

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЙ СПЕКТР ТРОМБОДЕФЕНСИНОВ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ

М.В. СЫЧЕВА,

кандидат биологических наук, заведующая лабораторией
кафедры микробиологии,

Е.В. ШЕЙДА,

аспирант,

О.Л. КАРТАШОВА,

доктор биологических наук, доцент,

А.П. ЖУКОВ,

доктор ветеринарных наук, профессор, декан факультета
ветеринарной медицины и биотехнологий, Оренбургский ГАУ

Ключевые слова: катионные антимикробные пептиды,
тромбодефенсины, бактерии.

Противомикробные пептиды являются неотъемлемыми молекулярными компонентами системы врождённого иммунитета организма [1, 2]. Среди них особое место занимают низкомолекулярные белки (пептиды) с выраженными катионными свойствами, к которым относятся и тромбодефенсины – пептиды, локализованные в альфа-гранулах тромбоцитов, высвобождающиеся из них при повреждении тканей [3] и обладающие антибактериальной, антимикотической и антивирусной активностью [4]. Вместе с тем имеются лишь единичные, порой противоречивые сведения о наличии тромбодефенсинов у сельскохозяйственных животных и их антимикробной активности, что и предопределило цель настоящего исследования.

Цель исследований

Изучить антимикробный спектр тромбоцитарного катионного белка (ТКБ) сельскохозяйственных животных.

Материалы и

методы исследований

В работе были изучены тромбодефенсины, полученные из тромбоцитов лошадей, крупного рогатого скота, коз и кур путём замораживания и размораживания тромбоцитарной массы с последующим центрифугированием. Супернатант использовали для определения антимикробной активности.

Общее содержание белка в полученных экстрактах определяли по методу Бредфорда [5]. Спектр антимикробной активности кислоторастворимых белков тромбоцитов оценивали *in vitro* в отношении музейных культур *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* K12, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans*. За минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) антимикробного препарата принимали концентрацию, подавляющую рост 50% колоний бактерий по сравнению с контролем. Активность препарата пересчитывали с учётом содержания белка в кислотном экстракте.

Результаты исследований

Проведённые исследования показали, что кислоторастворимые белки тромбоцитов крови сельскохозяйственных животных обладают антимикробной активностью в отношении разнообразных представителей кокковых, а также палочковидных грамположительных и грамотрицательных форм бактерий и грибов. Однако минимальная бактерицидная концентрация тромбодефенсинов, полученных от разных видов животных, изменялась в широких пределах (рис.).

Высокий уровень антимикробной активности ТКБ выявлен в отношении спорообразующей грамположительной бактерии *B. cereus*. Причём минимальная бактерицидная концентрация варьировала от 0,10 для ТКБ птицы до 0,38 мг/мл для ТКБ крупного рогатого скота.

Антимикробная активность тромбодефенсинов исследуемых видов животных в отношении грамотрицательных микроорганизмов была несколько ниже. Так, нативный препарат тромбоцитарного катионного белка, полученный от лошадей, крупного рогатого скота и коз, полностью подавлял рост *E. coli*, от кур – 99,2% КОЕ. При разведении ТКБ 1/2 зафиксирован рост 7 КОЕ *E. coli* после инкубации с белком, выделенным от лошадей, 12 КОЕ – от крупного рогатого скота, 72 КОЕ – от птиц, 5 КОЕ – от коз. Следует отметить, что при разведении препарата 1/8 антимикробное действие белка, выделенного из тромбоцитов коз, было значительно выше, чем активность ТКБ лошадей, крупного рогатого скота и кур (212 КОЕ и 1055, 1304, 1288 КОЕ соответственно). Активность ТКБ коз в отношении *E. coli* также оказалась наибольшей – 16 единиц. При этом минимальная бактерицидная концентрация составила 0,11 мг/мл против 0,28 мг/мл для ТКБ лошадей и 0,51 мг/мл для тромбодефенсинов крупного рогатого скота и птицы.

Следует отметить, что при разведении препарата 1/8 антимикробное



460014, г. Оренбург,
ул. Челюскинцев, 18;
тел. 8-9228201115,
8 (3532) 20-73-95;
e-mail: sycheva_maria@mail.ru,
elena-shejjda@rambler.ru,
labpersist@mail.ru

действие белка, выделенного из тромбоцитов козы, в отношении *K. pneumoniae* было незначительно выше, чем активность ТКБ лошади и крупного рогатого скота, но меньше, чем активность кислотного экстракта из тромбоцитов кур, а МБК составила 0,23 и 0,28, 0,38 мг/мл соответственно. Разведение ТКБ 1/16 у птиц оказалось минимальной бактерицидной концентрацией, подавляющей рост 50% *K. pneumoniae*. В разведении нативного препарата 1/32 количество колоний в пробах с ТКБ всех видов животных практически не отличалось от контрольных значений (количество КОЕ *K. pneumoniae* в контроле составило 1304).

