

М.В.Сычева^{1,2}, Ю.И.Пешкова², О.Л.Карташова^{1,2}, А.В.Андреева³

РЕГУЛЯЦИЯ АНТИМИКРОБНЫМИ ПЕПТИДАМИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТАГОНИСТИЧЕСКИ АКТИВНЫМ ПРЕДСТАВИТЕЛЯМ МУТУАЛИСТИЧЕСКОЙ МИКРОФЛОРЫ

¹Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург; ²Оренбургский государственный аграрный университет; ³Башкирский государственный аграрный университет, Уфа

Цель. Изучение влияния антимикробных пептидов (АМП) на чувствительность условно патогенных микроорганизмов к действию антагонистически активных представителей мутуалистической микрофлоры. *Материалы и методы.* В исследовании использовали пептиды из тромбоцитов кур, полученные методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии в ступенчатом и линейном градиентах увеличения концентрации органического растворителя. Влияние АМП на чувствительность микроорганизмов к антагонистически активным веществам доминантных бактерий рода *Lactobacillus* и *Enterococcus* исследовали при совместном инкубировании. Антагонистическую активность бактерий изучали чашечным методом. *Результаты.* Показано усиление экспрессии антагонистической активности индигенной микрофлоры в отношении ассоциативной микрофлоры после ее соинкубирования с пептидными фракциями из тромбоцитов кур. *Заключение.* Полученные результаты позволяют предположить существование новых механизмов формирования колонизационной резистентности биотопа.

Журн. микробиол., 2017, № 6, С. 21—25

Ключевые слова: антимикробные пептиды, тромбоциты кур, антагонизм, колонизационная резистентность

M.V.Sycheva^{1,2}, Yu.I.Peshkova², O.L.Kartashova^{1,2}, A.V.Andreeva³

REGULATION OF MICROORGANISMS SENSITIVITY TO ANTAGONISTIC ACTIVE REPRESENTATIVES OF MUTUALISTICALLY MICROFLORA BY THE ANTIMICROBIAL PEPTIDES

¹Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg; ²Orenburg State Agrarian University; ³Bashkir State Agrarian University, Ufa, Russia

Aim. Study of the effect of antimicrobial peptides (AMP) on the sensitivity of the conditional pathogenic of bacteria to the action of antagonistic active of representatives mutualistically microflora. *Materials and methods.* The study used 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 effect of AMP on the sensitivity of microorganisms to antagonistic active substances of the dominant bacteria of the genus *Lactobacillus*, and *Enterococcus* were investigated in a joint incubation. Antagonistic activity of bacteria studied the gup method. *Results.* Shown an increased expression of antagonistic activity of indigenous microflora in relation to associative microflora after concubinage with a peptide fractions from platelets of chicken. *Conclusion.* The obtained results allow to assume the existence of new mechanisms of formation of the colonization resistance of the biotope.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 6, P. 21—25

Key words: antimicrobial peptides, platelets of chicken, antagonism, colonization resistance

ВВЕДЕНИЕ

Живущие на планете организмы никогда не развивались в условиях бактериальной стерильности, поэтому функционирование практически всех органов и систем человека и животных неразрывно связано с микроорганизмами [1]. Представители индигенной микрофлоры, колонизируя определенные биотопы, вступают в тесные взаимоотношения с макроорганизмом и играют важную роль в поддержании состояния его здоровья, регулируя численность микробиоты, в том числе, с помощью антагонистической активности.

Из данных литературы известно, что антагонистическая активность микроорганизмов может модифицироваться под воздействием факторов различной природы [5, 12, 14]. Уместно предположить существование механизмов, способных регулировать чувствительность условно патогенных микроорганизмов к антагонистически активным веществам мутуалистической микрофлоры. К числу таких механизмов могут относиться и факторы врожденного иммунитета, например, антимикробные пептиды (АМП) — многофункциональные эффекторные молекулы, обеспечивающие первую линию защиты от патогенов.

Выяснение этого предположения и определило цель нашей работы — изучить влияние АМП на чувствительность условно патогенных микроорганизмов к действию антагонистически активных представителей мутуалистической микрофлоры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований явились три гомогенные пептидные фракции с выраженным антимикробным действием, полученные из уксуснокислого экстракта тромбоцитов курицы домашней методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии в ступенчатом и линейном градиентах увеличения концентрации органического растворителя. Перед постановкой опыта антимикробные пептиды ресуспендировали в растворе 0,01% уксусной кислоты, содержащем 0,2% бычьего сывороточного альбумина (Sigma, Германия).

