

## Влияние очищенных пептидных фракций из тромбоцитов курицы домашней на гемолитическую и протеолитическую активность бактерий

**М.В. Сычёва**, д.б.н., **Ю.И. Пешкова**, аспирантка, **В.В. Дымова**, к.б.н., ФГБОУ ВО Оренбургский ГАУ; **О.Л. Карташова**, д.б.н., профессор, ИКВС УрО РАН

Поиск новых противомикробных веществ — одна из глобальных проблем, возникших в результате распространения антибиотикорезистентных патогенных микроорганизмов в клинике. Известно, что клетки крови, в частности кровяные пластинки, являются источником различных катионных пептидов, обладающих выраженной биологической активностью [9, 10]. В частности, установлено, что кислотные экстракты, полученные из тромбоцитов и кровяных пластинок животных, обладают широким спектром антимикробной активности [1], повышают чувствительность к антибиотикам и антагонистическому действию нормальной микрофлоры кишечника животных, а также ингибируют факторы персистенции и гемолитическую активность микроорганизмов. Выраженность их действия определяется видом животного, являющегося источником тромболизатов, при этом наиболее эффективным ингибитором персистентных и вирулентных свойств бактерий выступают кислотные экстракты из тромбоцитов курицы домашней [2–4].

Из тромбоцитов курицы домашней выделены индивидуальные фракции пептидов, обладающие

антимикробной активностью [5], с использованием электроаналитических и сепарационных методов детализирован механизм их антимикробного действия [6, 7]. Между тем вопрос о влиянии очищенных АМП из тромбоцитов кур на факторы вирулентности микроорганизмов остаётся открытым. Вышеизложенное определило дальнейшее направление нашей работы — изучение влияния очищенных антимикробных пептидов из тромбоцитов курицы домашней на гемолитическую и протеолитическую активности микроорганизмов.

**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 ступенчатом и линейном градиентах увеличения концентрации органического растворителя [8].

Воздействие очищенных пептидных фракций на гемолитическую активность изучали на трёх клонах *Staphylococcus aureus*. Протеолитическую активность изучали на трёх клонах *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*. Клоны микроорганизмов получали путём посева суточной культуры на плотную пи-

тательную среду в соответствии с указаниями Дж. Миллера (1976). Взвесы суточных агаровых культур в стерильном изотоническом растворе NaCl, содержащем 0,1% раствора бычьего сывороточного альбумина (SIGMA, Германия), соинкубировали с пептидными фракциями из тромбоцитов курицы домашней в предварительно установленных минимальной подавляющей концентрации (МПК) и 1/4 минимальной подавляющей концентрации в течение 1 часа при 37°C.

Количественную оценку гемолитической активности клонов *S. aureus* до и после соинкубирования с пептидными фракциями проводили фотометрическим методом.

Активность протеаз культур микроорганизмов определяли биуретовым методом по убыли альбумина после их инкубации с пептидными фракциями.

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

**Результаты исследования и выводы.** На первом этапе было определено влияние очищенных пептидных фракций на гемолитическую активность *S. aureus*. Все клоны *S. aureus* до соинкубирования с исследуемыми пептидными фракциями обладали гемолитической активностью, среднее значение которой составляло  $17 \pm 1,5\%$  (рис. 1).

После соинкубирования стафилококков с 29-й и 30-й пептидными фракциями в МПК способность к гемолизу эритроцитов у изученных клонов отсутствовала; в 1/4 МПК – значимо снижалась – на 94 и 98% соответственно и составляла  $0,94 \pm 0,174\%$  и  $0,28 \pm 0,075\%$  ( $P < 0,001$ ).

Аналогичные результаты были получены при соинкубировании клонов золотистого стафилококка с пептидами 31-й фракции: гемолитическая активность под влиянием АМП в МПК уменьшалась до  $0,5 \pm 0,02\%$ , в 1/4 МПК – до  $3,23 \pm 0,16\%$ . Разница значений по сравнению с контролем в обеих концентрациях достоверна ( $P < 0,001$ ).

