

1  
НОМЕР

БОНЦ

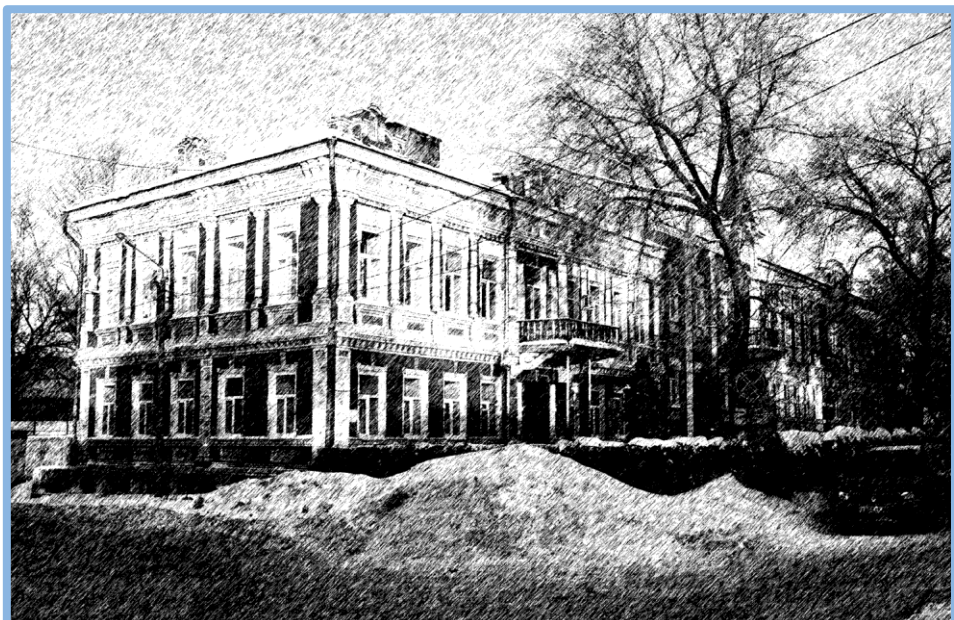
2016

ISSN 2304-9081

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

# БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН



**УЧРЕДИТЕЛИ**

УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РАН  
ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УРО РАН

© М.В. Сычева, 2016

УДК 619:579:615.33

*М.В. Сычева*

## **ВЛИЯНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ ТРОМБОЦИТОВ *GALLUS GALLUS* НА АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ**

Оренбургский государственный аграрный университет, Оренбург, Россия  
Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

*Цель.* Изучить влияние антимикробных соединений из тромбоцитов курицы домашней (*Gallus gallus*) на чувствительность микроорганизмов к антибактериальным препаратам.

*Материалы и методы.* В исследовании использовали пептиды из тромбоцитов курицы домашней, полученные методом обращённо-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии в ступенчатом и линейном градиентах увеличения концентрации органического растворителя. Влияние антимикробных пептидов (АМП) на чувствительность микроорганизмов к антибактериальным препаратам исследовали при совместном инкубировании. Антибиотикочувствительность микроорганизмов определяли диско - диффузионным методом.

*Результаты.* Показано, что АМП из тромбоцитов курицы домашней значительно увеличивают чувствительность *S. aureus* и *E. coli* к антибактериальным препаратам. Наиболее эффективно повышают антибиотикочувствительность микроорганизмов пептиды 31-й фракции.

*Заключение.* Полученные результаты открывают перспективу для использования тромбоцитарных АМП совместно с существующими антибактериальными препаратами, как часть комбинированной терапии, дающей синергетический эффект.

*Ключевые слова:* катионные антимикробные пептиды, тромбоциты, *Gallus gallus*, антибиотикочувствительность, бактерии, антибактериальные препараты.

---

---

*M.V. Sycheva*

## **THE EFFECT OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM PLATELETS OF *GALLUS GALLUS* ON ANTIBIOTIC SENSITIVITY OF MICROORGANISMS**

Orenburg State Agrarian University, Orenburg, Russia  
Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UrB RAS, Orenburg, Russia

*Objective.* To study the effect of antimicrobial compounds from platelets of domestic chicken (*Gallus gallus*) on the sensitivity of microorganisms to antibacterial preparations.

