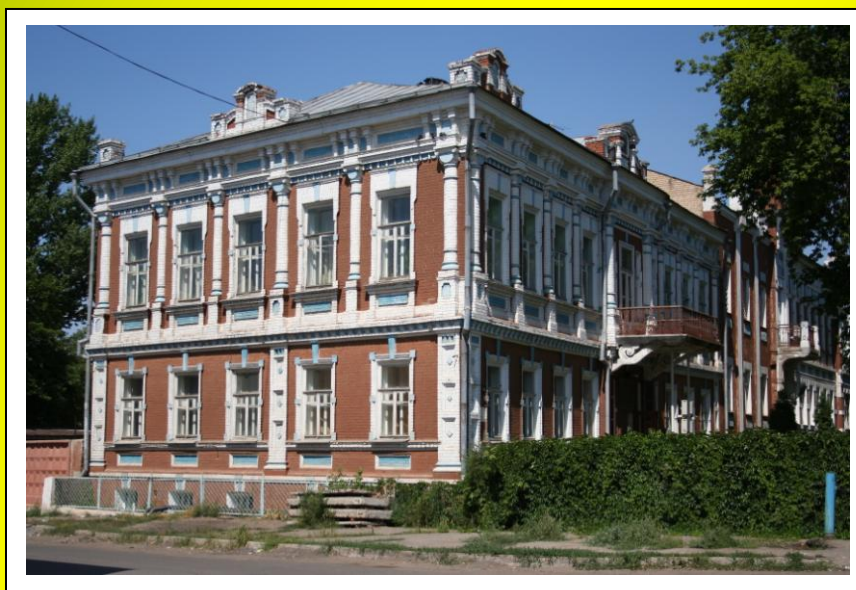


ISSN 2304-9081

Учредители:
Уральское отделение РАН
Оренбургский научный центр УрО РАН

Бюллетень
Оренбургского научного центра
УрО РАН
(электронный журнал)



2013 * № 3

On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

© Коллектив авторов, 2013

УДК 619:579

М.В. Сычева¹, В.В. Дымова¹, О.Л. Карташова²

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ТРОМБОДЕФЕНСИНОВ В ОТНОШЕНИИ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЭНДОГЕННЫХ ИНФЕКЦИЙ

¹ Оренбургский государственный аграрный университет, Оренбург, Россия

² Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

Цель. Изучить антимикробную активность тромбодифенсина в отношении потенциальных возбудителей эндогенных инфекций.

Материалы и методы. В исследованиях использованы штаммы условно-патогенных микроорганизмов *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxitoca*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, которые соинкубировали с тромбодифенсинами (ТД), выделенными из тромбоцитов и кровяных пластинок животных. Гемолитическую, протеолитическую, антикарнозиновую и IgA-протеазную активности микроорганизмов исследовали фотометрическим способом до и после соинкубирования. Морфофункциональную реакцию микроорганизмов на воздействие ТД изучали методом атомно-силовой микроскопии (АСМ).

Результаты. Установлено, что механизм антимикробного действия ТД связан с нарушением структурной организации клеточной стенки бактерий, вследствие чего микробные клетки становятся осмотически неустойчивыми. ТД животных модифицируют биологические свойства микроорганизмов (факторы вирулентности, персистентный потенциал), определяющие их взаимодействие с макроорганизмом.

Заключение. Полученные результаты могут служить экспериментальным обоснованием для дальнейшего изучения свойств ТД, обладающих бактерицидным действием и эффективно ингибирующих персистентный и вирулентный потенциал микроорганизмов, с целью их использования в клинической практике в качестве антимикробного средства.

Ключевые слова: тромбодифенсин, микроорганизмы, факторы патогенности, персистенция, эндогенные инфекции

M.V. Sycheva¹, V.V. Dymova¹, O.L. Kartashova²

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THROMBODEFENCINES IN RESPECT OF POTENTIAL PATHOGENS ENDOGENOUS INFECTIONS

¹ Orenburg State Agrarian University, Orenburg, Russia

² Institute of cellular and intracellular symbiosis UrB RAS, Orenburg, Russia

Aim. Antimicrobial activity of thrombodefencines against potential social agents of endogenous infections is studied.