Число жизнеспособных клеток *M. luteus* при обработке кислотным экстрактом тромбоцитов, полученным от разных видов животных, изменялось в широких пределах – от 0 КОЕ у птиц до 4 КОЕ у лошадей. ТКБ птиц в нативном состоянии задерживал рост 96,5% грамположительных бактерий *M. luteus*. При этом количество выживших микроорганизмов составило 18 КОЕ. При обработке культуры *M. luteus* кислотным экстрактом ТКБ крупного рогатого скота и кур в разведении 1/8 зафиксирован рост 245 и 226 КОЕ соответственно, что почти на 50% меньше, чем в контроле (546 КОЕ). Следовательно, активность тромбоцитарного катионного белка составила 8 единиц (МБК 0,38 мг/мл). Значение МБК в отношении исследуемого микроорганизма для ТКБ крупного рогатого скота и птицы занимает промежуточное положение между МБК лошадей (0,14 мг/

**Cationic antimicrobial
peptides, thrombodefensins,
bacteria.**

мл) и коз (0,45 мг/мл).

Антимикробное действие ТКБ в отношении гриба *C. albicans* имело следующие особенности. Нативный препарат тромбоцитарного катионного белка, полученный от лошади, козы и курицы, полностью подавлял рост *C. albicans*, от крупного рогатого скота –

92,2% КОЕ. Разведение ТКБ крупного рогатого скота и кур 1/4 оказалось минимальной бактерицидной концентрацией, ингибирующей рост 50% *C. albicans*. Антимикотическая активность кислотного экстракта из тромбоцитов лошади составила 2 единицы. Наиболее активным в отношении дрож-

жеподобных грибов рода *Candida* оказался кислотный экстракт из тромбоцитов коз – 16 единиц активности. При этом минимальная бактерицидная концентрация варьировала от 0,13 и 0,11 мг/мл для тромбодифенсинов лошади и козы до 0,76 мг/мл для ТКБ крупного рогатого скота и курицы.

Выводы

Таким образом, ТКБ разных видов животных обладает высокой антимикробной активностью в отношении спорообразующих грамположительных бактерий, в меньшей степени – против исследованных представителей кокковой группы, энтеробактерий и грибов *Candida albicans*. Наиболее высокий уровень антимикробной активности отмечался у тромбодифенсинов из кислотного экстракта тромбоцитов коз и птицы.

Дальнейшее изучение тромбодифенсинов и механизма их антимикробного действия создаст предпосылки для разработки нового перспективного класса лекарственных препаратов, которые, по прогнозам аналитиков, в XXI веке займут подавляющий сегмент мирового рынка антимикробных препаратов [6].

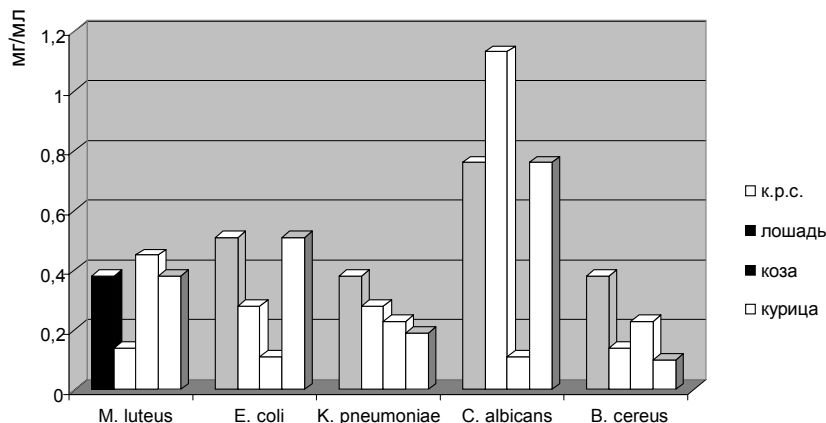


Рис. Минимальная бактерицидная концентрация ТКБ разных видов животных

Литература

- Jenssen H., Hamill P., Hancock R. E. W. Peptide antimicrobial agents // *Clinical Microbiology Reviews*. 2006. Vol. 19. № 3. P. 491-511.
- Primate b-defensins – Structure, Function and Evolution / S. Crovella, N. Antcheva, I. Zelezetsky [et al.]. // *Current Protein and Peptide Science*. 2005. Vol. 6. P. 7-21.
- Platelet Microbicidal Activity Is an Important Defense Factor against Viridans Streptococcal Endocarditis / J. Dankert, J. Krijgsveld, J. van der Werff [et al.]. // *The Journal of Infectious Diseases*. 2001. Vol. 184. № 1. P. 597-605.
- Бухарин О. В., Черешнев В. А., Сулейманов К. Г. Антимикробный белок тромбоцитов. Екатеринбург, 2000. 200 с.
- 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. Vol. 72. P. 248-254.
- Hancock R. E. W., Lehrer R. Cationic peptides: a new source of antibiotics // *Trends Biotechnol.* 1998. Vol. 16. P. 82-88.