*Materials and methods.* The study used the peptides from platelets of chicken, obtained by the method of reversed-phase high-performance liquid chromatography in stepwise and linear gradients of increasing concentrations of organic solvent. The influence of antimicrobial peptides (AMP) on the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs was investigated in a joint incubation. Antibiotic sensitivity of microorganisms was determined disco-diffusion method.

*Results.* It is shown that the AMP from chicken's platelets significantly increases the sensitivity of *S. aureus* and *E. coli* to antibacterial drugs. The most effectively increase the antibiotic sensitivity of microorganisms, the peptides of the 31st fraction.

*Conclusion.* The obtained results open up prospects for the use AMP from chicken's platelets together with existing antibacterial drugs as part of combination therapy, giving

synergistic effect.

*Keywords:* cationic antimicrobial peptides, platelets, *Gallus gallus*, antibiotic sensitivity, bacteria, antibacterial drug.

## **Введение**

Использование конвенциональных антибиотиков микробного происхождения во многом решало проблему инфекционных осложнений, вызванных условно-патогенными и патогенными бактериями. Однако в последние десятилетия эффективность антимикробных препаратов существенно снизилась за счёт широкого распространения антибиотикоустойчивых популяций патогенов [1]. Анализ новых разработок в области создания антибиотиков свидетельствует о том, что исследователи ориентированы на создание более эффективных препаратов, но направленных на старые мишени: клеточную стенку и белковый синтез бактерий. По мнению А.Н. Суворова (2010), использование указанных подходов в терапии инфекций обречено на провал ещё до введения новых антибиотиков в практику [2].

В связи с этим активно обсуждается вопрос об изобретении и применении нетрадиционных стратегий для решения проблемы антибиотикорезистентности: сокращение использования антибиотиков до минимума, активное продвижение вакцинации, разработка новых классов антибактериальных препаратов [3, 4]. Одним из вариантов повышения эффективности антимикробной терапии является сочетанное использование антибиотиков и факторов естественной резистентности макроорганизма [5].

Учитывая вышеизложенное, мы попытались оценить в эксперименте влияние антимикробных соединений из тромбоцитов курицы домашней (*Gallus gallus*) на чувствительность микроорганизмов к антибактериальным препаратам.

## **Материалы и методы**

При проведении работы были использованы три гомогенные пептидные фракции (№№ 29, 30 и 31) с выраженным антимикробным действием, полученные из уксуснокислого экстракта тромбоцитов курицы домашней методом обращённо-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии в ступенчатом и линейном градиентах увеличения концентрации органического растворителя.

Изучение влияния антимикробных пептидов (АМП) на антибиотико-чувствительность микроорганизмов проводили на клонах *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, которые инкубировали в течение 1 часа при 37<sup>0</sup>С с исследуемыми АМП в минимальной подавляющей концентрации (МПК) и ¼ МПК, установленных нами ранее [6], с последующим высевом на питательный агар. Чувствительность микроорганизмов к антибактериальным препаратам (АБП) до и после соинкубирования с тромбоцитарными АМП определяли диско-диффузионным методом [7].

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

### **Результаты и обсуждение**

В результате проведённых исследований установлено, что все использованные в эксперименте тромбоцитарные фракции значительно увеличивали чувствительность *S. aureus* и *E. coli* к антимикробным средствам. После соинкубирования золотистого стафилококка с АМП фракций №№ 29, 30 и 31 в МПК и ¼ МПК зарегистрировано повышение чувствительности к ванкомицину и отсутствие изменений по сравнению с контролем, равным 13,0±0,08 мм, при соинкубировании с пептидами 30-й фракции в ¼ МПК – 13,0±0,03 мм.

Зоны задержки роста *S. aureus* к ципрофлоксацину под влиянием АМП 29, 30 и 31 фракций в обеих изученных концентрациях значительно увеличивались в сравнении с контролем, но максимально – после соинкубирования с пептидами 31 фракции.

