

ВЛИЯНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ ТРОМБОЦИТОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТАГОНИСТИЧЕСКИ АКТИВНЫМ ПРЕДСТАВИТЕЛЯМ НОРМАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ

Изучено влияние антимикробных пептидов из тромбоцитов сельскохозяйственных животных на чувствительность условно-патогенных микроорганизмов к антагонистически активным представителям нормальной микрофлоры. Установлено, что кислотные экстракты из тромбоцитов сельскохозяйственных животных повышают чувствительность условно-патогенных микроорганизмов к антагонистически активным веществам бактерий рода *Lactobacillus*, *Esherichia* и *Enterococcus*. Наибольшее изменение признака у клонов *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* и *Esherichia coli* отмечено при соинкубировании с антимикробными пептидами из тромбоцитов крупного рогатого скота и кур.

Ключевые слова: катионные антимикробные пептиды, тромбоденсин, бактерии, антагонистически активные вещества, представители нормальной микрофлоры.

После открытия А. Флемингом пенициллина произошло выдающееся событие первой половины прошлого столетия – началась эра антибиотиков. Применение антибиотиков открыло для человечества новые возможности в лечении инфекционных заболеваний и в то же время породило ряд проблем, связанных с ростом антибиотикоустойчивых форм микроорганизмов [2, 5]. Понимание комплекса проблем, связанных с небезопасностью применения антибиотиков, позволило разработать и внедрить в практику препараты нового поколения – пробиотики, основу которых составляют живые микробные культуры.

Пробиотики широко применяются для профилактики и лечения дисбактериозов, характеризуются выраженным клиническим эффектом при лечении острых кишечных инфекций. Важной особенностью пробиотиков является их способность повышать противoinфекционную устойчивость организма, регулировать и стимулировать пищеварение [4, 7].

Стремительный рост инфекционных заболеваний в последние десятилетия диктует необходимость повышения эффективности существующих антимикробных препаратов, включая пробиотики. Решение данной задачи, на наш взгляд, может быть осуществлено с помощью применения низкомолекулярных антимикробных пептидов из тромбоцитов сельскохозяйственных животных – тромбоденсинов (ТД), интерес к которым в последние годы особенно возрос [8, 9]. Многие свойства данного класса

пептидов остаются на сегодняшний день малоизученными, в том числе влияние тромбоденсинов на чувствительность условно-патогенных микроорганизмов к антагонистически активным представителям нормальной микрофлоры макроорганизма.

Целью нашего исследования явилось изучение влияния антимикробных пептидов из тромбоцитов сельскохозяйственных животных на чувствительность условно-патогенных микроорганизмов к антагонистически активным представителям нормальной микрофлоры макроорганизма.

Материалы и методы

Выделение тромбоцитарных белков кур, крупного рогатого скота и лошадей осуществляли методом кислотной экстракции. Содержание белка в кислотных экстрактах определяли по методу М.М. Брэдфорда (1976) с использованием красителя *Coomassie Brilliant Blue G-250* (SIGMA, Германия) [6]. В исследование были включены пробиотические штаммы микроорганизмов *E. faecium* и *E. coli*, бактерии рода *Lactobacillus*, выделенные из репродуктивного тракта и клоны условно-патогенных микроорганизмов (*S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*). Взвесь суточных культур условно-патогенных микроорганизмов в стерильном физиологическом растворе соинкубировали с кислотным экстрактом из тромбоцитов в минимальной подавляющей концентрации (МПК) и 1/4 МПК, уста-

новленных нами ранее, в течение 1 часа при 37 °С. С целью определения чувствительности условно-патогенных микроорганизмов к антагонистически активным веществам пробиотических микроорганизмов и бактерий рода *Lactobacillus* использовали чашечный метод

(принцип отсроченного антагонизма) [3]. Зоны задержки роста измеряли штанген-циркулем. Чувствительность условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) к антагонистически активным представителям нормальной микрофлоры рассчитывали по формуле:

$$\frac{d \text{ зоны задержки роста культуры УПМ}}{d \text{ роста культуры представителей нормальной микрофлоры}} = \frac{\text{коэффициент антагонистической активности}}{\text{коэффициент антагонистической активности}}$$

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента [1].

