

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ ИЗ ТРОМБОЦИТОВ ЖИВОТНЫХ НА ФАКТОРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ

О.Л. КАРТАШОВА, В.В. ДЫМОВА, М.В. СЫЧЕВА

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

ДЫМОВА Вероника Викторовна – аспирант кафедры микробиологии и заразных болезней ФГБОУ ВПО «Оренбургский ГАУ».

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

Адрес: ул. Челюскинцев, 18, г. Оренбург, РФ, 460014. Тел. (83532)-77-44-63, (83532)-99-97-13.

E-mail: labpersist@mail.ru; nika.kuranova@yandex.ru; sycheva_maria@mail.ru

Ключевые слова: бактерии, антимикробные пептиды, тромбоденсин, гемолитическая активность, протеолитическая активность.

Изучено влияние пептидов из тромбоцитов сельскохозяйственных животных и кур на факторы вирулентности микроорганизмов. Рис.1. Библ. 7.

Известно, что способность секретировать экзоферменты (протеазы, гемолизины) является для большинства бактерий необходимым условием сохранения жизнеспособности в организме хозяина. Это одна из функций, определяющая их патогенность, а также влияющая на тяжесть течения инфекционной патологии [4]. Поэтому поиск веществ и создание на их основе лекарственных препаратов, направленных на ингибирование факторов вирулентности, является не только фундаментальным, но и прикладным направлением медицины и ветеринарии 21 века. В этом смысле перспективной группой соединений являются антимикробные пептиды (АМП) системы врожденного иммунитета макроорганизма, которые в отличие от традиционных антибиотиков и искусственно синтезированных препаратов не вызывают развитие резистентности со стороны патогена.

Еще в конце 20 века учеными было установлено, что АМП, выделенные из тромбоцитов (тромбоцитарные катионные белки, тромбоденсин), обладают антимикробной, противовирусной и противоопухолевой активностями [2]. Проведены исследования по определению способности данных веществ изменять персистентные свойства микроорганизмов. Однако вопрос о влиянии тромбоцитарных катионных белков на секретлируемые факторы вирулентности остаётся мало изученным. Всё выше изложенное и предопределило **цель настоящего исследования** - изучить влияние антимикробных пептидов из тромбоцитов сельскохозяйственных животных и птиц на гемолитическую и протеолитическую активность условно-патогенных микроорганизмов.

Материалы и методы. В работе был использован кислотный экстракт тромбоцитов, полученных из крови клинически здоровых лошадей, крупного рогатого скота и кур. Содержание белка определяли по методу М.М. Брэдфорда [6]. В качестве тест-штаммов использовали клоны микроорганизмов: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxitoca* и *Candida albicans*.

Взвесь суточных культур условно-патогенных микроорганизмов в стерильном физиологическом растворе соинкубировали с кислотным экстрактом из тромбоцитов в минимальной подавляющей концентрации (МПК) и ¼ МПК, установленных нами ранее, в течение 1 часа при 37°C. Гемолитическую активность определяли по методу Бухарина с соавт. (2005) [3]. Активность протеаз исследуемых микроорганизмов определяли по убыли альбумина после его инкубации с исследуемыми штаммами биуретовым методом [5]. Полученные данные подвергали статистической обработке с использованием t-критерия Стьюдента [1].

Результаты исследования.

Установлено, что кислотные экстракты из тромбоцитов всех видов сельскохозяйственных животных ингибировали протеолитическую активность *C. albicans*, но оказывали преимущественно стимулирующее влияние на данный признак у бактерий.

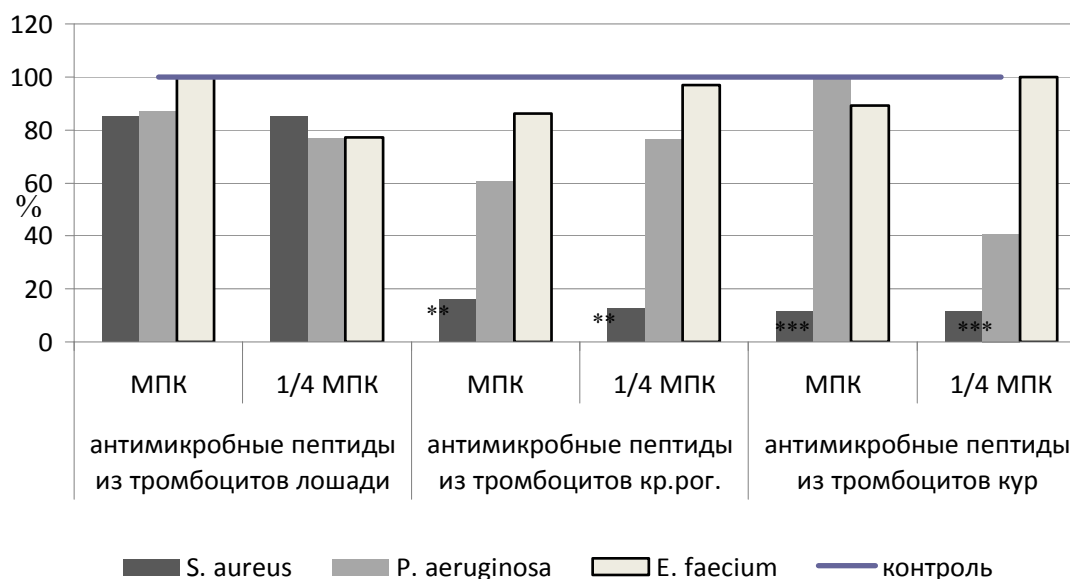
Так, наибольшее увеличение рассматриваемого показателя в 3,2 раза у *E. coli* отмечалось в ответ на воздействие тромбоцитарными катионными белками лошади в МПК. Протеолитическая активность *S. aureus* после соинкубирования с АМП из кровяных пластинок крупного рогатого скота в МПК возрастала в 1,6 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$), *K. oxytoca* - в 2,9 раза под действием МПК кислотного экстракта из тромбоцитов кур.