Зоны задержки роста клонов *S. aureus* к гентамицину в контроле составляли 27,0±0,07 мм и увеличились после соинкубирования с пептидами 29-й и 31-й фракций в МПК до 28,0±0,20 мм ( $p<0,01$ ) и 29,4±0,05 мм ( $p<0,001$ ), соответственно; в ¼ МПК до 30,0±0,09 мм ( $p<0,001$ ) и 30,0±0,04 мм ( $p<0,001$ ). Антимикробные пептиды 30-й фракции в МПК уменьшали чувствительность клонов *S. aureus* к данному антибиотику, тогда как в ¼ МПК не изменяли (табл. 1).

Пептиды 30 фракции в МПК и ¼ МПК увеличивали зоны задержки роста золотистых стафилококков к тетрациклину до 22,0±0,02 мм ( $p<0,001$ ) и 22,0±0,01 мм ( $p<0,001$ ); 31-й фракции – до 23,7±0,02 мм ( $p<0,001$ ) и 23,6±0,06

мм ( $p < 0,001$ ), соответственно. Зона задержки роста *S. aureus* после соинкубирования с АМП 29-й фракции в МПК была равна  $20,0 \pm 0,23$  мм, в  $\frac{1}{4}$  МПК  $23,0 \pm 0,18$  мм ( $p < 0,001$ ).

*Таблица 1.* Влияние антимикробных пептидов из тромбоцитов курицы домашней на чувствительность *S. aureus* к антибактериальным препаратам

№ фракции	Концентрация АБП	Зона задержки роста <i>S. aureus</i> под воздействием АБП, мм ( $M \pm m$ )				
		ванкомицин	ципрофлоксацин	гентамицин	тетрациклин	линезолид
29	МПК	$14,0 \pm 0,01^{**}$	$18,0 \pm 0,14^{**}$	$28,0 \pm 0,20^*$	$20,0 \pm 0,23$	$23,0 \pm 0,01^{**}$
	$\frac{1}{4}$ МПК	$14,0 \pm 0,02^{**}$	$18,0 \pm 0,08^{**}$	$30,0 \pm 0,09^{**}$	$23,0 \pm 0,18^{**}$	$23,0 \pm 0,01^{**}$
30	МПК	$14,0 \pm 0,07^{**}$	$17,0 \pm 0,05^*$	$26,0 \pm 0,50$	$22,0 \pm 0,02^{**}$	$22,0 \pm 0,01^{**}$
	$\frac{1}{4}$ МПК	$13,0 \pm 0,03$	$18,0 \pm 0,07^{**}$	$27,0 \pm 0,10$	$22,0 \pm 0,01^{**}$	$23,0 \pm 0,18^{**}$
31	МПК	$15,5 \pm 0,05^{**}$	$20,6 \pm 0,03^{**}$	$29,4 \pm 0,05^{**}$	$23,7 \pm 0,02^{**}$	$24,0 \pm 0,19^{**}$
	$\frac{1}{4}$ МПК	$16,0 \pm 0,07^{**}$	$20,8 \pm 0,02^{**}$	$30,0 \pm 0,04^{**}$	$23,6 \pm 0,06^{**}$	$26,0 \pm 0,24^{**}$
Контроль		$13,0 \pm 0,08$	$16,0 \pm 0,12$	$27,0 \pm 0,07$	$20,4 \pm 0,02$	$20,6 \pm 0,02$

*Примечание:* \* – достоверность различий чувствительности клонов *S. aureus* к АБП в контроле и после соинкубирования с АМП из тромбоцитов *G. gallus* – ( $p < 0,01$ ); \*\* – ( $p < 0,001$ ).