Materials and methods. The studies have used strains of opportunistic pathogens *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxitoca*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, which were incubated with thrombodefencines (TD) isolated from the platelets and blood platelets animals. Hemolytic, proteolytic, anticarnozine and IgA-protease activities of microorganisms investigated photometrically before and after incubation. Morphological and functional response of microorganisms on the impact of TD was studied by atomic force microscopy (AFM).

Results. It is established that the mechanism of antimicrobial action TD connected with violation of the structural organization of the cell walls of bacteria, resulting in microbial cells

become osmotically unstable. TD animals modify the biological properties of microorganisms (virulence factors, persistent potential), define their interaction with the macroorganism.

Conclusion. The obtained results can serve as pilot substantiated vaniem to further study the properties of TD, possessing bactericidal effect and effectively inhibiting a persistent and virulent potential of microorganisms, with a view to their use in clinical practice as an antimicrobial agent.

Key words: thrombodefencines, microorganisms, pathogenicity factors, persistence, endogenous infection

Введение

В формировании эндогенных бактериальных инфекций важную роль играют персистентные и вирулентные свойства микроорганизмов, способствующие распространению бактерий в организме хозяина и обеспечивающие выживание возбудителей при контакте с гуморальными и клеточными факторами иммунитета макроорганизма [1, 2]. В связи с этим несомненный научный и практический интерес представляет изучение биологических эффектов веществ, обладающих модифицирующей активностью в отношении патогенного и персистентного потенциала микроорганизмов – возбудителей эндогенных инфекций. В качестве таких соединений могут выступать природные антимикробные агенты животного происхождения, в том числе тромбодефенсины (ТД). Локализованные в альфа гранулах тромбоцитов они обладают широким спектром биологических свойств (антимикробной, анти-вирусной, цитотоксической, хемотаксической, иммуномодулирующей активностями) и являются одним из важных факторов поддержания иммунного гомеостаза макроорганизма [3].

Кроме тромбодефенсинов человека «матрицей» для антимикробного препарата могут служить пептиды тромбоцитов и кровяных пластинок животных. По этой причине понимание механизмов биологической активности тромбодефенсинов продуктивных животных и комплексное изучение их действия на патогенный и персистентный потенциал микроорганизмов представляется весьма актуальным. Вышеизложенное предопределило цель настоящего исследования – изучить антимикробную активность тромбодефенсинов животных в отношении потенциальных возбудителей эндогенных инфекций.

Материалы и методы

Выделение антимикробных пептидов из тромбоцитов кур, кровяных пластинок крупного рогатого скота и лошадей осуществляли методом ки-

слотной экстракции. Содержание белка в полученных экстрактах определяли по методу М.М. Брэдфорда (1976) с использованием красителя *Coomassie Brilliant Blue G-250* (SIGMA, Германия) [4]. В исследование были включены клоны условно-патогенных микроорганизмов – потенциальных возбудителей эндогенных инфекций (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxitoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*). Взвесь суточных культур микроорганизмов в стерильном физиологическом растворе соинкубировали с кислотным экстрактом из тромбоцитов и кровяных пластинок в минимальной подавляющей концентрации (МПК) и j МПК, установленных нами ранее, в течение 1 часа при 37°C.

Механизм антимикробного действия тромбодифензинов изучали на музейных культурах *E. coli* и *S. aureus* методом атомно-силовой микроскопии на микроскопе SMM-2000 (ОАО ПРОТОН-МИЭТ, Россия) в контактном режиме в воздушной среде. При микроскопии использовались зонды для контактной атомно-силовой микроскопии MSCT-AUNM (Veeco, США), с жесткостью балки 0,03 Н/м и радиусом кривизны зонда 10 нм.

Количественную оценку выраженности гемолитической активности микроорганизмов до и после соинкубирования с ТД осуществляли с помощью фотометрического метода Е.А. Ханиной с соавт. (2005) [5].

Активность протеаз *E. coli*, *S. aureus*, *K.oxitoca* и *C. albicans* определяли по убыли альбумина после инкубации с исследуемыми штаммами биуретовым методом по А.И. Нетрусову (2005) [6].

Изучение влияния тромбодифензинов *in vitro* на антикарнозиновую активность микроорганизмов проводили в отношении *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* и *K. oxitoca*, по методу О.В. Бухарина с соавторами (1999) [7].

IgA-протеазную активность микроорганизмов определяли с помощью иммуноферментного анализа согласно методике О.В. Бухарина с соавт. (2004) [8]. Объектами исследования служили *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *C. albicans*.