Результаты исследований

Проведенные исследования позволили установить преимущественно стимулирующее действие антимикробных пептидов из тромбоцитов сельскохозяйственных животных на чувствительность условно-патогенных микроорганизмов к антагонистически активным веществам бактерий рода *Lactobacillus*, бактериям *E. coli*, *Enterococcus faecium*. Наиболее выраженное изменение признака было отмечено у клонов *S. aureus* к антагонистическим факторам бактерий рода *Lactobacillus* (штамм L370) под влиянием тромбоденсина крупного рогатого скота в МПК (табл. 1).

При этом коэффициент антагонистической активности увеличивался в 3,3 раза ($15,2 \pm 6,51$ против $4,6 \pm 1,43$ в контроле). После соинкубирования *S. aureus* с антимикробными пептидами из тромбоцитов крупного рогатого скота в МПК и 1/4 МПК отмечено увеличение чувствительности к факторам межмикробного взаимодействия штамма лактобацилл L364, которое сопровождалось повышением коэффициента антагонистической активности до $4,8 \pm 1,02$ и $8,4 \pm 2,31$, соответственно, против $3,72 \pm 0,580$ – в контроле. У штамма L370 отмечено увеличение антагонистической активности к *S. aureus*, соинкубированного с ТД птицы в 1/4 МПК, в 1,9 раз и с ТД лошади в 1/4 МПК – в 2,6 раза.

Наибольшее увеличение чувствительности *S. aureus* к антагонистически активным веществам *E. coli* и *E. faecium* зарегистрировано в результате воздействия антимикробных пептидов из тромбоцитов лошади в 1/4 минимальной подавляю-

щей концентрации с изменением изучаемого признака в 1,9 раз (коэффициент – $4,84 \pm 0,840$ против $2,50 \pm 0,168$ – в контроле) и в 1,6 раз ($3,74 \pm 0,443$ против $2,41 \pm 0,180$ – в контроле), соответственно.

Тромбоденсин птицы наибольший стимулирующий эффект проявляли в МПК, увеличивая коэффициент антагонистической активности *E. coli* и *E. faecium* в отношении *S. aureus* в 1,8 раза ($p < 0,05$) и в 1,5 раза ($p < 0,01$), соответственно.

Чувствительность *S. aureus* к антагонистически активным веществам *E. coli* и *E. faecium* после соинкубирования с ТД крупного рогатого скота в МПК возрастала в 1,7 раза и в 1,3 раза, соответственно. При воздействии кислотного экстракта из тромбоцитов крупного рогатого скота в 1/4 МПК на *S. aureus* зарегистрировано повышение чувствительности к антагонистически активным веществам *E. coli* и *E. faecium* в 1,7 раза ($p < 0,01$) и на 21,2%, соответственно.

Под действием ТД птицы в МПК чувствительность *C. albicans* к антагонистически активным веществам бактерий рода *Lactobacillus* увеличивалась в 2,3 раза ($p < 0,01$). При соинкубировании клонов *C. albicans* с ТД в 1/4 МПК коэффициент антагонистической активности возрастал в 2,8 раза для *Lactobacillus* L364 ($p < 0,05$) и на 48,5% для *Lactobacillus* L370 (табл. 2).

При изучении влияния тромбоденсина лошади в МПК на чувствительность *C. albicans* к антагонистически активным веществам лактобацилл выявлено увеличение изучаемого показателя в среднем на 35,45%. При соинкубировании *C. albicans* с эндогенными антибиотиками из тромбоцитов лошади в 1/4 МПК отмечено повышение коэффициента антагонистической активности в 2,1 раза для L364 ($p < 0,05$) и в 1,9 раза – для L370 ($p < 0,05$).