Наиболее эффективно повышали чувствительность золотистых стафилококков к линезолиду пептиды 31 фракции в  $\frac{1}{4}$  МПК. Под воздействием АМП 29 фракции в МПК и  $\frac{1}{4}$  МПК зоны задержки роста *S. aureus* к тестируемому АБП увеличивались до  $23,0 \pm 0,01$  мм ( $p < 0,001$ ). После соинкубирования клонов золотистого стафилококка с пептидами 30 фракции в МПК и  $\frac{1}{4}$  МПК также выявлено статистически значимое повышение чувствительности к линезолиду ( $p < 0,001$ ).

Увеличение зон задержки роста *E. coli* к ампициллину было зарегистрировано под влиянием всех изученных пептидных фракций (табл. 2).

Максимальный эффект отмечен после соинкубирования с АМП 30 и 31 фракций в  $\frac{1}{4}$  МПК ( $p < 0,001$ ). Эти же фракции наиболее эффективно стимулировали чувствительность клонов *E. coli* к цефтриаксону – другому антибиотику, подавляющему синтез клеточной стенки бактерий.

Таблица 2. Влияние антимикробных пептидов из тромбоцитов курицы домашней на чувствительность *E. coli* к антибактериальным препаратам

№ фракции	Концентрация АБП	Зона задержки роста <i>E. coli</i> под воздействием АБП, мм (M±m)			
		ампициллин	цефтриаксон	норфлоксацин	гентамицин
29	МПК	14,0±0,05**	22,0±0,04*	30,1±0,04**	25,2±0,08**
	¼ МПК	14,0±0,11**	22,0±0,11*	31,0±0,20**	25,0±0,16**
30	МПК	13,0±0,02**	23,0±0,10**	30,3±0,03**	24,0±0,12*
	¼ МПК	16,0±0,07**	25,0±0,17**	31,0±0,14**	27,0±0,32**
31	МПК	15,0±0,13**	25,0±0,06**	35,0±0,04**	28,0±0,08**
	¼ МПК	15,8±0,04**	26,0±0,05**	36,0±0,06**	29,6±0,09**
Контроль		12,8±0,01	21,0±0,13	28,7±0,09	23,0±0,12

Примечание: \* – достоверность различий чувствительности клонов *E. coli* к АБП в контроле и после соинкубирования с АМП из тромбоцитов *G. gallus* – (p<0,01); \*\* – (p<0,001).

Под действием пептидов 29-й и 30-й фракций в МПК и ¼ МПК отмечалось увеличение зон задержки роста у клонов *E. coli* к норфлоксацину на 4,8 и 8%, соответственно (p<0,001). Максимальный эффект зарегистрирован после соинкубирования бактерий с пептидами 31 фракции в МПК и ¼ МПК: зоны задержки роста эшерихий к этому тестируемому антибактериальному препарату увеличивались до 35,0±0,04 и 36,0±0,06 мм, соответственно, против 28,7±0,09 мм в контроле (p<0,05).

Все изученные пептидные фракции значимо усиливали чувствительность *E. coli* к гентамицину.

### Заключение

Таким образом, выявлены особенности взаимодействия очищенных АМП из тромбоцитов *G. gallus* с микроорганизмами, заключающиеся в усилении чувствительности *S. aureus* и *E. coli* к АБП. Максимальное увеличение зон задержки роста отмечено как у клонов *S. aureus*, так и у клонов *E. coli* после соинкубирования с АМП 31 фракции.

Поскольку механизм биологической активности изученных АМП связан с нарушением целостности барьерных структур микробной клетки [9], уместно предположить, что увеличение проницаемости мембраны бактерий создаёт благоприятные условия для проникновения конвенциональных анти-

биотиков в бактериальную клетку, усиливая их действие [10]. Эти данные согласуются с результатами S.Y. Lee и S.J. Choe (2004), которые отмечали аналогичный синергетический бактерицидный эффект тромбоцитарных белков кровяных пластинок кролика и пенициллина в отношении *Streptococcus gordonii* и *Streptococcus rattus in vitro* [11]. Подобные результаты получены *in vivo* при совместном применении синтетических АМП и пенициллина в отношении пенициллин-резистентного *Streptococcus pneumoniae* [12].

