УДК 619:579:636.52/.58

Ю.И. Пешкова, М.В. Сычева, Т.М. Пашкова

ВЛИЯНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ ТРОМБОЦИТОВ *GALLUS GALLUS* НА ПЕРСИСТЕНТНЫЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ

Ключевые слова: катионные антимикробные пептиды; тромбоденсин; бактерии; антилизотическая активность; антикарнозная активность; персистенция.

Введение. Для сохранения возбудителя от бактерицидных факторов сыворотки крови или фагоцитов микробная клетка способна продуцировать секретируемые бактериальные субстанции, направленные на деградацию механизмов клеточной и гуморальной защиты и обеспечивающие длительное переживание патогена в макроорганизме.

Одними из наиболее значимых персистентных свойств микроорганизмов, которые позволяют им длительно существовать в организме хозяина и определяют формирование бактерионосительства, являются антилизотическая и антикарнозная активности [1, 2].

Подавление препаратами персистирующих свойств возбудителя затрудняет его паразитирование в макроорганизме и тем самым повышает эффективность лекарственных воздействий [3]. Поэтому поиск веществ и создание на их основе лекарственных препаратов, направленных на ингибирование факторов персистен-

ции, – не только фундаментальное, но и прикладное направление медицины и ветеринарии XXI века. В этом смысле перспективной группой соединений являются антимикробные пептиды (АМП) из тромбоцитов курицы домашней (*Gallus gallus*) – тромбоденсин (ТД), обладающие выраженной бактерицидной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов [4].

Всё вышеизложенное актуализирует постановку **цели** нашей работы – изучение антиперсистентных свойств АМП из тромбоцитов *G. gallus*.

Материал и методы исследования. При проведении работы были использованы три гомогенные пептидные фракции (№№ 29, 30 и 31) с выраженным антимикробным действием, которые были получены из уксуснокислого экстракта тромбоцитов курицы домашней методом обращённо-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) в сту-

пенчатом и линейном градиентах увеличения концентрации органического растворителя.

Изучение влияния АМП на персистентные характеристики – антилизоцимную и антикарнозиновую активности – проводили на клонах *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, которые соинкубировали с исследуемыми АМП в минимальной подавляющей концентрации (МПК) и ¼ МПК, установленных нам ранее [5], в течение 1 часа, при 37 °С. Далее определяли персистентные свойства по известным методам [6, 7].

Полученные данные подвергали статистической обработке с использованием t-критерия Стьюдента [8].

Результаты исследования. Было установлено, что все использованные в эксперименте тромбоцитарные фракции значимо подавляли способность изученных микроорганизмов инактивировать лизоцим и карнозин.

Наибольший подавляющий эффект на антилизоцимный признак золотистого стафилококка оказывали АМП 29 фракции в МПК ($p < 0,01$), 30 и 31 фракции в ¼ МПК (более 40 % ($p < 0,05$)).

В меньшей степени ингибирующая способность была выражена у пептидов 29 фракции в ¼ МПК (33 %). Пептидные фракции №№ 30 и 31 в МПК характеризовались низким ингибирующим эффектом в отношении антилизоцимного фактора *S. aureus* (22 %) (таблица 1).

При изучении влияния исследуемых пептидов на АЛА кишечной палочки выявлен высо-

кий ингибирующий потенциал у тромбодесиносов 30 фракции в обеих изученных концентрациях (более 65 % ($p < 0,001$)). Умеренное снижение антилизоцимной активности с амплитудой от – 46 % до – 60 % регистрировали после соинкубирования клонов *E. coli* с АМП 31 фракции в МПК ($p < 0,001$) и ¼ МПК ($p < 0,01$) соответственно. Антилизоцимная активность клонов кишечной палочки под воздействием ТД 29 фракции в МПК и ¼ МПК снижалась на 13,3 % и 26,7 % ($p < 0,05$) соответственно.

Аналогичные результаты были получены при исследовании влияния АМП из тромбоцитов *G. gallus* на антикарнозиновую активность микроорганизмов.

Под влиянием АМП всех фракций происходило снижение АКрА золотистого стафилококка на 50–80 %. После соинкубирования клонов *S. aureus* с пептидами 30 фракции в ¼ МПК антикарнозиновый признак перестал определяться (таблица 2).

Максимальный эффект подавления антикарнозиновой активности кишечной палочки наблюдали после соинкубирования с ТД 30 фракции в МПК: снижение уровня АКрА по сравнению с исходным на 98 % ($p < 0,001$). Ингибирующая активность АМП 31 фракции в МПК и ¼ МПК достигала 50 % ($p < 0,05$) и 70 % ($p < 0,001$) соответственно по сравнению с исходным уровнем признака. Пептиды 29 фракции снижали АКрА клонов *E. coli* в условиях *in vitro* на 25–30 %.

