

М.В.Сычева^{1,4}, *А.С.Васильченко*^{1,3}, *Е.А.Рогожин*²,
*Т.М.Пашкова*¹, *Л.П.Попова*¹, *О.Л.Карташова*¹

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ ТРОМБОЦИТОВ КУР

¹Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург; ²Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова, Москва; ³Оренбургский государственный университет; ⁴Оренбургский государственный аграрный университет

Цель. Выделение и изучение биологической активности антимикробных пептидов из тромбоцитов кур. *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. Их антимикробную активность определяли методом микротитрования в бульоне; механизм биологического действия — с помощью метода флуоресцентной спектроскопии с использованием ДНК-тропных красителей. *Результаты.* Из тромбоцитов кур выделены индивидуальные фракции пептидов, обладающие антимикробной активностью в отношении *Staphylococcus aureus* P209 и *Escherichia coli* K12. Установлено нарушение целостности барьерных структур микроорганизмов под воздействием тромбоцитарных антимикробных пептидов и преобладание клеток с поврежденной мембраной в популяции *E.coli*. *Заключение.* Полученные данные об антимикробной активности и механизме бактерицидного действия впервые выделенных фракций пептидов из тромбоцитов кур расширяют представление о функциональных свойствах тромбоцитов птиц и открывают перспективу для их дальнейшего изучения с целью использования в качестве антимикробного средства.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 24—29

Ключевые слова: антимикробные пептиды, тромбоциты, тромбоцитарный катионный белок, флуоресцентная спектроскопия, *Staphylococcus aureus* P209, *Escherichia coli* K12

M.V.Sycheva^{1,4}, *A.S.Vasilchenko*^{1,3}, *E.A.Rogozhin*²,
*T.M.Pashkova*¹, *L.P.Popova*¹, *O.L.Kartashova*¹

BIOLOGICAL ACTIVITY OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM CHICKENS THROMBOCYTES

¹Research Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg; ²Shemyakin and Ovchinnikov Research Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow; ³Orenburg State University; ⁴Orenburg State Agrarian University, Russia

Aim. Isolation and study of biological activity of antimicrobial peptides from chickens thrombocytes. *Materials and methods.* Peptides from chickens thrombocytes, obtained by reverse-phase high-performance liquid chromatography method with stepped and linear gradients of concentration increase of the organic solvent were used in the study. Their antimicrobial activity was determined by microtitration method in broth; mechanism of biological effect — by using fluorescent spectroscopy method with DNA-tropic dyes. *Results.* Individual fractions of peptides were isolated from chickens thrombocytes, that possess antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* P209 and *Escherichia coli* K12. A disruption of integrity of barrier structures of microorganisms under the effect of thrombocyte antimicrobial peptides and predominance of cells with damaged membrane in the population of *E. coli* was established. *Conclusion.* The data obtained on antimicrobial activity and mechanism of bactericidal effect of the peptide fractions from chickens thrombocytes isolated for the first time expand the understanding of functional properties of chickens thrombocytes and open a perspective for their further study with the aim of use as antimicrobial means.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 2, P. 24—29

Key words: antimicrobial peptides, thrombocytes, thrombocyte cationic protein, fluorescent spectroscopy, *Staphylococcus aureus* P209, *Escherichia coli* K12

ВВЕДЕНИЕ

С момента начала эпохи антибиотиков [6] и до настоящего времени одной из первостепенных проблем в терапии инфекционных болезней является появление новых форм микроорганизмов, устойчивых к конвенциональным антибиотикам [1, 3]. В этой связи возникает необходимость поиска новых антимикробных веществ и разработки на их основе препаратов, эффективных в отношении резистентных патогенов. Многие исследования [7, 13] позволяют выделить среди различных природных соединений группу веществ пептидной природы с выраженными антимикробными свойствами. Антимикробные пептиды (АМП) представляют собой низкомолекулярные (менее 10 кДа) преимущественно положительно заряженные (как правило, от +2 до +9) молекулы, синтезируемые широким кругом организмов: от прокариот до высших позвоночных животных [4]. Являясь фактором системы врожденного иммунитета макроорганизма, АМП реализуют свою биологическую функцию, обеспечивая неспецифическую защиту от микробной инвазии. Так, катионные антимикробные пептиды, выделенные из нейтрофилов и тканей эпителиального происхождения (дефензины, протегрины, кателицидины и т. д.), обладают широким спектром действия, оказывая антибактериальное, противовирусное, антипротозойное и антигрибковое действия [9]. Также установлено, что АМП стимулируют продукцию цитокинов, миграцию и пролиферацию клеток [15], модулируют гуморальный иммунный ответ и повышают титр антител после вакцинации [18].

