

УДК 619:579

ДИНАМИКА АНТИЛИЗОЦИМНОЙ АКТИВНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ

Л.Ф. ГАЛИУЛЛИНА, М.В. СЫЧЕВА, О.Л. КАРТАШОВА

ГАЛИУЛЛИНА Ленара Фаилевна – аспирант ФГБОУ ВПО «Оренбургский ГАУ»

СЫЧЕВА Мария Викторовна – заведующая кафедрой микробиологии и заразных болезней ФГБОУ ВПО «Оренбургский ГАУ», кандидат биологических наук, доцент

КАРТАШОВА Ольга Львовна – заведующая лабораторией по изучению механизмов и регуляции персистенции бактерий, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН, доктор биологических наук, профессор

Адрес: ул. Челюскинцев, 18, г. Оренбург, РФ, 460014. Тел.: (+7)922-851-16-58, 8(3532)99-97-13, 8(3532)77-44-63. E-mail: lenara.galiullina@mail.ru; sycheva_maria@mail.ru; labpersist@mail.ru

Ключевые слова: катионные антимикробные пептиды, тромбодифенсины, бактерии, антилизоцимная активность, персистенция *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*

Приведены результаты, подтверждающие пептидов тромбоцитов лошадей, крупного рогатого скота и кур снижать антилизоцимную активность *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*. Рис.2. Библ. 7

Устойчивое существование симбионтов и условно-патогенных микроорганизмов в биоценозе макроорганизма возможно при наличии определённых биологических свойств микробов, направленных на деградацию факторов защиты хозяина. Бактериальная клетка имеет ряд приспособлений для преодоления механизмов неспецифической защиты, одним из которых является антилизоцимная активность [5].

Способность инактивировать лизоцим присуща микроорганизмам многих видов. Благодаря данному свойству микрофлора приобретает способность к заселению различных экониш и длительному переживанию (персистированию) в макроорганизме, что значительно затрудняет терапию инфекционных заболеваний.

В настоящее время одним из эффективных путей борьбы с персистирующей инфекцией является воздействие на микроорганизмы различными веществами, влияющими на экспрессию их персистентных свойств [4,6]. В этом аспекте особый интерес представляют низкомолекулярные катионные белки из тромбоцитов сельскохозяйственных животных.

Согласно данным литературы антимикробная активность тромбоцитарного катионного белка, прежде всего, связана с его мембранотропностью и определяется его катионными свойствами. Процесс связывания и последующего внедрения этих соединений через мембрану сопровождается нарушением ее структурной целостности и как следствие - дезорганизацией мультиферментных комплексов, сосредоточенных на поверхности мембран, а также синтеза белков. Вероятно, в результате этих изменений происходит нарушение ключевых процессов метаболизма, в том числе синтеза ферментов, направленных на инактивацию лизоцима [3].

Всестороннее изучение антимикробных свойств данной группы белков, в том числе влияния на антилизоцимную активность, на наш взгляд, станет предпосылкой для разработки новых, более рациональных методов лечения инфекционных заболеваний.

Цель настоящего исследования - изучение динамики антилизоцимной активности условно-патогенных микроорганизмов под влиянием антимикробных пептидов из тромбоцитов сельскохозяйственных животных.

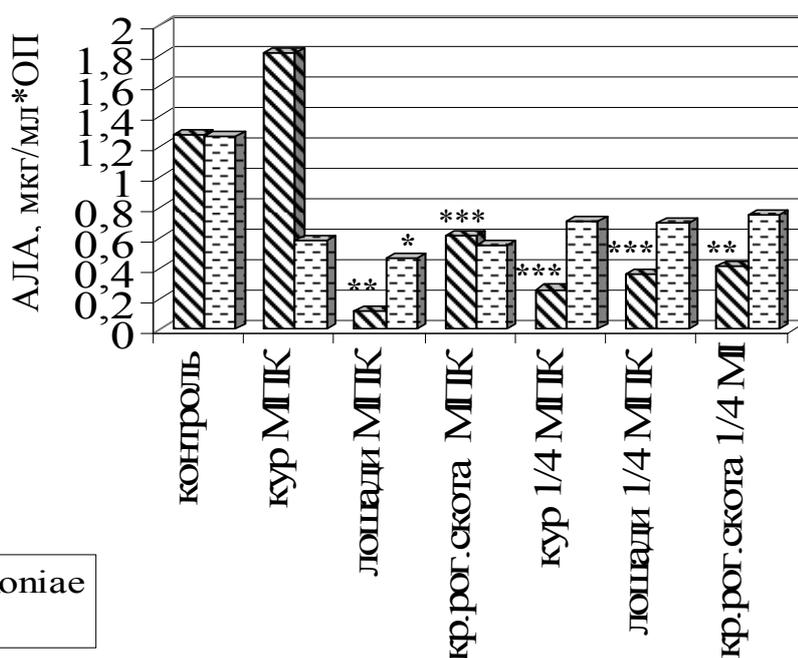
Материалы и методы. В опыте были использованы антимикробные вещества, полученные из кровяных пластинок методом кислотной экстракции. Общее количество белка в полученных экстрактах определяли по методу Бредфорда [7]. В качестве тест-культур использовали клоны *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae* с высоким уровнем антилизоцимной активности. Суточные культуры условно-патогенных микроорганизмов соинкубировали с кислотными экстрактами из тромбоцитов в ранее установленных нами концентрациях, соответствовавших одной минимальной подавляющей концентрации (МПК) и ¼ МПК.