Таблица 1 Влияние антимикробных пептидов из тромбоцитов курицы домашней на антилизоцимную активность микроорганизмов ($\bar{X} \pm S_x$)

№ пептидной фракции	Концентрация	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
29	МПК	$0,4 \pm 0,02^{**}$	$1,3 \pm 0,06$
	¼ МПК	$0,6 \pm 0,06$	$1,1 \pm 0,1^*$
30	МПК	$0,7 \pm 0,05$	$0,5 \pm 0,03^{***}$
	¼ МПК	$0,5 \pm 0,07^*$	$0,5 \pm 0,03^{***}$
31	МПК	$0,7 \pm 0,04$	$0,6 \pm 0,03^{***}$
	¼ МПК	$0,5 \pm 0,08^*$	$0,8 \pm 0,1^{**}$
Контроль		$0,9 \pm 0,01$	$1,5 \pm 0,05$

Примечание: * – достоверность различий выраженности АЛА клонов *S. aureus* и *E. coli* в контроле и после соинкубирования с АМП из тромбоцитов кур – ($p < 0,05$); ** – ($p < 0,01$); *** – ($p < 0,001$).

Таблица 2 Влияние антимикробных пептидов из тромбоцитов курицы домашней на антикарнозиновую активность микроорганизмов ($\bar{X} \pm S_x$)

№ пептидной фракции	Концентрация	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
29	МПК	$0,9 \pm 0,2^{**}$	$1,6 \pm 0,07^*$
	¼ МПК	$0,6 \pm 0,09^{***}$	$1,3 \pm 0,09^{**}$
30	МПК	$0,7 \pm 0,08^{***}$	$0,04 \pm 0,001^{***}$
	¼ МПК	0	$1,7 \pm 0,05$
31	МПК	$0,4 \pm 0,03^{***}$	$1 \pm 0,3^*$
	¼ МПК	$1,2 \pm 0,2^{**}$	$0,6 \pm 0,1^{***}$
Контроль		$2,4 \pm 0,1$	$2 \pm 0,1$

Примечание: * – достоверность различий выраженности АКрА клонов *S. aureus* и *E. coli* в контроле и после соинкубирования с АМП из тромбоцитов кур – ($p < 0,05$); ** – ($p < 0,01$); *** – ($p < 0,001$).

Выявленное нами ингибирующее влияние изученных АМП на способность микроорганизмов деградировать лизоцим, карнозин можно объяснить с позиции механизмов антимикробного действия данной группы соединений, в частности, возможного нарушения работы бактериального генома, поскольку известно, что некоторые АМП оказывают губительное действие на микробные клетки за счёт альтернативных механизмов, не связанных с повреждением мембран. Так, в работе E.F. Haney et al. (2013), показано, что производные антимикробных пептидов из эндосперма пшеницы могут связывать дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК) и тем самым блокировать макромолекулярный синтез [9]. Выявлено, что буфорин II и тахиплезин, проникнув через мембрану бактериальной клетки, способны взаимодействовать с ДНК [10].

Выводы. Анализ динамики персистентных характеристик под влиянием антимикробных

пептидов из тромбоцитов курицы домашней показал однозначное значимое снижение изучаемых показателей вплоть до исчезновения отдельных (АКрА) персистентных свойств; максимальный ингибирующий эффект в отношении антилизоцимного и антикарнозинового признаков *S. aureus* и *E. coli* отмечен у пептидных соединений 30 фракции; полученные результаты по характеристике свойств АМП из тромбоцитов курицы домашней являются обоснованием для разработки нового перспективного класса антимикробных препаратов, эффективных в отношении мультирезистентных форм патогенных микроорганизмов, способных длительно персистировать в организме хозяина, которые могут быть в будущем использованы в медицине и ветеринарии для терапии инфекционно-воспалительных заболеваний.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 14-04-97067 p_поволжье_a).