Полученные в ходе исследований данные были обработаны статистически. Достоверность различий сравниваемых показателей оценивалась по t-критерию Стьюдента и критерию Вилкоксона [9].

Результаты и обсуждение

Изучение механизмов биологической активности тромбодифенсинов методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) выявило выраженное мембранотропное действие данной группы соединений, что приводило к изменению целостности барьерных структур клеток условно-патогенных микроорганизмов.

Так, были обнаружены достоверно более высокие средние значения объёмов бактериальных клеток *S. aureus* после соинкубирования с ТД кур и лошади: соответственно - $0,54 \pm 0,18$ ($p < 0,05$) и $0,62 \pm 0,07$ ($p < 0,01$) против $0,33 \pm 0,03$ в контроле. Поверхность *S. aureus* в качественном отношении оказывалась неоднородной, что при количественном анализе фиксировалось как увеличение её шероховатости. При исследовании золотистых стафилококков, обработанных тромбодифенсинами продуктивных животных, детектировалось присутствие между клетками гранулярного материала, являющегося, предположительно, остатками лизировавшихся клеток (рис. 1).

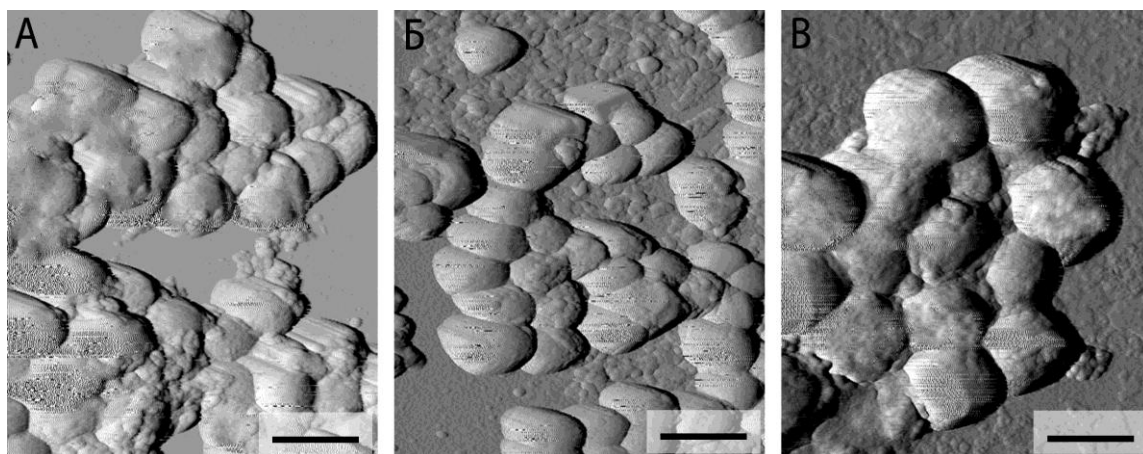


Рис. 1. АСМ-изображения клеток *S. aureus*, инкубированных с экстрактом тромбоцитов птицы (А), кровяных пластинок крупного рогатого скота (Б) и лошади (В). Шкала – 1 мкм.

Исследование биологических эффектов тромбодифенсинов продуктивных животных на микроорганизмы с грамотрицательным типом строения барьерных структур выявило более выраженное действие АМП на данный тип клеток. Совместное инкубирование *E. coli* с изучаемыми АМП вело к лизису значительной части клеточной популяции. Однако при воздействии на микроорганизмы экстракта из тромбоцитов птицы, количество визуально целых клеток в популяции было значительно выше (рис. 2 А), чем в осталь-

ных случаях (рис. 2 Б, В).