Определение антилизоцимной активности микроорганизмов после соинкубирования осуществляли с помощью фотометрического метода [2].

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

Результаты исследований. Все кислоторастворимые белки тромбоцитов ингибировали способность изученных микроорганизмов разрушать лизоцим. В процессе сравнительного анализа полученных данных максимально выраженное изменение АЛА было выявлено у *K. pneumoniae* в результате воздействия тромбоцитарными катионными белками лошади в МПК, при этом антилизоцимный признак снижался в 11,1 раза ($p < 0,01$). Под влиянием кислоторастворимых белков из кровяных пластинок лошади в 1/4 МПК АЛА *K. pneumoniae* уменьшалась в 3,5 раза. Выявленное подавление антилизоцимного маркера *K. pneumoniae* было выявлено у антимикробных пептидов из тромбоцитов птицы в 1/4 МПК, ингибирующая активность которых превышала 80% по сравнению с исходным уровнем признака ($p < 0,001$) (рисунок 1).

Рисунок 1 - Изменение антилизоцимной активности *K. pneumoniae* и *S. aureus* под влиянием антимикробных пептидов из тромбоцитов сельскохозяйственных животных

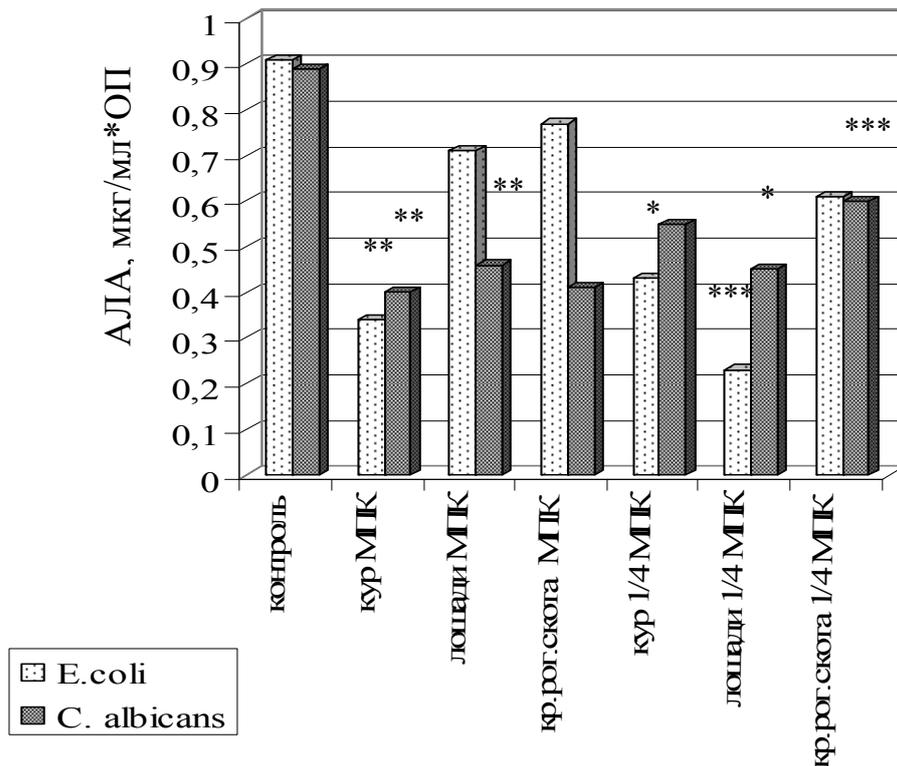


Примечание: * - достоверность различий АЛА в контроле и после соинкубирования с кислотным экстрактом тромбоцитов ($p < 0,05$), ** - ($p < 0,01$), *** - ($p < 0,001$).

Наибольший подавляющий эффект на антилизоцимный тест *S. aureus* и *E. coli* оказывали антимикробные пептиды из кровяных пластинок лошади. Так, тромбоцитарный катионный белок лошади в МПК снижал антилизоцимную активность *S. aureus* в 2,7 раза, а при воздействии 1/4 МПК было зарегистрировано снижение среднего значения изучаемого признака кишечной палочки в 3,9 раза.