Исследования, посвященные выделению и характеристике АМП животного происхождения, выявили, что клетки крови, в частности тромбоциты, являются источником различных катионных пептидов, обладающих выраженной биологической активностью [17]. Однако основной имеющийся пул данных по этому вопросу посвящен описанию структуры и функции тромбоцитарных антимикробных пептидов (ТАМП) человека [5, 11, 16], в то время как исследования структурно-функциональных свойств ТАМП животных единичны [8].

В этой связи выделение и исследование структурно-функциональных свойств ТАМП сельскохозяйственных животных является актуальным как с точки зрения фундаментальных знаний о межвидовых особенностях биосинтеза тромбоцитарных АМП, так и с точки зрения использования тромбоцитов и кровяных пластинок продуктивных животных в качестве источника антимикробных веществ для создания новых противоинфекционных препаратов.

Цель работы — выделение и изучение биологической активности антимикробных пептидов из тромбоцитов кур.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Тромбоциты получали из цитратной крови клинически здоровых кур-несушек. Обогащенную тромбоцитами плазму отделяли центрифугированием при 250 g в течение 30 минут. Супернатант снова центрифугировали при 1000 g 30 минут. Осажденные тромбоциты отмывали трижды средой 199 (с добавлением 3,8% цитрата натрия в соотношении 1:10). Тромбоцитарную массу ресуспендировали в уксусной кислоте в соотношении 1:10 и выдерживали при -15°C в течение 24 часов. После дефростации полученный экстракт центрифугировали при 1000 g в течение 40 минут. Полученный супернатант использовали для дальнейшего выделения соединений, обладающих антимикробной активностью, методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) в ступенчатом и линейном градиентах увеличения концентрации органического растворителя (ацетонитрил).

На первой стадии была проведена пробоподготовка, включающая в себя высаливание из раствора тотальной белково-пептидной фракции охлажденным ацетоном в соотношении 1:7 (объем/объем) в течение 12 часов при 4°C. На следующий день после центрифугирования (6000 g, 5 мин, 4°C) осадок высушивали на воздухе при периодическом измельчении. Затем полученный ацетоновый осадок перерастворяли в 0,1% трифторуксусной кислоте (ТФУ) и обессоливали методом ОФ-ВЭЖХ на колонке-картридже Aquapore C8 (Applied Biosystems, США), уравновешенную в том же растворителе. После выхода с колонки всех несвязавшихся компонентов элюирование сорбировавшейся фракции осуществляли ступенчатым градиентом (75%) концентрации 80% ацетонитрила в 0,1% ТФУ. Детектирование поглощения вели при длине волны 214 нм. В дальнейшем после упаривания органического растворителя на вакуумной центрифуге (Labconco, США) обессоленный экстракт разделяли методом аналитической ОФ-ВЭЖХ в линейном градиенте увеличения концентрации 80% ацетонитрила в 0,1% ТФУ на колонке Luna C18 4,6x250 мм (Phenomenex, США) с детектированием поглощения при длине волны 214 нм. Собранные фракции лиофилизовали с целью удаления органического растворителя и остаточного количества ТФУ.