В работе использовали штаммы-антагонисты из числа доминантных представителей микрофлоры — *Lactobacillus* spp. и *Enterococcus faecium* [6], выделенные из кишечного биотопа. В качестве индикаторных культур использовали вирулентные штаммы *Staphylococcus aureus* [3] и *Enterococcus faecalis*, изолированные от больных с инфекционно-воспалительными заболеваниями. Культуры энтерококков и стафилококков идентифицировали с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием известных праймеров [8, 9]. Идентификацию лактобацилл проводили общепринятыми методами по Берджи.

Для определения влияния АМП из тромбоцитов курицы домашней на чувствительность индикаторных культур к антагонистически активным веществам представителей мутуалистической микрофлоры клоны *S. aureus* и *E. faecalis* соинкубировали с пептидными фракциями в минимальной подавляющей концентрации (МПК) и $1/4$ МПК, установленных нами ранее [2], в Мюллер-Хинтон бульоне (HiMedia, Индия) в течение 1 часа при 37°C с последующим высевом на Мюллер-Хинтон агар (HiMedia, Индия). В качестве контроля использовали те же культуры микроорганизмов, которые инкубировали в Мюллер-Хинтон бульоне, содержащем 0,2% бычьего сывороточного альбумина с добавлением раствора 0,01% уксусной кислоты.

Антагонистическую активность бактерий изучали чашечным методом (принцип отсроченного антагонизма) [4]. Диаметр зон задержки роста чувствительных культур и диаметр зон роста штаммов-продуцентов измеряли при помощи штангенциркуля. Коэффициент антагонистической активности вычисляли как отношение диаметра зоны задержки роста условно патогенного микроорганизма к диаметру зоны роста штамма-продуцента.

Эксперименты проводились в трех сериях при трехкратном воспроизведении. Результаты обработали с использованием критерия Стьюдента и представили в виде средней арифметической и ее ошибки ($X \pm Sx$). В качестве минимально допустимого использовали уровень значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении чувствительности индикаторных культур к факторам межмикробного взаимодействия доминантных *E. faecium* и *Lactobacillus* spp. установлено выраженное однонаправленное стимулирующее влияние тромбоцитарных АМП на рассматриваемый признак.

Максимальное увеличение чувствительности клонов золотистого стафилококка к антагонистически активным бактериям рода *Lactobacillus* зарегистрировано после предварительного соинкубирования с АМП первой и третьей фракции в $1/4$ МПК (рис. 1).

При этом коэффициент антагонистической активности лактобацилл значительно увеличивался в 2,2 ($p < 0,01$) и 2,3 раза ($p < 0,001$) соответственно. В меньшей степени повышалась чувствительность *S. aureus* к антагонистически активным веществам под действием АМП третьей фракции в МПК — до $12,4 \pm 0,52$ ($p < 0,01$). Пептиды первой фракции в МПК и второй в $1/4$ МПК увеличивали коэффициент антагонистической активности лактобацилл в среднем в 1,8 раза до $10,9 \pm 0,79$ и $10,6 \pm 0,45$ ($p < 0,05$) соответственно. Умеренное увеличение чувствительности клонов *S. aureus* к антагонистически активным веществам *Lactobacillus* spp. зарегистрировано после соинкубирования с пептидами второй фракции в МПК ($9,2 \pm 0,24$ против $6,2 \pm 1,00$ в контроле, $p < 0,05$).

Аналогичные результаты были получены при исследовании антагонистической активности *E. faecium* в отношении клонов *E. faecalis* после предварительного соинкубирования последних с антимикробными пептидами из тромбоцитов курицы домашней. Максимальный стимулирующий эффект в отношении чувствительности клонов фекального энтерококка к антагонистически активным веществам *E. faecium* был выявлен у АМП третьей фракции в МПК и первой в $1/4$ МПК: коэффициент антагонистической активности значительно увеличивался до $4,3 \pm 0,64$ ($p < 0,05$) и $4,0 \pm 0,12$ ($p < 0,001$) соответственно против $0,99 \pm 0,350$ в контроле.