В меньшей степени изменялась чувствительность *C. albicans* к антагонистически активным веществам лактобацилл под действием кислотного экстракта из тромбоцитов крупного рогатого скота. В среднем изучаемый показатель увеличился на 18,2% после соинкубирования с тромбодефенсинами в МПК. Более существенное изменение рассматриваемого параметра отмечено при соинкубировании *C. albicans* с ТД в 1/4 МПК: коэффициент антагонистической активности для *Lactobacillus* 364 составил 12,1±1,65 против 5,5±1,20 в контроле ($p<0,01$), для *Lactobacillus* 370 – 8,6±1,20 против 6,6±1,53 в контроле.

В ходе изучения влияния ТД сельскохозяйственных животных на чувствительность *E. coli* к антагонистически активным веществам пробиотических микроорганизмов *E. coli* и *E. faecium* было установлено выраженное изменение признака (рис. 1).

Кислотный экстракт из тромбоцитов лошади в МПК повышал чувствительность *E. coli* к

антагонистически активным веществам *E. coli* – на 20% и *E. faecium* – на 33% и в 1/4 МПК – на 36% и на 30,4%, соответственно.

После соинкубирования ТД крупного рогатого скота в МПК с *E. coli* отмечено увеличение коэффициента антагонистической активности *E. coli* и *E. faecium* на 16%.

Чувствительность *E. coli* к антагонистически активным веществам *E. faecium* и *E. coli* под воздействием кислотного экстракта из тромбоцитов крупного рогатого скота в 1/4 МПК повышалась на 20% и на 33,3%, соответственно.

Максимально выраженное изменение чувствительности *E. coli* к антагонистически активным веществам *E. coli* и *E. faecium* отмечали в результате воздействия ТД кур в МПК. При этом коэффициент антагонистической активности *E. coli* увеличивался на 45,6%, *E. faecium* – на 53,6%. Кислотный экстракт из тромбоцитов птицы в 1/4 МПК в меньшей степени изменял рассматриваемый признак. В данном случае

Таблица 1. Влияние антимикробных пептидов из тромбоцитов сельскохозяйственных животных на чувствительность *S. aureus* к антагонистически активным представителям нормальной микрофлоры

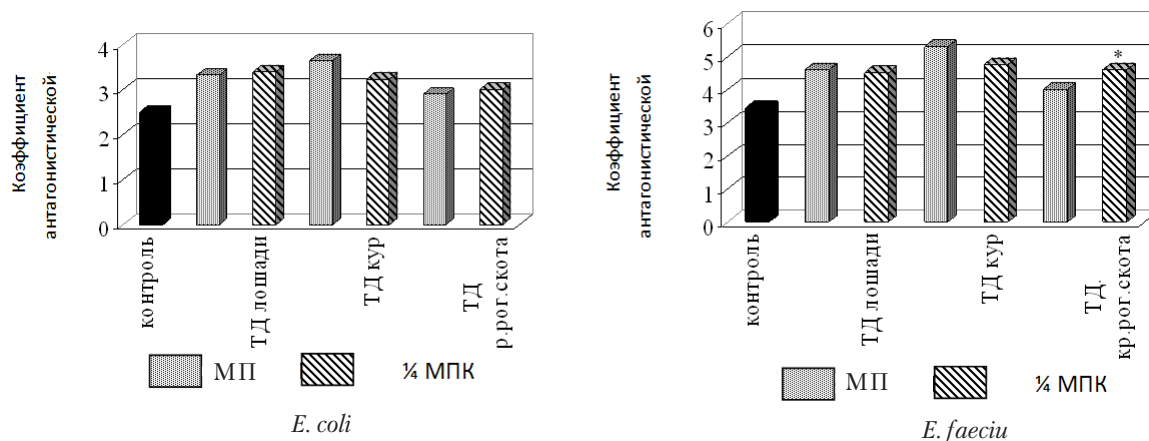
Антимикробные пептиды из тромбоцитов	Контроль	Коэффициент антагонистической активности			
		L364	L370	<i>E. coli</i>	<i>E. faecium</i>
		3,72±0,58	4,6±1,43	2,50±0,168	2,41±0,180
Лошади	МПК	4,3±1,01	4,6±0,45	3,31±0,330*	3,66±0,352*
	1/4 МПК	4,9±0,97	12,1±7,98	4,84±0,840*	3,74±0,443*
Крупного рогатого скота	МПК	4,8±1,02	15,2±6,51	4,25±0,804	3,25±0,401
	1/4 МПК	8,4±2,31	7,6±3,8	4,29±0,430**	2,92±0,223
Кур	МПК	8,2±2,04	7,3±2,27	4,38±0,708*	3,62±0,328**
	1/4 МПК	6,2±1,33	8,8±1,32	4,00±0,360**	3,46±0,410*