Под влиянием антимикробных пептидов из кровяных пластинок крупного рогатого скота наблюдали незначительное снижение активности протеаз *E. coli* на 17,9%. Аналогичный эффект оказывали АМП из тромбоцитов кур в МПК, но при снижении концентрации тромбоцитарные катионные белки птицы стимулировали протеолитическую активность кишечной палочки, и ее значение превысило контрольное на 32%.

Тенденцию к уменьшению исследуемого признака у *C. albicans* наблюдали во всех случаях. Исключение составили антимикробные пептиды лошади в МПК, которые стимулировали протеолитическую активность грибов.

Влияние тромбоцитарных катионных белков на гемолитическую активность микроорганизмов имело следующие особенности (рисунок): антимикробные пептиды из тромбоцитов сельскохозяйственных животных уменьшали ГА *S. aureus*, *P. aeruginosa* в 100%; *E. faecium* – в 66,8% случаев. При соинкубировании кислотного экстракта из тромбоцитов кур со *S. aureus* отмечалось достоверное снижение выраженности данного признака на 88,53% ($p < 0,001$), для *P. aeruginosa* - на 59,1%.

В меньшей степени изменялась выраженность ГА бактерий под действием кислотного экстракта из кровяных пластинок крупного рогатого скота и лошади, однако в отношении исследуемого признака у *E. faecium* данные антимикробные пептиды в ¼ МПК оказались наиболее эффективными, уменьшая разрушение эритроцитов в 1,3 раза.



Примечания: ** достоверность различий показателя гемолитической активности в контроле и после соинкубирования с кислотным экстрактом тромбоцитов ($p < 0,01$), ***($p < 0,001$).

Рисунок - Изменение выраженности ГА бактерий под действием антимикробных пептидов из тромбоцитов сельскохозяйственных животных

Таким образом, белки тромбоцитов сельскохозяйственных животных оказывают ингибирующее действие на гемолитическую активность микроорганизмов и протеолитическую активность *C. albicans*, но стимулируют активность протеаз у бактерий. Известно, что антимикробные пептиды являются относительно устойчивыми к протеолитической деградации, в то же время некоторые микроорганизмы могут синтезировать протеазы, расщепляющие и инактивирующие их. Вероятно, выделение большого количества протеаз – защитная реакция бактерий на увеличение концентрации в среде антимикробного белка [7].

ЛИТЕРАТУРА. 1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологии. Л.: Гос. изд. мед. лит. - 1962. 177 с. 2. Бухарин О.В., Черешнев В.А., Сулейманов К.Г. Антимикробный белок тромбоцитов. Екатеринбург, 2000. 200 с. 3. Бухарин О.В., Усвяцов Б.Я., Ханина Е.А. Взаимодействие бактерий и эритроцитов // Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2005. № 4. С.89-95. 4. Гершанович В.Н. Биохимия и генетика транспорта ионов у бактерий. М.: Медицина, 1995. - 250 с. 5. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии. М.: Издательский центр «Академия», 2005. - 608 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. Nizet V. Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens // Curr Issues Mol Biol. 2006. Vol.8. P.11-26.

UDC 619:579

INFLUENCE THE ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM PLATELETS OF FARM ANIMALS FOR THE VIRULENT CHARACTERISTICS MICROORGANISM

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

DYMOVA, Veronica V., graduate student of microbiology and infectious diseases FGBOU VPO "Orenburg SAU"

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

Tel. (83532) -99-97-13. E-mail: nika.kuranova@yandex.ru

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

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

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

Keywords: bacteria, cationic antimicrobial peptides, thrombodefensins, hemolytic activity, proteolytic activity.

Summary: Influence of antimicrobial peptides from platelets of agricultural animals on some virulence factors of microorganisms. Is set an inhibitory effect of these substances on haemolytic activity of bacteria and multidirectional impact on the proteolytic activity of microorganisms. Fig.1. Ref.7.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES. 1. Ashmarin I.P., Vorobyov A.A. Statistic methods in microbiology. L.: Gos.isd. med. lit. - 1962. 177 с. 2. Bukharin O.V., Chereshnev V.A., Suleymanov K.G. Antimicrobial protein platelet. Yekaterinburg 2000. 200 p. 3. Bukharin O.V., Usvyatsov B.J., Hanina E.A. Vsaimodejstvie bakterij i eritrocitov// Journal of Microbiology Epidemiology and immunobiology. 2005. Vol. 4. P.89-95. 4. Gershanovich V.N. Biochemistry and genetics of ion transport in bacteria. M.: Medizina, 1995. 250 p. 5. Netrusov A.I., Egorov M.A., Zakharchuk L.M. Workshop on microbiology. M: Publishing Center "Academy", 2005, 608 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. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248-254. 7. Nizet V. Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens //Curr Issues Mol Biol. 2006. Vol.8. P.11-26