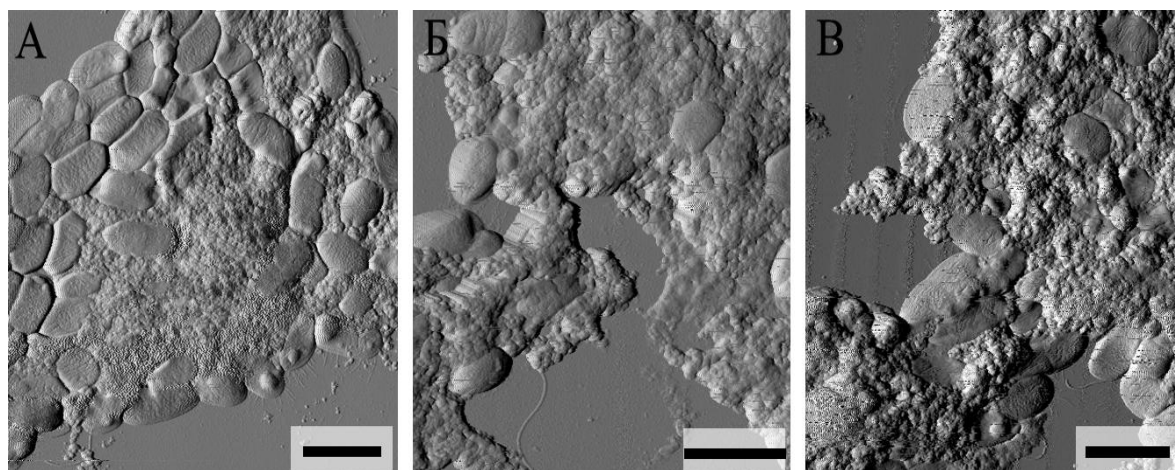


Рис. 2. АСМ-изображения клеток *E. coli*, инкубированных с экстрактом тромбоцитов птицы (А), кровяных пластинок крупного рогатого скота (Б) и лошади (В). Шкала – 2 мкм.

Изучение факторов персистенции микроорганизмов выявило значительное уменьшение выраженности признаков после соинкубирования с тромбодифенсинами продуктивных животных (рис. 3).

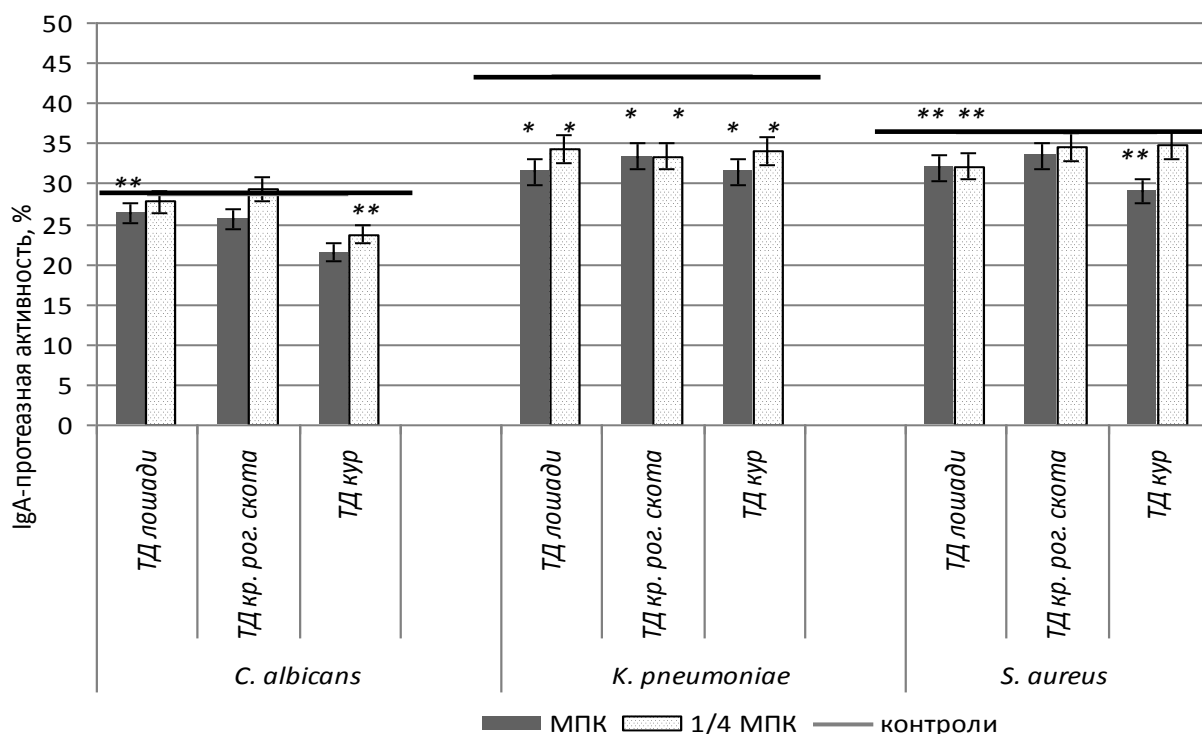


Рис. 3. Влияние тромбодифенсина продуктивных животных на IgA-протеазную активность микроорганизмов.