Молекулярные массы пептидов измеряли на MALDI времяпролетном масс-спектрофотометре Ultraflex (Bruker Daltonics, Германия), оснащенный УФ-лазером с длиной волны 337 нм в линейном режиме. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксibenзойную кислоту. На мишени смешивали равные объемы (по 0,7 мкл) образцов и матрицы (15 мг матрицы/мл в 80% CH₃CN, 0,1% ТФУ в воде MQ). Для анализа смесь наносили автоматическим дозатором капельным методом на стальную пластинку-мишень и высушивали на воздухе. Масс-спектры анализировали с помощью программы Bruker DataAnalysis for TOF. Ошибка измерения составляла 0,015%.

Антимикробную активность полученных пептидов определяли методом микротитрования в бульоне [14] по отношению к тест-культурам *Staphylococcus aureus* P209 и *Escherichia coli* K12 с последующим их высевом после соинкубирования в течение двух часов на плотную питательную среду (агар Мюллера-Хинтона). За минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) принимали концентрацию пептидов, вызывающую гибель тест-культур.

Для флуоресцентной окраски бактериальных клеток после соинкубирования с антимикробными пептидами из тромбоцитов кур в МБК в течение 1 ч использовали коммерческий набор LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, США). Согласно рекомендациям производителя бактериальные клетки осаждали при 5000 g в течение 5 мин; полученный осадок ресуспендировали в 1 мл дистиллированной воды, после чего доводили оптическую плотность *S. aureus* P209 до 0,1 (OD₆₇₀) и *E. coli* K12 до 0,05 (OD₆₇₀).

Измерение спектров флуоресцентной эмиссии (возбуждение 470 нм, эмиссия 490 — 700 нм) осуществляли на спектрометре Солар СМ 2203 (Республика Беларусь).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате фракционирования уксуснокислого экстракта тромбоцитов кур в гомогенном виде было получено 13 фракций с наиболее высоким поглощением при длине волны 214 нм, которые были протестированы на наличие антимикробной активности в системе *in vitro*. При этом у 8 пептидных фракций с массами в диапазоне от 3,0 до 5,2 кДа зафиксирована выраженная антимикробная активность в отношении *S. aureus* P209 и *E. coli* K12, их минимальные бактерицидные концентрации составляли от 20 до 200 мкг/мл. Фракции №№ 4, 5 и 6 антимикробной активностью не обладали.

В сравнительном аспекте наиболее выраженным антимикробным действием

в отношении *S. aureus* P209 обладали 9, 10 и 13 фракции: двухчасовая инкубация указанных соединений с тест-культурой задерживала рост 99,5; 97,3 и 99% колоний, соответственно. Наиболее активными в отношении *E. coli* K12 оказались пептидные соединения 1 и 10 фракций, снижающие число жизнеспособных клеток в среднем на 95,5% по сравнению с контролем.

Для проведения исследований по изучению механизма биологической активности ТАМП кур в препаративном количестве был получен тотальный обессоленный пептидный экстракт, характеризующий синергидное антимикробное действие тромбоцитарных катионных пептидов, и оценены эффекты его воздействия на *S. aureus* P209 и *E. coli* K12.

Полученные результаты показали, что препарат ТАМП обладает выраженным антимикробным эффектом в отношении тест-культур: через два часа соинкубирования антимикробные пептиды подавляли рост изучаемых бактерий в среднем на 97%.

При этом после соинкубирования ТАМП с *S. aureus* P209 число выросших колоний составило 1800 против $3,7 \times 10^4$ КОЕ/мл в контроле, с *E. coli* K12 — 7400 КОЕ/мл против $1,2 \times 10^6$ КОЕ/мл в контроле.

На следующем этапе работы с помощью метода флуоресцентной спектроскопии был изучен механизм бактерицидного действия ТАМП кур в отношении *S. aureus* P209 и *E. coli* K12.

Использование коммерческого набора для витальной окраски позволило детектировать увеличение проницаемости клеточных мембран микроорганизмов в условиях эксперимента. Внесение в реакционную смесь препарата ТАМП вело к нарушению проницаемости клеточных структур и утрате жизнеспособности значительной части клеточной популяции *E. coli* K12, о чем свидетельствовало существенное увеличение интенсивности флуоресценции в красной области спектра с максимумом при 630 нм, соответствующим эмиссии красителя пропидия иодида, проникающего только через поврежденные клеточные барьерные структуры (рис. 1). В то же время, взаимодействие антимикробных пептидов с *S. aureus* P209 приводило к утрате жизнеспособности лишь некоторой части популяции стафилококка, что фиксировалось как незначительное увеличение интенсивности флуоресценции в красной области спектра (рис. 2).