Примечание: * – достоверность различий коэффициента антагонистической активности в контроле и после соинкубирования с кислотным экстрактом тромбоцитов ($p<0,05$); ** – ($p<0,01$).

Таблица 2. Влияние антимикробных пептидов из тромбоцитов сельскохозяйственных животных на чувствительность *S. albicans* к антагонистически активным веществам бактерий рода *Lactobacillus*

Антимикробные пептиды из тромбоцитов	Контроль	Коэффициент антагонистической активности лактобацилл	
		L364	L370
		5,5±1,20	6,6±1,53
Лошади	МПК	8,4±1,70	7,8±1,40
	1/4 МПК	11,7±2,04*	12,7±2,22*
Крупного рогатого скота	МПК	7,5±1,19	5,4±0,63
	1/4 МПК	12,1±1,65**	8,6±1,20
Кур	МПК	12,8±1,27**	14,9±1,74**
	1/4 МПК	14,0±2,76*	9,8±2,84

Примечание: * – достоверность различий коэффициента антагонистической активности в контроле и после соинкубирования с кислотным экстрактом тромбоцитов ($p<0,05$); ** – ($p<0,01$).



Примечание: * – достоверность различий коэффициента антагонистической активности в контроле и после соинкубирования с кислотным экстрактом тромбоцитов ($p < 0,05$).

Рисунок 1. Влияние антимикробных пептидов из тромбоцитов сельскохозяйственных животных на чувствительность *E. coli* к антагонистически активным веществам *E. coli* и *E. faecium*

коэффициент антагонистической активности *E. coli* и *E. faecium* повышался на 29,2% и на 38% ($p < 0,05$), соответственно.

Заключение

Таким образом, тромбодифензины сельскохозяйственных животных преимущественно повышали чувствительность условно-патогенных микроорганизмов к факторам межмикробного воздействия представителей нормальной микрофлоры макроорганизма. Максимальный стимулирующий эффект отмечен в отношении чувствительности *C. albicans* к антагонистичес-

ки активным веществам лактобацилл и чувствительности *S. aureus* и *E. coli* к антагонистически активным веществам *E. coli* и *E. faecium* под действием кислотного экстракта из тромбоцитов птицы. Полученные данные позволяют предположить, что известная способность антимикробных пептидов эндогенного происхождения, в том числе и тромбодифензинов, к изменению структуры мембран способствует проникновению в микробную клетку факторов межмикробного взаимодействия, обуславливающих антагонистическую активность в отношении условно-патогенных микроорганизмов.

03.09.2012

Список литературы:

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологии. – Л.: Гос. изд. мед. лит., 1962. – 177 с.
2. Дьяченко, С.В. Фармакоэпидемиологические основы антибактериальной терапии распространенных заболеваний. – Хабаровск: Изд. центр ГОУ ВПО ДВГМУ, 2010. – 402 с.
3. Кудлай Д.Г., Лиходед В.Г. Бактериоциногенез. – М.: Медицина, 1966. – 203 с.
4. Пономарев С.В., Кубенский Е.Н. Новая тактика в лечении больных с острыми кишечными инфекциями // Поликлиника. – 2003. – №3. – С. 33–35.
5. Яковлев В.П., Яковлев С.В. Рациональная антимикробная фармакотерапия. – М.: Мир, 2008. – 1001 с.
6. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
7. Collins M.D., Gibson G.R. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approach for modulating the microbial ecology of the gut // Am. J. Clin. Nutr. – 1999. – V. 69, №5. – P. 1052–1057.
8. Tang Y.Q., Yeaman M.R., Selsted M.E. Antimicrobial peptides from human platelets // Infection and Immunity. – 2002. – Vol. 70, №12. – P. 6524–6533.
9. Jenssen H., Hamill P., Hancock R.E. Peptide antimicrobial agents // Clinical Microbiology Reviews. – 2006. – Vol. 19, №3. – P. 491–511.

Сведения об авторах:

Сычева Мария Викторовна, заведующий кафедрой микробиологии и заразных болезней Оренбургского государственного аграрного университета, доцент, кандидат биологических наук 460795, г. Оренбург, ул. Челюскинцев, 18, 4 корпус, каб. 4308, тел. (3532) 999713, e-mail: sycheva_maria@mail.ru

Галиуллина Лена Фаильевна, аспирант кафедры микробиологии и заразных болезней Оренбургского государственного аграрного университета, e-mail: corleone1954@mail.ru

Карташова Ольга Львовна, заведующий лабораторией по изучению механизмов и регуляции персистенции бактерий Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук, доцент, доктор биологических наук 460795, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11, тел. (3532) 774463, e-mail: labpersist@mail.ru

UDC 577.15

Sycheva M.V.¹, Galiullina L.F.¹, Kartashova O.L.²

¹Orenburg State Agrarian University

²Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UrD RAS

THE INFLUENCE OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM PLATELETS OF FARM ANIMALS ON SENSITIVITY OF MICROORGANISMS TO ANTAGONISTIC ACTIVE OF REPRESENTATIVES OF NORMAL MICROFLORA

Influence of antimicrobial peptides from platelets of agricultural animals on sensitivity of opportunistic microorganisms to antagonistic active representatives of normal microflora is studied. It is established that acid extracts from platelets of agricultural animals increase sensitivity of opportunistic microorganisms to antagonistic active substances of bacteria of *Lactobacillus*, *Esherichia* and *Enterococcus*. The greatest change of a sign at clones *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans* at joint incubation bacteria with defensins isolated from platelets of horned cattle and hens is registred.

Key words: cationic antimicrobial peptides, thrombodefensins, bacteria, antagonistic active substances, representatives of normal microflora.

Bibliography:

1. Ashmarin I.P., Vorobyov A.A. Statistic methods in microbiology. – L.: Gos.isd. med. lit., 1962. – 177 p.
2. Dyachenko, S.V. Pharmacoepidemiological basis of antibacterial therapy of common dieses. – Khabarovsk: GOU VPO DVGMU, 2010. – 402 p.
3. Kudlai D.G., Lihoded V.G. Bacteriocynogenity. – M.: Medicine, 1966. – 203 p.
4. Ponomarev S.V., Kubeskii E.N. A new approach for the therapy of patients with acute intestinal infections // Poliklinika. – 2003. – №3. – P. 33–35.
5. Yakovlev V.P., Yakovlev S.V. Rational antibacterial therapy. – M.: Mir, 2008. – 1001 p.
6. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochev. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
7. Collins M.D., Gibson G.R. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approach for modulating the microbial ecology of the gut // Am. J. Clin. Nutr. – 1999. – V. 69, №5. – P. 1052–1057.
8. Tang Y.Q., Yeaman M.R., Selsted M.E. Antimicrobial peptides from human platelets // Infection and Immunity. – 2002. – Vol. 70, №12. – P. 6524–6533.
9. Jenssen H., Hamill P., Hancock R.E. Peptide antimicrobial agents // Clinical Microbiology Reviews. – 2006. – Vol. 19, №3. – P. 491–511.