Обозначения: * - достоверность различий показателя IgA-протеазной активности в контроле и после соинкубирования с ТД - ($p < 0,05$), ** - ($p < 0,01$).

Так, обнаружены достоверно более низкие средние значения IgA-протеазной активности (21-34,9%) у клонов *S. aureus*, *K. pneumoniae* и *C. albicans* после воздействия антимикробными пептидами из тромбоцитов кур, кровяных пластинок лошади и крупного рогатого скота по сравнению с контролем, где эти показатели составили 28,7-43,2%.

Аналогичные изменения наблюдались по выраженности антикарнозиновой активности микроорганизмов. Интактные клоны стафилококков, эшерихий и клебсиелл обладали большей способностью к инаktivации IgA (0,3-2,51 мг/мл) по сравнению с таковой у микроорганизмов после соинкубирования с антимикробными пептидами из тромбоцитов и кровяных пластинок продуктивных животных (0,09-2,24 мг/мл).

Проведённые исследования выраженности гемолитической активности (ГА) условно-патогенных микроорганизмов на фоне обработки их тромбодифенсинами позволили выявить уменьшение рассматриваемого фактора патогенности. При изучении влияния МПК и 1/4 МПК тромбодифенсинов кур на гемолитическую активность *S. aureus* выявлено достоверное снижение выраженности признака на 88,5% по сравнению с контролем ($p < 0,001$) (рис. 4).

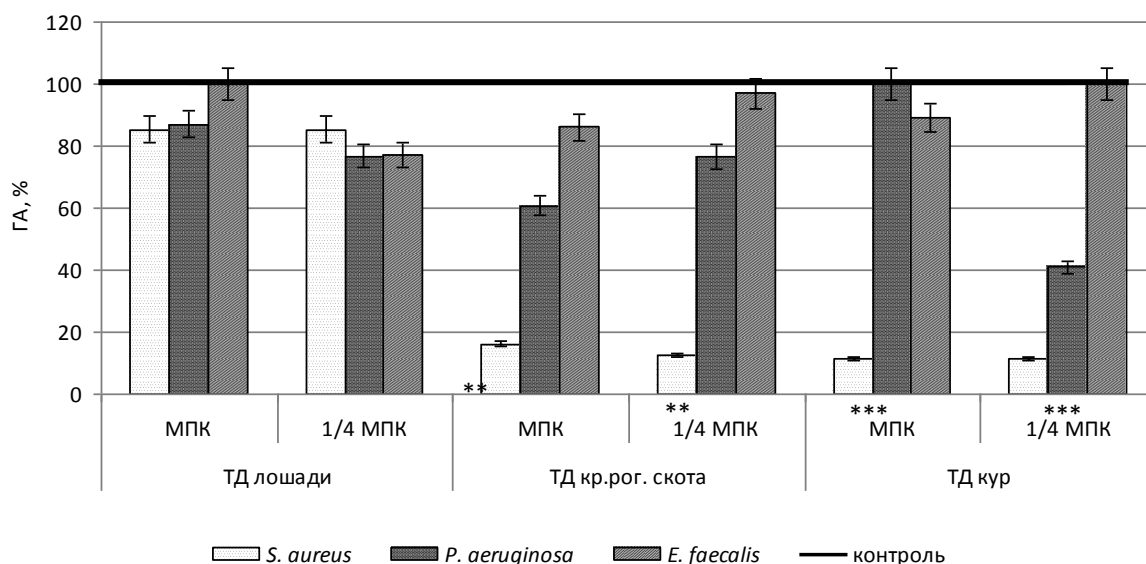


Рис. 4. Влияние тромбодифенсинов продуктивных животных на гемолитическую активность бактерий.

Обозначения: ** - достоверность различий выраженности гемолитической активности в контроле и после соинкубирования с ТД ($p < 0,01$), *** - ($p < 0,001$).

Аналогичный ингибирующий эффект данных пептидов отмечен в отношении гемолитической активности (ГА) синегнойной палочки и фекального энтерококка. Соинкубирование *S. aureus* с тромбодифенсинами крупного рогатого скота в МПК снижало ГА в среднем на 83,9% ($p < 0,01$). Изменение концентрации пептидов в сторону уменьшения до 10^{-6} МПК вызывало еще большее подавление гемолитической активности – разница с контролем в данном случае составила 87,3% ($p < 0,01$), причём в популяции *S. aureus* появлялись клоны, у которых гемолитическая активность полностью отсутствовала.