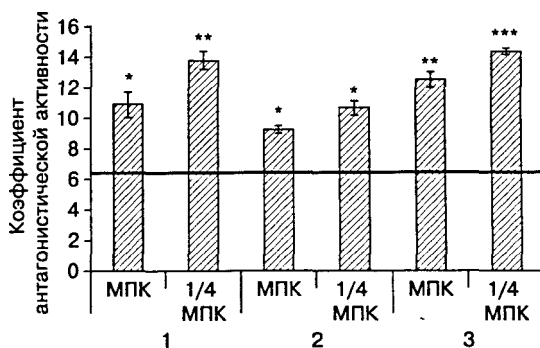


Рис. 1. Влияние АМП из тромбоцитов кур на чувствительность клонов *S. aureus* к антагонистически активным веществам лактобацилл.

Примечание. * Достоверность различий выраженности коэффициента антагонистической активности *Lactobacillus* spp. в отношении клонов *S. aureus* в контроле и после соинкубирования с АМП из тромбоцитов кур ($p < 0,05$); ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; горизонтальная черта — контроль; 1, 2, 3 — пептидные фракции.

Высокий стимулирующий потенциал выявлен у антимикробных пептидов первой ($p < 0,01$) и третьей фракции в МПК.

В меньшей степени стимулирующая способность была выражена у пептидов второй фракции в МПК и $1/4$ МПК: значение коэффициента антагонистической активности увеличивалось до $2,7 \pm 0,70$ и $3,0 \pm 0,40$ ($p < 0,05$) соответственно (рис. 2).

Таким образом, в результате проведенных исследований выявлена способность антимикробных пептидов из тромбоцитов курицы домашней повышать чувствительность условно патогенных микроорганизмов к антагонистически активным представителям мутуалистической микрофлоры кишечника. Максимальный стимулирующий эффект оказали антимикробные пептиды первой и третьей фракций в $1/4$ МПК.

Мы полагаем, что обладая способностью усиливать чувствительность условно патогенных бактерий к антагонистическому действию представителей индигенной микрофлоры кишечника, АМП могут вносить определенный вклад в формирование колонизационной резистентности биотопа, препятствуя развитию дисбиотических и инфекционных состояний.

В качестве иллюстрации этой гипотезы следует рассматривать результаты экспериментальных работ, направленных на изучение гомеостазирующей роли АМП в кишечном биотопе [7, 13]. Доказано, что антимикробные пептиды могут регулировать работу и видовой состав полезных симбиотических микроорганизмов у многоклеточных видов [10]. Результаты работы N.H. Salzman свидетельствуют о том, что α -дефенсины млекопитающих, конститутивно синтезируемые клетками Панета слизистой оболочки кишечника, играют важную роль в функционировании микробиома животных [11].

Вышеизложенное подтверждает тот факт, что функциональная активность АМП не ограничивается антимикробным действием, а включает регуляцию широкого спектра биологических свойств микроорганизмов, тем самым обеспечивая колонизационную резистентность биотопа.

Прикладной аспект проведенных исследований заключается в возможности разработки на основе АМП, выделенных из тромбоцитов курицы домашней, нового перспективного класса антимикробных препаратов, которые могут быть в будущем использованы для терапии инфекционно-воспалительных заболеваний и коррекции дисбиозов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алехина Г.Г., Суворов А.Н. Пробиотики — новый подход к старым проблемам. Успехи современного естествознания. 2007, 6: 36-39.
2. Сычева М.В., Васильченко А.С., Рогожин Е.А., Пашкова Т.М., Попова Л.П., Карташова О.Л. Биологическая активность антимикробных пептидов из тромбоцитов кур. Журн. микробиол. 2016, 2: 24-30.
3. Карташова О.Л., Уткина Т.М., Попова Л.П. Штамм бактерий *Staphylococcus aureus*,

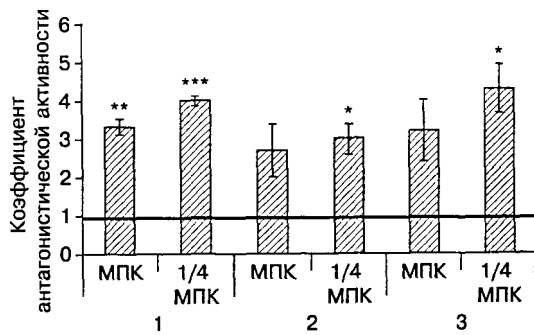


Рис. 2. Влияние АМП из тромбоцитов кур на чувствительность клонов *E. faecalis* к антагонистически активным веществам *E. faecium*.