Таким образом, из тромбоцитов кур выделены индивидуальные фракции пептидов, обладающие антимикробной активностью в отношении *S. aureus* P209 и *E. coli* K12. Изучение особенностей биологического действия ТАМП зафиксировало нарушение целостности барьерных клеточных структур микроорганизмов,

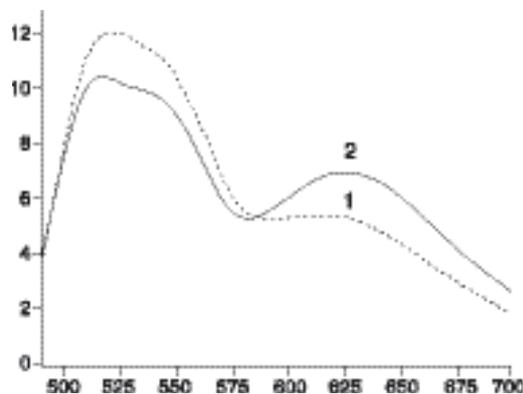


Рис. 1. Спектры флуоресценции бактериальной популяции *E. coli* K12.

Здесь и на рис. 2: 1 — контроль; 2 — опыт; по оси ординат — интенсивность флуоресценции (отн. ед.), по оси абсцисс — длина волны эмиссии флуоресценции (нм).

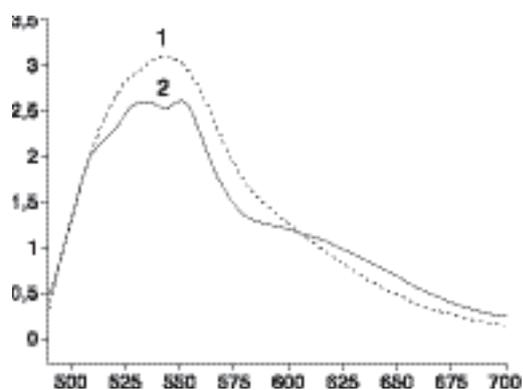


Рис. 2. Спектры флуоресценции бактериальной популяции *S. aureus* P209.

при этом доля бактериальных клеток с поврежденной мембраной преобладала в популяции *E. coli* K12.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее с помощью метода атомно-силовой микроскопии было охарактеризовано биологическое действие кислотных экстрактов из тромбоцитов и кровяных пластинок разных видов сельскохозяйственных животных [12]. При этом было зафиксировано нарушение морфологии грамположительных и грамотрицательных бактериальных клеток при воздействии уксуснокислых экстрактов из тромбоцитов кур. Характер выявленных повреждений позволил предположить наличие в тромбоцитах соединений полипептидной природы, обладающих выраженной антимикробной активностью.

Продолжение работы в этом направлении было связано с очисткой уксуснокислого белково-пептидного экстракта от различных примесей методами жидкостной хроматографии высокого давления. В процессе разделения был получен ряд индивидуальных фракций, восемь из которых продемонстрировали антимикробную активность в отношении использованных тест-культур.

Полученные данные об антимикробных свойствах тромбоцитарных пептидов кур согласуются с исследованиями ряда авторов, указывающих на широкий спектр антимикробного действия катионных пептидов из кровяных пластинок человека и животных [2, 10], и в то же время, являются новыми, впервые описывающими функциональные свойства тромбоцитов птиц.

Изучение особенностей бактерицидного действия тромбоцитарных пептидов кур с помощью метода флуоресцентной спектроскопии позволило, с одной стороны, определить жизнеспособность бактерий при опытном воздействии, с другой — при наличии мембраноповреждающего действия ТАМП зафиксировать это экспериментально.