Полученные нами результаты не только не противоречат исследованиям ряда авторов, изучавших влияние АМП на антибиотикочувствительность микроорганизмов [13, 14], но и открывают перспективу для использования тромбоцитарных АМП совместно с существующими антибактериальными препаратами в качестве комбинированной терапии, дающей синергетический эффект [15].

*(Работа выполнена при поддержке РФФИ, грант № 14-04-97067 p\_поволжье\_a)*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Kiyosuke M., Nagasawa Z., Hotta T. et al. Surveillance report of drug-resistant bacteria from 2007 to 2012 in Saga Prefecture, Japan. *Rinsho Byori*. 2014. 62: 546-551.
2. Суворов А.Н. Поиск эффективных путей решения проблемы борьбы с бактериальной инфекционной патологией. *Медицинский академический журнал*. 2010. Т. 10. 4: 267-280.
3. Lusti-Narasimhan M., Pessoa-Silva C.L., Temmerman M. Moving forward in tackling antimicrobial resistance: WHO actions. *Sex Transm. Infect.* 2013. 89: 57-59.
4. Penchovsky R., Traykovska M. Designing drugs that overcome antibacterial resistance: where do we stand and what should we do? *Expert Opin. Drug. Discov.* 2015. 10: 631-650.
5. Бухарин О.В., Васильев Н.В., Усвяцов Б.Я. Лизоцим микроорганизмов. Томск: Изд-во Томского университета, 1985. 212 с.
6. Сычева М.В., Пешкова Ю.И., Карташова О.Л. Влияние антимикробных пептидов из тромбоцитов кур на *E. coli*. *Вестник ветеринарии*. 2015. 4(75): 40-43.
7. Методические указания МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам»: (утв. гл. гос. санитар. врачом РФ 04.03.2004; введ. 04.03.2004). М.: Минздрав России, 2005. 62 с.
8. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Гос. изд-во мед. лит., 1962. 180 с.
9. Сычева М.В., Пешкова Ю.И., Васильченко А.С. и др. Изучение биологических эффектов антимикробных пептидов из тромбоцитов кур методом атомно-силовой микроскопии. *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*. 2015. 5(55): 198-200.
10. Le C.F., Yusof M.Y., Hassan H. et al. *In vitro* properties of designed antimicrobial peptides that exhibit potent antipneumococcal activity and produces synergism in combination with penicillin. *Sci. Rep.* 2015. 5. DOI: 10.1038/srep09761.
11. Lee S.Y., Choe S.J. Penicillin-induced killing and postantibiotic effect in oral streptococci are enhanced by platelet microbicidal proteins. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2004. 23: 457-461.

12. Le C.F., Yusof M.Y., Hassan M.A. et al. *In vivo* efficacy and molecular docking of designed peptide that exhibits potent antipneumococcal activity and synergises in combination with penicillin. *Sci. Rep.* 2015. 5. DOI: 10.1038/srep11886.
13. Mora-Navarro C., Caraballo-León J., Torres-Lugo M. et al. Synthetic antimicrobial  $\beta$ -peptide in dual-treatment with fluconazole or ketoconazole enhances the *in vitro* inhibition of planktonic and biofilm *Candida albicans*. *J. Pept. Sci.* 2015. 21(12): 853-861.
14. Al-Ani I., Zimmermann S., Reichling J. et al. Pharmacological synergism of bee venom and melittin with antibiotics and plant secondary metabolites against multi-drug resistant microbial pathogens. *Phytomedicine.* 2015. 22: 245-255.
15. Dosler S., Karaaslan E., Gerceker A.A. Antibacterial and anti-biofilm activities of melittin and colistin, alone and in combination with antibiotics against Gram-negative bacteria. *J. Chemother.* 2015. 24. DOI:1973947815Y0000000004.