Таким образом, отмечено, что АМП из тромбоцитов курицы домашней ингибировали гемолитическую активность золотистого стафилококка в 100%

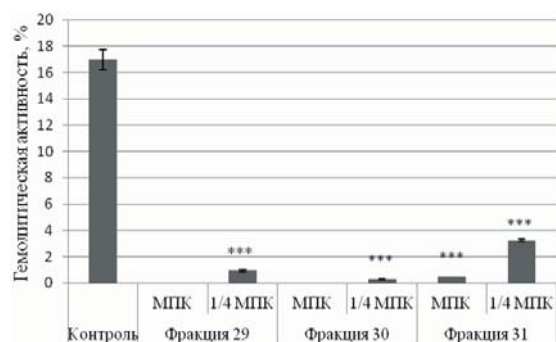


Рис. 1 – Изменение гемолитической активности *S. aureus* под воздействием АМП из тромбоцитов кур: \*\*\* – достоверность различий показателя гемолитической активности в контроле и опыте ( $P < 0,001$ )

случаев, при этом её снижение в большей степени происходило при соинкубировании с пептидными фракциями в МПК.

На втором этапе было оценено влияние очищенных пептидных фракций из тромбоцитов кур на протеолитическую активность *S. aureus* и *E. coli*. В ходе эксперимента было установлено, что изучаемые фракции преимущественно ингибировали протеолитическую активность *S. aureus* (рис. 2).

Максимальный ингибирующий эффект оказывала 31-я фракция в 1/4 МПК: протеолитическая активность *S. aureus* уменьшалась на 36% с  $0,11 \pm 0,002$  мг · мл/мин до  $0,07 \pm 0,003$  мг · мл/мин ( $P < 0,05$ ). Отмечено снижение активности протеаз при соинкубировании *S. aureus* со всеми тремя фракциями в МПК до одинакового значения –  $0,08 \pm 0,004$  мг · мл/мин ( $P < 0,05$ ). Исключение составила 29-я пептидная фракция в 1/4 МПК, которая стимулировала изучаемый признак золотистого стафилококка до  $0,17 \pm 0,003$  мг · мл/мин ( $P < 0,05$ ).

Соинкубирование *E. coli* с тремя пептидными фракциями позволило установить их преимущественно стимулирующее влияние на изучаемый признак (рис. 3).

Пептиды 29-й фракции в 1/4 МПК не оказывали влияния на протеолитическую активность кишечной палочки ( $0,16 \pm 0,008$  мг · мл/мин), в то время как пептиды этой фракции в МПК повышали активность протеаз до  $0,2 \pm 0,0013$  мг · мл/мин. Максимальный стимулирующий эффект в отношении изучаемого признака демонстрировали пептиды 30-й фракции в 1/4 МПК ( $0,25 \pm 0,002$  мг · мл/мин). Соинкубирование с пептидами данной фракции в МПК приводило к снижению протеолитической активности до  $0,15 \pm 0,002$  мг · мл/мин. Пептиды 31-й фракции в МПК и 1/4 МПК оказывали стимулирующий эффект на рассматриваемый фактор вирулентности, увеличивая протеолитическую активность до  $0,17 \pm 0,001$  мг · мл/мин и  $0,18 \pm 0,003$  мг · мл/мин соответственно.

**Вывод.** В ходе эксперимента было установлено, что очищенные антимикробные пептиды, выделен-

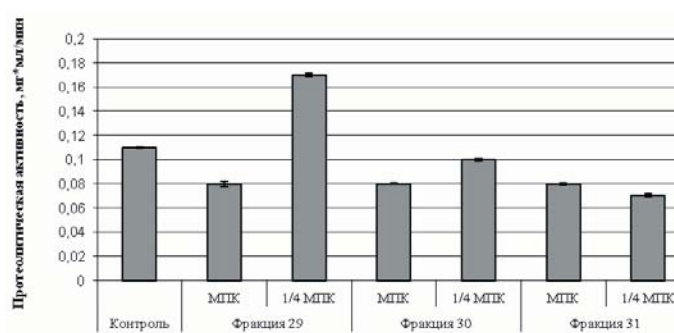


Рис. 2 – Изменение протеолитической активности *S. aureus* под воздействием АМП из тромбоцитов кур: \* – достоверность различий показателя протеолитической активности в контроле и опыте ( $P < 0,05$ )