Основываясь на полученных результатах, можно предположить, что механизм бактерицидного действия реализуется следующим образом: после первичного контакта ТАМП с клеточной стенкой *S. aureus* P209 молекулы пептидов переносятся к их цитоплазматической мембране, а в случае *E. coli* K12 — интегрируются сначала в липополисахаридный слой наружной мембраны, а затем переносятся к внутренней. Результатом подобной интеграции и переноса является нарушение целостности барьерных структур микробных клеток, что и было продемонстрировано посредством флуоресцентной спектроскопии, зафиксировавшей увеличение проницаемости клеточной стенки микроорганизмов. Последнее предположение находит подтверждение в работе Zhu X. et al. [19], которые с помощью флуоресцентной спектроскопии, проточной цитометрии, сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии доказали способность антимикробных пептидов увеличивать проницаемость и нарушать структурную целостность наружной и цитоплазматической мембран бактериальных клеток.

Полученные данные расширяют представление о биологических механизмах антимикробного действия веществ пептидной природы из тромбоцитов кур и являются частью работы по разработке нового перспективного класса антимикробных полифункциональных препаратов, которые могут быть в будущем использованы в медицине и ветеринарии для терапии инфекционно-воспалительных заболеваний.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Резистентность к противомикробным препаратам: повторение «трагедии общего достояния». Бюллетень ВОЗ. 2010, 88 (11): 805-806.
2. Aktan İ., Dunkel B., Cunningham F.M. Equine platelets inhibit *E. coli* growth and can be

- activated by bacterial lipopolysaccharide and lipoteichoic acid although superoxide anion production does not occur and platelet activation is not associated with enhanced production by neutrophils. *Veterinary Immunol. Immunopathol.* 2013, 152 (3-4): 209-217.
3. Aziz A.-M. The role of healthcare strategies in controlling antibiotic resistance. *British J. Nursing.* 2013, 22 (18): 1066-1074.
 4. Brodgen K.F. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 2005, 3 (3): 238-250.
 5. Dankert J., Krijgsveld J., Van der Werff J. et al. Platelet microbicidal activity is an important defense factor against viridans Streptococcal endocarditis. *J. Infect. Dis.* 2001, 184: 597-605.
 6. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. Influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* 1929, 10: 226-236.
 7. Forde E., Devocelle M. Pro-moieties of antimicrobial peptide prodrugs. *Molecules.* 2015, 20 (1): 1210-1227.
 8. Ivanov I.B., Gritsenko V.A. Comparative activities of cattle and swine platelet microbicidal proteins. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 2009, 1 (2): 148-151.
 9. Jenssen H., Hamill P., Hancock R.E.W. Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006, 19 (3): 491-511.
 10. Mohan K.V.K., Rao S.S., Gao Y. et al. Enhanced antimicrobial activity of peptide-cocktails against common bacterial contaminants of ex vivo stored platelets. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014, 20 (1): 39-46.
 11. Tang Y.-Q., Yeaman M.R., Selsted M.E. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect. Immunity.* 2002, 70 (12): 6524-6533.
 12. Vasilchenko A., Dymova V., Kartashova O. et al. Morphofunctional reaction of bacteria treated with antimicrobial peptides derived from farm animal platelets. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 2015, 7 (1): 60-65.
 13. Wang G. Human antimicrobial peptides and proteins. *Pharmaceuticals.* 2014, 7 (5): 545-594.
 14. Wiegand I., Hilpert K., Hancock R.E.W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols.* 2008, 3 (2): 163-175.
 15. Yamasaki K., Gallo R.L. Antimicrobial peptides in human skin disease. *Eur. J. Dermatol.* 2008, 18 (1): 11-21.
 16. Yeaman M.R. Platelets: At the nexus of antimicrobial defence. *Nature Rev. Microbiol.* 2014, 12 (6): 426-437.
 17. Yount N.Y., Gank K.D., Xiong Y.Q. et al. Platelet microbicidal protein 1: Structural themes of a multifunctional antimicrobial peptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48 (11): 4395-4404.
 18. Yurong Y., Yibao J., Ruiping S. et al. Effects of chicken intestinal antimicrobial peptides on humoral immunity of chickens and antibody titres after vaccination with infectious bursal disease virus vaccine in chicken. *Archives Animal Nutrition.* 2006, 60 (5): 427-435.
 19. Zhu X., Dong N., Wang Z. et al. Design of imperfectly amphipathic α -helical antimicrobial peptides with enhanced cell selectivity. *Acta Biomaterialia.* 2014, 10 (1): 244-257.