*Поступила 12.01.2016*

(Контактная информация: **Сычева Мария Викторовна** – к.б.н., доцент, заведующая кафедрой микробиологии и заразных болезней ФГБОУ ВО Оренбургский государственный аграрный университет; Адрес: 460014 г. Оренбург, ул. Челюскинцев, 18, тел.: 8 (3532) 689713; e-mail: [sycheva\\_maria@mail.ru](mailto:sycheva_maria@mail.ru))

---

---

## LITERATURA

1. Kiyosuke M., Nagasawa Z., Hotta T. et al. Surveillance report of drug-resistant bacteria from 2007 to 2012 in Saga Prefecture, Japan. *Rinsho Byori.* 2014. 62: 546-551.
2. Suvorov A.N. Poisk jeffektivnyh putej reshenija problemy bor'by s bakterial'noj infekcionnoj patologiej. *Medicinskij akademicheskij zhurnal.* 2010. T. 10. 4: 267-280.
3. Lusti-Narasimhan M., Pessoa-Silva C.L., Temmerman M. Moving forward in tackling antimicrobial resistance: WHO actions. *Sex Transm. Infect.* 2013. 89: 57-59.
4. Penchovsky R., Traykovska M. Designing drugs that overcome antibacterial resistance: where do we stand and what should we do? *Expert Opin. Drug. Discov.* 2015. 10: 631-650.
5. Buharin O.V., Vasil'ev N.V., Usvjacov B.Ja. *Lizocim mikroorganizmov.* Tomsk: Izd-vo Tomskogo universiteta, 1985. 212 s.
6. Sycheva M.V., Peshkova Ju.I., Kartashova O.L. Vlijanie antimikrobnih peptidov iz trombocitov kur na *E. coli*. *Vestnik veterinarii.* 2015. 4(75): 40-43.
7. Metodicheskie ukazaniya MUK 4.2.1890-04 «Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam»: (utv. gl. gos. sanitar. vrachom RF 04.03.2004: vved. 04.03.2004). M.: Minzdrav Rossii, 2005. 62 s.
8. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. *Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovanijah.* L.: Gos. izd-vo med. lit., 1962. 180 s.
9. Sycheva M.V., Peshkova Ju.I., Vasil'chenko A.S. i dr. Izuchenie biologicheskikh jeffektov antimikrobnih peptidov iz trombocitov kur metodom atomno-silovoj mikrosko-pii. *Izvestija Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta.* 2015. 5(55): 198-200.
10. Le C.F., Yusof M.Y., Hassan H. et al. *In vitro* properties of designed antimicrobial peptides that exhibit potent antipneumococcal activity and produces synergism in combination with penicillin. *Sci. Rep.* 2015. 5. DOI: 10.1038/srep09761.
11. Lee S.Y., Choe S.J. Penicillin-induced killing and postantibiotic effect in oral streptococci are enhanced by platelet microbicidal proteins. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2004. 23: 457-461.
12. Le C.F., Yusof M.Y., Hassan M.A. et al. *In vivo* efficacy and molecular docking of designed peptide that exhibits potent antipneumococcal activity and synergises in combination with penicillin. *Sci. Rep.* 2015. 5. DOI: 10.1038/srep11886.
13. Mora-Navarro C., Caraballo-León J., Torres-Lugo M. et al. Synthetic antimicrobial  $\beta$ -



- peptide in dual-treatment with fluconazole or ketoconazole enhances the in vitro inhibition of planktonic and biofilm *Candida albicans*. *J. Pept. Sci.* 2015. 21(12): 853-861.
14. Al-Ani I., Zimmermann S., Reichling J. et al. Pharmacological synergism of bee venom and melittin with antibiotics and plant secondary metabolites against multi-drug resistant microbial pathogens. *Phytomedicine*. 2015. 22: 245-255.
  15. Dosler S., Karaaslan E., Gerceker A.A. Antibacterial and anti-biofilm activities of melittin and colistin, alone and in combination with antibiotics against Gram-negative bacteria. *J. Chemother.* 2015. 24. DOI:1973947815Y0000000004.

**Образец ссылки на статью:**

Сычева М.В. Влияние антимикробных пептидов из тромбоцитов *Gallus gallus* на антибиотикочувствительность микроорганизмов. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2016. 1: 1-8 [Электронный ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-4/Articles/SMV-2016-1.pdf>).