В меньшей степени кислотный экстракт из кровяных пластинок крупного рогатого скота повлиял на гемолитическую активность синегнойной палочки и фекального энтерококка. В ходе исследования отмечен дозозависимый эффект действия пептидов на указанный показатель вирулентности у данных видов бактерий. Инкубирование микроорганизмов в присутствии ТД лошади сопровождалось незначительным, по сравнению с ТД кур и крупного рогатого скота, уменьшением ГА бактерий.

В ходе исследования воздействия тромбодифенсинов на протеолитическую активность микроорганизмов было установлено, что антимикробные пептиды из тромбоцитов и кровяных пластинок всех видов сельскохозяйственных животных обладали ингибирующей активностью в отношении изучаемого признака у *C. albicans*, но оказывали преимущественно стимулирующий эффект на протеолитическую активность исследованных видов бактерий (рис. 5).

Относительно высокие показатели изучаемого вирулентного признака регистрировали при воздействии на *E. coli* кислотным экстрактом из кровяных пластинок лошади. При этом стимулирующий эффект возрастал с увеличением концентрации белка. ТД крупного рогатого скота эффективно снижали протеолитическую активность микроскопических грибов, в то же время у бактерий присутствие антимикробных пептидов из тромбоцитов и кровяных пластинок животных вызывало увеличение активности протеаз более чем на 30%.

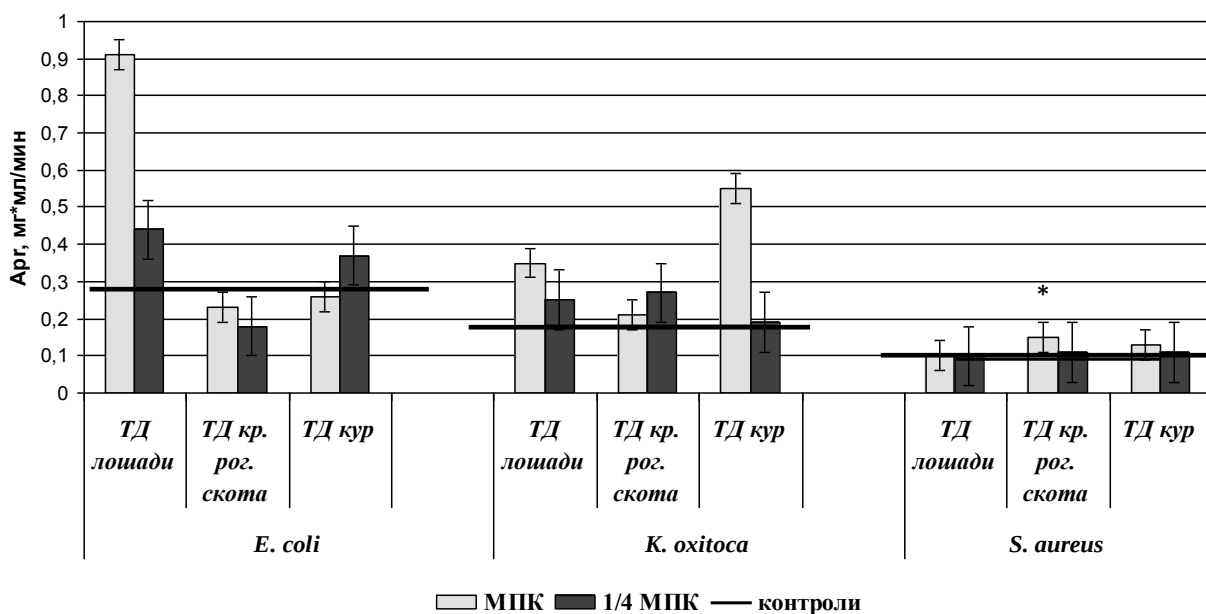


Рис. 5. Влияние тромбодифенсинов продуктивных животных на протеолитическую активность бактерий.
Обозначения: * - достоверность различий выраженности протеолитической активности в контроле и после соинкубирования с ТД – ($p < 0,05$).