Поступила 10.05.15

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

Ю.А.Тюрин^{1,2}, Р.С.Фассахов¹, Т.В.Григорьева¹, И.Г.Мустафин²

МИКРОБНЫЙ СОСТАВ РАЗЛИЧНЫХ УЧАСТКОВ КОЖИ ПРИ РАЗВИТИИ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА ПО ДАННЫМ МЕТОДА MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ

¹Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии, ²Казанский государственный медицинский университет

Цель. Изучить трансформацию кожной микрофлоры при развитии атопического дерматита. **Материалы и методы.** Обследованы 45 больных с различными формами атопического дерматита (АтД). Контрольная группа состояла из 26 здоровых лиц. Штаммы культивировали на селективных питательных средах. Идентификацию выделенных штаммов осуществляли методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. **Результаты.** У больных АтД установлены низкая частота встречаемости на коже лица таксона *Staphylococcus epidermidis* и высокая частота встречаемости *Staphylococcus aureus* на коже верхних и нижних конечностей, по сравнению со здоровыми лицами. Частота встречаемости протеолитически активных изолятов *S. aureus* у больных АтД была в 3 раза выше, чем у здоровых носителей этого таксона. У больных АтД на коже нижних конечностей и шеи выявлены таксоны микроорганизмов, не свойственные здоровым лицам, такие как *Bacillus mycoides*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas radiobacter*. Отмечена высокая частота встречаемости грибов *Cryptococcus satoi*, *Candida albicans*, *Malassezia globosa*. **Заключение.** Снижение барьерных функций кожи при АтД способствует контаминации кожи больных редкими бактериальными таксонами и грибами. Одним из возможных механизмов подавления функции иммунокомпетентных клеток могут выступать протеолитические ферменты *S. aureus*.

Журн. микробиол., 2016, № 2, С. 30—36

Ключевые слова: атопический дерматит, MALDI-TOF масс-спектрометрия, *Staphylococcus aureus*, Ig протеолитическая активность

Yu.A.Tyurin^{1,2}, R.S.Fassakhov¹, T.V.Grigorieva¹, I.G.Mustafin²

MICROBIAL COMPOSITION OF VARIOUS SURFACES OF SKIN DURING DEVELOPMENT OF ATOPIC DERMATITIS BASED ON DATA FROM MALDI-TOF MASS-SPECTROMETRY IDENTIFICATION METHOD

¹Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, ²Kazan State Medical University, Russia

Aim. Study transformation of skin microflora during development of atopic dermatitis. **Materials and methods.** 45 patients with various forms of atopic dermatitis (AtD) were examined. Control group consisted of 26 healthy individuals. The strains were cultivated on elective nutrient media. Identification of the isolated strains was carried out by MALDI-TOF mass-spectrometry method. **Results.** A low frequency of occurrence of taxon *Staphylococcus epidermidis* on face skin and high frequency of occurrence of *Staphylococcus aureus* on upper and lower limb skin was established for AtD patients compared with healthy individuals. The frequency of occurrence of proteolytically active isolates of *S. aureus* in AtD patients was 3 times higher than in healthy carriers of this taxon. Taxons of microorganisms not inherent to healthy individuals such as *Bacillus mycoides*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas radiobacter* were isolated on lower limb and neck skin of AtD patients. A high frequency of occurrence of *Cryptococcus satoi*, *Candida albicans*, *Malassezia globosa* fungi was noted. **Conclusion.** A decrease of barrier functions of skin during AtD facilitates contamination of patients' skin with rare bacterial taxons and fungi. One of the possible mechanisms of suppression of immune competent cell functions could be proteolytic enzymes of *S. aureus*.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 2, P. 30—36