В отношении антилизоцимной активности *C. albicans* наиболее активными оказались антимикробные кислоторастворимые белки кур. Культивирование *C. albicans* в присутствии тромбоцитарных катионных белков птицы в МПК сопровождалось снижением АЛА в 2,2 раза по сравнению с контролем ($p < 0,01$) (рисунок 2).

Рисунок 2 – Изменение антилизоцимной активности *E. coli* и *C. albicans* под влиянием антимикробных пептидов из тромбоцитов сельскохозяйственных животных



Примечание: * - достоверность различий АЛА в контроле и после соинкубирования с кислотным экстрактом тромбоцитов ($p < 0,05$), ** - ($p < 0,01$), *** - ($p < 0,001$)

При соинкубировании антимикробных пептидов из кровяных пластинок крупного рогатого скота в МПК с клонами *C. albicans* отмечено снижение антилизоцимной активности в 2,2 раза.

Заключение

В результате проведенных исследований установлено, что антимикробные пептиды из тромбоцитов сельскохозяйственных животных снижают антилизоцимную активность условно-патогенных микроорганизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологии. — Л.: Гос. изд. мед. лит. - 1962. 177 с.
2. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. - М.: Медицина, 1999.- 368с.
3. Бухарин О.В., Черешнев В.А., Сулейманов К.Г. Антимикробный белок тромбоцитов. - Екатеринбург, 2000. – 200 с.
4. Бухарин О.В., Перунова Н.Б., Эль-Регистан Г.И. и др. Влияние химического аналога внеклеточных микробных ауторегуляторов на антилизоцимную активность бактерий // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2007.- №7. – С. 3-6.
5. Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М. и др. Механизмы выживания бактерий. - М.: Медицина, 2005.- 367 с.
6. Перунова Н.Б. Модифицирующее влияние эфирных масел растений на биологические свойства *Candida albicans* // Проблемы медицинской микологии. - 2006.-Т.8.-№2.-С.59.
7. 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.

UDC 619:579

C-95

DYNAMICS OF ANTILIZOCYM ACTIVITY OF MICROORGANISMS AFTER THE INFLUENCE OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM PLATELETS OF AGRICULTURAL ANIMALS

GALIULLINA, Lenara F., post-graduate Orenburg State Agrarian University

Address: Yubileynaya St., 3, q. 2, Nezinka v.– 1, the Orenburg ar., the Orenburg reg.

Tel. 8 9228511658, E-mail: lenara.galiullina@mail.ru

KARTASHOVA, Olga L., Head of the Laboratory for the Study of the mechanism and regulation of persistence of bacteria, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Russian Academy of Sciences, Doctor of Biological Sciences, Professor

Address: st. Pionerskay, 11, Orenburg, Russia, 460000

Tel. (83532) -77-44-63. E-mail: labpersist@mail.ru

SYCHEVA, Maria V., Head of the Department of Microbiology and infectious diseases FGBOU VPO "Orenburg SAU", PhD, Associate Professor

Location: st. Chelyuskintcev, 18, Orenburg, Russia, 460014

Tel. (83532) -99-97-13. E-mail: sycheva_maria@mail.ru

Key words: cationic antimicrobial peptides, thrombodefensins, bacteria, antilysozyme activity, persistence.

Summary: Thrombodefensins isolated from platelets of agricultural animals reduce antilysozyme activity of microorganisms. Fig.2. Ref.7.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES. 1. Ashmarin I.P., Vorobyov A.A. Statistic methods in microbiology. L.: Gos.isd. med. lit. - 1962. 177 c. 2. Buharin O.V. Persistentsiya patogennich bakterii. M: Medicina, 1999. – P. 368c. 3. Bukharin O.V., Chereshev V.A., Suleymanov K.G. Antimicrobial protein platelet. Yekaterinburg, 2000. - 200 p. 4. Buharin O.V., Perunova N.B., El-Registan G.I. et al. Vlianiye khimicheskogo analoga vnekletochnykh mycobnich avtoreguljatorov na antilysozimnuju aktivnost bakterii // Gurnal microbiologii, epidemiologii I immunobiologii. – 2007. – Vol. 7. – P. 3-6. 5. Buharin O.V., Gintsburg A.L., Romanova Yu.M. et al. Mechanismi vigivaniya bakteri. M: Medicine, 2005. – 367 p. 6. Perunova N.B. Modificirujhee vlijanie efirnich masel rasteni na biologicheskie svoistva *Candida albicans* // Problemi medicinskoj mycologii. - 2006. - Vol.8. - No2. - P.59. 7. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities oftein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. - 1976. - Vol. 72. – P. 248-254.