Библиографический список

1. Бухарин, О.В. Микробные ингибиторы лизоцима [Текст] / О.А. Бухарин, А.В. Валышев // Микробиология, эпидемиология и иммунобиология. 2006. № 4. С. 8–13.
2. Антикарнозиновая активность и ее роль в персистенции микроорганизмов [Текст] / О.Л. Карташова, О.В. Бухарин, С.Б. Киргизова, Л.П. Потехина // Вестник Оренбургского государственного университета. 2006. № 12. С. 23–26.
3. Бухарин, О.В. Персистенция патогенных бактерий [Текст] / О.В. Бухарин. М.: Медицина, 1999. 366 с.
4. Изучение биологических эффектов антимикробных пептидов из тромбоцитов кур методом атомно-силовой микроскопии [Текст] / М.В. Сычева, Ю.И. Пешкова, А.С. Васильченко [и др.] // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2015. № 5 (55). С. 198–200.
5. Сычева, М.В. Влияние антимикробных пептидов из тромбоцитов кур на *E. coli* [Текст] / М.В. Сычева, Ю.И. Пешкова, О.Л. Карташова // Вестник ветеринарии. 2015. № 4 (75). С. 40–43.
6. Бухарин, О.В. Способ определения антикарнозиновой активности микроорганизмов [Текст] / О.В. Бухарин, О.Л. Чернова, С.Б. Матюшина // Патент РФ № 2132879. Бюл. №. 19, 1999.
7. Бухарин, О.В. Фотометрическое определение антилизоцимной активности микроорганизмов [Текст] / О.В. Бухарин, А.В. Валышев, Н.Н. Елагина // Микробиология, эпидемиология и иммунобиология. 1997. № 4. С. 117–120.
8. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологии [Текст] / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. Л.: Гос. изд. мед. лит., 1962. 177 с.
9. Haney, E.F. Mechanism of action of pu-roindoline derived tryptophan-rich antimicrobial peptides [Text] / E.F. Haney, A.P. Petersen, C.K. Lau [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta. 2013. Vol. 1828. No. 8. P. 1802–1813.
10. Giuliani, A. Antimicrobial peptides: the LPS connection [Text] / A. Giuliani, G. Pirri, A.C. Rinaldi // Methods Mol. Biol. 2010. Vol. 618. P. 137–154.

Сведения об авторах

1. **Пешкова Юлия Игоревна**, аспирант кафедры микробиологии и заразных болезней ФГБОУ ВО Оренбургский ГАУ. Ул. Челюскинцев, 18, г. Оренбург, Российская Федерация. Тел.: 8 (3532) 68-97-13, e-mail: m.j.i@mail.ru.
2. **Сычева Мария Викторовна**, кандидат биологических наук, доцент, заведующая кафедрой микробиологии и заразных болезней ФГБОУ ВО Оренбургский ГАУ. Ул. Челюскинцев, 18, г. Оренбург, Российская Федерация. Тел.: 8 (3532) 68-97-13, e-mail: sycheva maria@mail.ru.
3. **Пащикова Татьяна Михайловна**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории по изучению механизмов и регуляции персистенции бактерий ФГБУН Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук. Ул. Пио-

нерская, 11, г. Оренбург, Российская Федерация, 460000. Тел.: (83532) 77-44-63, e-mail: pashkova070782@mail.ru.

В статье анализируются антиперсистентные свойства пептидных фракций, выделенных из тромбоцитов *Gallus gallus*. В результате проведенных исследований было установлено, что все использованные в эксперименте тромбоцитарные фракции значительно подавляли способ-

ность изученных микроорганизмов инактивировать лизоцим и карнозин. Максимальный ингибирующий эффект в отношении антилизосимного и антикарнозинового признаков *S. aureus* и *E. coli* отмечен у пептидных соединений 30 фракции.

Yu. Peshkova, M. Sycheva, T. Pashkova

EFFECT OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM *GALLUS GALLUS* PLATELETS ON PERSISTENT PROPERTIES OF MICROORGANISMS

Key words: *cationic antimicrobial peptides; thrombodefensins; bacteria; antilysozyme activity; anticarnosine activity; persistence.*

Authors' personal details

1. **Peshkova Yulia**, Post-graduate student of the Microbiology and Contagious Diseases chair. Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Orenburg State Agrarian University. Russia, Orenburg, Chelyuskintsev St., 18. Phone: 8 (3532) 68-97-13, e-mail: m.j.i@mail.ru.

2. **Sycheva Maria**, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Head of the Microbiology and Contagious Diseases chair. Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Orenburg State Agrarian University. Russia, Orenburg, Chelyuskintsev St., 18. Phone: 8 (3532) 68-97-13, e-mail: sycheva_maria@mail.ru.

3. **Pashkova Tatyana**, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher at the Laboratory on Studies of Bacterium Persistence Mechanisms and Regulation. Federal State Budgetary Scientific Institution Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences. 460000, Russia, Orenburg, Pionerskaya St., 11. Phone: 8 (3532) 77-44-63, e-mail: pashkova070782@mail.ru.

This paper analyzes antipersistent properties of peptide fractions isolated from *Gallus gallus* platelet. As a result of conducted studies it was found that all the platelet fractions used in the experiment significantly inhibited ability of the studied micro-

organisms to inactivate lysozyme and carnosine. Maximum inhibitory effect against antilysozyme and anticarnosine symptoms of *S. aureus* and *E. coli* was observed for peptide compounds of 30 fractions.

© Пешкова Ю.И., Сычева М.В., Пашкова Т.М.