псевдомицелия с нарушенной поверхностью и проницаемостью мембран под влиянием раствора ССК; вид в СЭМ; г) вид в ТЭМ поперечного среза лизирующейся под влиянием раствора ССК клетки *C. guilliermondii*: разрыхление и начало расслоения в отдельных местах клеточной стенки, отхождение от неё цитоплазматической мембраны, значительное просветление цитоплазмы за счёт потери внутренних компонентов клетки из-за нарушения проницаемости цитоплазматической мембраны; наличие в цитоплазме кольцевых мембранных апоптических структур; д) СЭМ конгломератов из клеток с нарушенной морфологией и лизирующихся под действием водного экстракта «Пиявита»; е) вид в ТЭМ поперечного среза лизирующейся под влиянием раствора водного экстракта «Пиявита» клетки *C. guilliermondii*: начало расслоения клеточной стенки, отхождение от неё цитоплазматической мембраны, просветление цитоплазмы, появление в цитоплазме кольцевых мембранных структур.

Заключение

Таким образом, электронномикроскопическое исследование дрожжевой формы грибных клеток *C. guilliermondii* выявило основные стадии их лизиса под влиянием изучаемых растворов. Как и в случае картины лизиса бактерий, наблюдается, прежде всего, нарушение целостности клеточных стенок – их разрежение, затем разрушение структуры

этих стенок, хотя известно о существенном отличии в строении клеточных стенок грибов и бактерий [3]. Наряду с этим, выявлены также признаки нарушения проницаемости клеточной мембраны, что проявляется в просветлении цитоплазмы - её разрежении, потере клетками их содержимого, разрушении клеточной стенки и цитоплазматической мембраны.

Подсчёт среднего из 20 фото (полей зрения) в СЭМ процента лизирующихся дрожжевых клеток с нарушенной морфологией подтвердил (достоверность $p < 0,05$), что изучаемые растворы ССК и водного экстракта «Пиявита» оказывают антибиотическое действие, приводящее к лизису дрожжей *C. guilliermondii* (табл. 2).

Таблица 2

Процентное содержание лизирующихся под влиянием растворов ССК МП и водного экстракта «Пиявита» (50 мкг/мл, 37° С, через 60 мин.) клеток популяции дрожжей *C. guilliermondii*

Раствор антимикробного комплекса	Процент лизирующихся клеток
ССК МП	79,5 ± 8,0
Водный экстракт «Пиявита» ^о	65,2 ± 7,7

Как и при изучении влияния на бактерий, мы определяли антимикробное действие разных партий изучаемых растворов, поэтому не имели возможности корректно сравнить количественно активности последних. Однако, во всех опытах клетки тест-микроорганизмов более интенсивно лизировались под влиянием ССК.

В таблице 3 представлены данные определения антибиотических активностей изучаемых растворов методом диффузии в агар.

Таблица 3

Минимальные ингибирующие концентрации растворов ССК МП и водного экстракта препарата «Пиявит»

Тест-микроорганизм	МИК раствора, мкг/мл:	
	Раствор ССК МП	Водный экстракт «Пиявита»
<i>P. aeruginosa</i>	5	20
<i>C. guilliermondii</i>	15	45

Таким образом, определение *in vitro* антибиотического влияния растворов ССК МП и водного экстракта препарата «Пиявит» на бактерий и микроскопические грибы, способных вызывать заболевания людей и животных, показало перспективность дальнейшего изучения этих природных антимикробных комплексов с целью их использования в качестве актуальных лечебных препаратов, не вызывающих резистентности микроорганизмов. Как известно, лечение с помощью многих лекарств проводят, вначале используя их введение в кровотоки (подобно ССК МП при ГТ), а затем осуществляя поддерживающую терапию оральными препаратами (подобно «Пиявиту»). При различных хронических заболеваниях (в том числе – сердечно-сосудистых), у людей со слабым иммунитетом такое лечение может

способствовать не только ослаблению атеросклероза сосудов, улучшению микроциркуляции, но и подавлению ряда инфекций, в том числе - вялотекущих.

Список литературы

1. Баскова И.П. Научные основы гирудотерапии. Гуморальное звено. – Тула, «Аквариус», 2015. - 228 с.
2. Го Даньян. Сравнение антибиотического действия секрета слюнных клеток медицинской пиявки и фермента дестабилазы-лизоцима, входящего в состав этого секрета. / Го Даньян, И.Б. Павлова // Медицинский академический журнал. – 2012. – №5. - С. 485 – 486.
3. Камзолкина О.В. Биология грибной клетки / О.В. Камзолкина, Я.Е. Дунаевский. - Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2015. – 239 с.
4. Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии: учебн. пособие для студ. вузов. - М., Издат. центр «Академия», 2005. - С. 83 – 376.
5. Окороченков С.А. Антимикробные пептиды: механизмы действия и перспективы практического применения / С.А. Окороченков, Г.А. Желтухина, В.Е. Небольсин // Биомедицинская химия. – 2012. - Т.58, вып. 2. - С. 131-143.
6. Павлова И.Б. Лизис клеток возбудителя псевдомонозов *Pseudomonas aeruginosa* под влиянием секрета слюнных клеток медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* / И.Б. Павлова, Т.Г. Юдина, И.П. Баскова [и др.] // Ветеринарная медицина и продовольственная безопасность: материалы Международного форума. 9-11 июня. - Ульяновск, 2015. - С. 62 – 68.
7. Юдина Т.Г. Антимикробное действие секрета слюнных клеток медицинской пиявки, рекомбинантного дестабилазы-лизоцима и его мутантных форм / Т.Г. Юдина, Г. Даньян., И.Б. Павлова // Материалы Международной Конференции Ассоциации гирудологов. 1 – 5 октября. - Харьков, 2012. - С. 59-60.
8. Fich F. *Candida Parapsilosis* and *Candida Guillermondii* / F. Fich, A. Abarzúa-Araya, M. Pérez [et al.] // Emerging Pathogens in Nail Candidiasis. Indian J Dermatol. 2014 Jan-Feb. - № 59(1). – P. 24–29. DOI: 10.4103/0019-5154.123485 PMID: PMC3884923
9. Gruenheid S, Le Moual H. Resistance to antimicrobial peptides in Gram-negative bacteria / S. Gruenheid, H. Le Moual // FEMS Microbiol Lett. 2012 May. - № 330(2). – P. 81-89.
10. Sessa R. Infectious burden and atherosclerosis / R. Sessa R, M. D. Pietro, S. Filardo [et al.] // A clinical issue. World J Clin Cases. – 2014. - № 2(7). – P. 240-249.

Рецензенты:

Алешкин А.В., д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, г. Москва;

Нафеев А.А., д.м.н., заведующий отделом особо опасных инфекций, природно-очаговых инфекций и профилактики туберкулеза ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ульяновской области», г. Ульяновск.