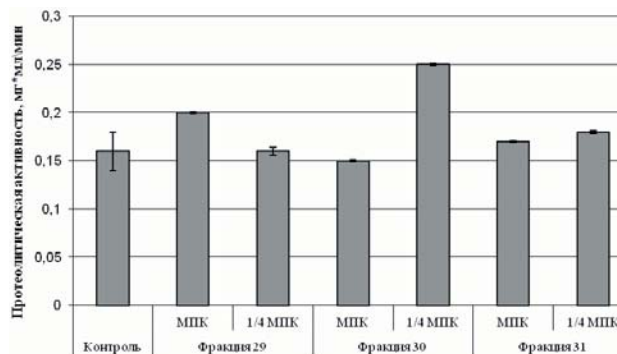


Рис. 3 – Изменение протеолитической активности *E. coli* под воздействием очищенных пептидных фракций

ные из тромбоцитов курицы домашней, оказывают ингибирующее влияние на гемолитическую активность *S. aureus*. Подобный эффект был выявлен Trine S. Ryge et al. (2008), которые не только установили антимикробное действие синтетических АМП, но и показали их ингибирующее воздействие на гемолитическую активность бактерий и грибов [11].

Максимальный эффект (утрата способности разрушать эритроциты) отмечен после соинкубирования стафилококков с 29-й и 30-й пептидными фракциями.

Оценка влияния очищенных пептидных фракций на протеолитическую активность *S. aureus* позволила установить, что АМП из тромбоцитов кур оказывают разнонаправленное влияние на активность протеаз. Эффективно ингибируют протеолитическую активность пептиды 31-й фракции.

Полученные результаты открывают перспективу для дальнейшего изучения АМП из тромбоцитов кур, перспективных в качестве основы для создания

антимикробных препаратов, способных регулировать вирулентный потенциал патогенов.

### Литература

1. Антимакаретальный спектр тромбодифенсинов некоторых видов животных / М.В. Сычѳва [и др.] // Аграрный вестник Урала. 2010. № 7 (73). С. 50–51.
2. Сычѳва М.В., Галиуллина Л.Ф., Карташова О.Л. Влияние антимикробных пептидов из тромбоцитов сельскохозяйственных животных на чувствительность микроорганизмов к антагонистически активным представителям нормальной микрофлоры // Вестник Оренбургского государственного университета. 2011. № 10 (146). С. 78–82.
3. Влияние антимикробных пептидов из тромбоцитов сельскохозяйственных животных на способность микроорганизмов к образованию биопленок / М.В. Сычѳва [и др.] // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. 2011. № 1. С. 130–132.
4. Карташова О.Л., Дымова В.В., Сычѳва М.В. Влияние пептидов из тромбоцитов животных на факторы вирулентности микроорганизмов // Вестник ветеринарии. 2012. № 4. С. 50–52.
5. Биологическая активность антимикробных пептидов из тромбоцитов кур / М.В. Сычѳва [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016. № 2. С. 24–30.
6. Применение электроаналитических и сепарационных методов исследования для оценки механизма биологической активности антимикробных пептидов из тромбоцитов курицы домашней / М.В. Сычѳва [и др.] // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. № 1. 2016. С. 1–8.
7. Сычѳва М.В. Изучение биологических эффектов антимикробных пептидов из тромбоцитов кур методом атомно-силовой микроскопии / М.В. Сычѳва, Ю.И. Пешкова, А.С. Васильченко, О.Л. Карташова, Е.А. Рогожин // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2015. № 5 (55). С. 198–200.
8. Сычѳва М.В., Пешкова Ю.И., Карташова О.Л. Влияние антимикробных пептидов из тромбоцитов кур на *E. coli* // Вестник ветеринарии. 2015. № 4 (75). С. 40–43.
9. Tang Y.-Q., Yeaman M.R., Selsted M.E. Antimicrobial peptides from human platelets // Infection and Immunity. 2002. P. 6529–6533.
10. Ivanov I.B., Gritsenko V.A. Comparative activities of cattle and swine platelet microbicidal proteins // Proteins: Structure, Function and Bioinformatics. 2009. № 1. P. 148.
11. Trine S. Ryge, Niels Frimodt-Müller, Paul R. Hansen. Antimicrobial Activities of Twenty Lysine-Peptoid Hybrids against Clinically Relevant Bacteria and Fungi // Chemotherapy. 2008. P. 152–156.