Заключение

Бактерицидные факторы клеток и тканей выполняют решающую функцию в защите макроорганизма, особенно на начальных этапах развития инфекции [10]. Среди них особое место занимают низкомолекулярные белки (пептиды) с выраженными катионными свойствами, в том числе и тромбодифенсины, значение которых определяется высокой микробоцидной активностью и способностью влиять на развитие инфекционных процессов [11].

В ходе исследования выявлены особенности взаимодействия ТД животных с микроорганизмами, заключающиеся в нарушении структурной организации клеточной стенки бактерий. Отмечены пороподобные повреждения поверхности бактериальных клеток, что позволяет отнести ТД продуктивных животных к классу пороформирующих катионных антимикробных пептидов [12].

Проведённые исследования зафиксировали усиление протеолитической активности бактерий. Не исключено, что активация бактериальных протеаз связана с приспособлением микроорганизмов к условиям среды в ответ на их изменения, в частности на увеличение в среде белка альбумина.

Выявленное нами ингибирующее влияние изученных антимикробных

пептидов на гемолитическую активность микроорганизмов и факторы персистенции можно объяснить с позиции механизмов антимикробного действия тромбодифенсинов, поскольку известно, что процесс нарушения структурной целостности и образования пор при внедрении и прохождении ТД через мембрану сопровождается не только изменением осмотического барьера клеток-мишеней, но и дезорганизацией мультиферментных комплексов, встроенных в мембрану, а также приводит к подавлению дыхания, окислительного фосфорилирования, транскрипции и синтеза белков, то есть ключевых метаболических процессов микробных клеток [13].

Таким образом, полученные результаты могут служить экспериментальным обоснованием для дальнейшего изучения свойств у антимикробных пептидов из тромбоцитов и кровяных пластинок животных, обладающих не только бактерицидным действием, но и эффективно ингибирующим персистентный и вирулентный потенциал микроорганизмов, с целью их использования в клинической практике в качестве антимикробного средства.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Гриценко В.А., Иванов Ю.Б. Роль персистентных свойств микроорганизмов в патогенезе эндогенных инфекций. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2009. 4: 66-71.
2. Литвин В.Ю., Пушкарева В.Н. Факторы патогенности бактерий: функции в окружающей среде. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1994. Приложение: С. 83-87.
3. Бухарин О.В., Черешнев В.А., Сулейманов К.Г. Антимикробный белок тромбоцитов. Екатеринбург: УрО РАН, 2000. 200 с.
4. 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. 72: 248-254.
5. Бухарин О.В., Усвятцов Б.Я., Ханина Е.А. Взаимодействие бактерий и эритроцитов. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2005. 4: 89-95.
6. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии. М.: Издательский центр «Академия», 2005. 608 с.
7. Бухарин О.В., Чернова О.Л., Матюшина С.Б. Способ определения антикарнозиновой активности микроорганизмов. Патент РФ 2132879., 1999. №19.
8. Бухарин О.В., Чайникова И.Н., Валышев А.В. и др. Способ определения антииммуноглобулиновой активности микроорганизмов. Патент РФ 2236465., 2004. № 26.
9. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологии. Л.: Гос. изд. мед. лит., 1962. 177 с.
10. Кокряков В.Н. Очерки о врожденном иммунитете. СПб.: Наука, 2006. 261 с.
11. Tang Y.-Q., Yeaman M.R., Selsted M.E. Antimicrobial peptides from human platelets. Infection and Immunity. 2002. 70: 6529-6533.
12. Vasilchenko A.S., Nikiyan H.N., Deryabin D.G. Atomic force microscopy study of magainin 2 versus human platelet extract action on *Escherichia coli* and *Bacillus cereus*. Journal of Biological Research. 2013. 19: 3-9.
13. Friedrich C.L., Rozek A., Patrzykat A. et al. Structure and mechanism of action of an

indolicidin peptide derivative with improved activity against gram-positive bacteria. J. Biol. Chem. 2001. 276: 24015-24022.

Поступила 22.10.2013

(*Контактная информация:* **Сычева Мария Викторовна** – к.б.н., заведующая кафедрой микробиологии и заразных болезней ФГБОУ ВПО «Оренбургский государственный аграрный университет», 460014 г. Оренбург, ул. Челюскинцев, 18, тел./факс 8 (3532) 779328, e-mail: sycheva_maria@mail.ru)