Примечание. * Достоверность различий выраженности коэффициента антагонистической активности *E. faecium* в отношении клонов *E. faecalis* в контроле и после соинкубирования с АМП из тромбоцитов кур ($p < 0,05$); ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; горизонтальная черта — контроль; 1, 2, 3 — пептидные фракции.

используемый в качестве тест-культуры для отбора бактериальных средств. Патент РФ № 2568058. Бюл. № 8 от 20.03.2015 г.

4. Кудлай Д.Г., Лиходед В.Г. Бактериоциногенез. М.: Медицина, 1966.
5. Семенов А.В., Сгибнев А.В., Черкасов С.В., Бухарин О.В. Микробная регуляция антагонистической активности бактерий. БЭБИМ. 2007, 144 (11): 545-548.
6. Сычева М.В., Карташова О.Л., Щепитова Н.Е. Штамм бактерий *Enterococcus faecium*, обладающий антагонистической активностью в отношении бактерий рода *Listeria* и вида *Enterococcus faecalis*. Патент РФ № 2571852. Бюл. № 35 от 20.12.2015 г.
7. Giorgetti G., Brandimarte G., Fabiocchi F. et al. Interactions between innate immunity, microbiota, and probiotics. J. Immunol. Res. 2015. DOI: 10.1155/2015/501361.
8. Jackson C.R., Fedorka-Cray P.J., Barrett J.B. Use of a genus- and species- specific multiplex PCR for identification of enterococci. J. Clinical Microbiology. 2004, 42(8): 3558-3565.
9. Morot-Bizot S.C., Talon R., Leroy S. Development of a multiplex PCR for the identification of *Staphylococcus* genus and four staphylococcal species isolated from food. J. Appl. Microbiol. 2004, 97(5): 1087-1094.
10. Maróti G., Kereszt A., Kondorosi E. et al. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. Res. Microbiol. 2011, 162 (4): 363-374.
11. Salzman N.H. Paneth cell defensins and the regulation of the microbiome: détente at mucosal surfaces. Gut Microbes. 2010, 1(6): 401-406.
12. Shapiro J.A. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. Annu. Rev. Microbiol. 1998, 52: 81-104.
13. Wang S., Thacker P.A., Watford M. et al. Functions of antimicrobial peptides in gut homeostasis. Curr. Protein Pept. Sci. 2015, 16 (7): 582-591.
14. Yan L., Boyd K.G., Adams D.R. et al. Biofilm-specific cross-species induction of antimicrobial compounds in bacilli. Appl. Environmental Microbiol. 2003, 69: 3719-3727.

Поступила 10.05.17

Контактная информация: Сычева Мария Викторовна, д.б.н., 460014, Оренбург, ул. Челюскинцев, 18, р.т. (3532) 68-97-13

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

А.А.Асратян^{1,2}, Е.Г.Симонова^{2,4}, С.М.Казарян^{1,2}, О.А.Орлова³,
К.В.Ильенкина², С.Р.Раичич⁴, Н.Б.Сипачева¹, Н.В.Каражас¹

ЭПШТЕЙНА-БАРР ВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ: СОВРЕМЕННАЯ СИТУАЦИЯ И КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ У ЖЕНЩИН ДЕТОРОДНОГО ВОЗРАСТА И НОВОРОЖДЕННЫХ

¹Федеральный НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи, Москва; ²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова; ³Городская клиническая больница № 8, Челябинск; ⁴Центральный НИИ эпидемиологии, Москва

Цель. Изучение современных проявлений манифестного и скрыто протекающего эпидемического процесса Эпштейна-Барр инфекции, а также выявлении ее особенностей среди женщин детородного возраста и новорожденных. *Материалы и методы.* Проведен эпидемиологический анализ заболеваемости инфекционным мононуклеозом и ВИЧ-инфекцией в Российской Федерации. Изучены тенденции динамики заболеваемости, ее распределение по территориям и возрастным группам. На неблагоприятной территории проведено изучение частоты выявления маркеров инфицирования у женщин фертильного возраста, в т.ч. ВИЧ-инфицированных беременных, а также новорожденных. *Результаты.* Установлено, что несмотря на сложности диагностики, заболеваемость инфекционным мононуклеозом следует рассматривать как индикатор манифестно протекающего эпидемического процесса Эпштейна-Барр инфекции. У беременных ВИЧ-инфицированных женщин, в отличие от здоровых беременных, маркеры острой инфекции, протекавшей без клинических проявлений, наблюдались достоверно чаще. Максимальная интенсивность активно протекающего эпидемического процесса выявлена среди беременных 15