

ВЛИЯНИЕ ТРОМБОДЕФЕНСИНОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ НА НЕКОТОРЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ

Сычева М.В. к.б.н., доцент, Галиуллина Л.Ф., аспирант, Карташова О.Л., д.б.н., профессор

Ключевые слова: катионные антимикробные пептиды, тромбодифенсины, бактерии, антагонистически активные вещества, *Lactobacillus*, антибиотики.

Аннотация: Тромбодифенсины сельскохозяйственных животных повышают чувствительность условно-патогенных микроорганизмов к антагонистически активным веществам лактобацилл и к антибиотикам. Максимальное увеличение чувствительности к антагонистически активным веществам бактерий рода *Lactobacillus* отмечено у клонов *S. aureus* и *C. albicans*, к антибиотикам - у *S. aureus* к мономицину и *E. coli* к канамицину. Наибольший эффект наблюдается при соинкубировании бактерий с тромбодифенсинами кур.

В последние годы отмечаются значительные темпы роста бактериальных инфекций. Расширение спектра возбудителей, многообразие их свойств, рост антибиотикорезистентных штаммов диктуют необходимость поиска новых подходов к лечению бактериальных инфекций [6]. В данных условиях, важным арсеналом совершенствования терапевтических подходов является разработка нового поколения препаратов на основе антимикробных пептидов, среди которых на сегодняшний день особое внимание уделяется низкомолекулярным катионным белкам из тромбоцитов или тромбодифенсинам (ТД) [8]. Результаты исследований последних лет свидетельствуют о способности ТД изменять персистентные характеристики микроорганизмов, влиять на биопленкообразование [4, 5]. Установлен противомикробный эффект тромбоцитарного катионного белка (ТКБ). Вместе с тем, в литературе отсутствуют сведения, касающиеся характера изменения таких признаков условно-патогенных микроорганизмов, как чувствительность к антибиотикам, а также к антагонистически активным веществам представителей нормальной микрофлоры микроорганизма в результате воздействия ТКБ. Расширенное изучение данного вопроса, на наш взгляд позволит по-новому подойти к решению проблемы лечения инфекционных заболеваний и коррекции дисбиозов.

Всё вышеизложенное и предопределило **цель** настоящего исследования - изучить влияние антимикробных пептидов из тромбоцитов сельскохозяйственных животных на антибиотикочувствительность и чувствительность условно-патогенных микроорганизмов к антагонистически активным веществам лактобацилл.

Материалы и методы.

В исследование были включены тромбодифенсины, выделенные из тромбоцитов лошадей, крупного рогатого скота и кур методом кислотной экстракции. Содержание белка в полученных кислотных экстрактах определяли по методу М.М. Брэдфорда [7]. Изучено влияние кислотных экстрактов из тромбоцитов на антибиотикочувствительность штаммов *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* и на чувствительность клонов *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* к антагонистически активным веществам бактерий рода *Lactobacillus* (штаммы L 364 и L 370), выделенных из репродуктивного тракта. Для оценки воздействия ТКБ на микроорганизмы суточные агаровые культуры культивировали с кислотными экстрактами из тромбоцитов (рН 5,5–5,8) в минимальной подавляющей концентрации (МПК) и 1/4 МПК, установленных нами ранее, в течение 1 часа при 37°C с последующим высевом в объеме 0,2 мл на питательный агар. Оценка антибиотикочувствительности микроорганизмов до и после соинкубирования с ТКБ проведена с помощью диско-диффузионного метода [3].

Чувствительность условно-патогенных микроорганизмов к антагонистически активным веществам лактобацилл определяли с помощью чашечного метода (принцип отсроченного антагонизма) [1]. Степень чувствительности к антагонистическим факторам лактобацилл условно-патогенных микроор-

ганизмов выражали с помощью коэффициента, который рассчитывали как отношение диаметра зоны задержки роста условно-патогенного микроорганизма к диаметру зоны роста культуры лактобацилл.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента [2].

Результаты исследований

В результате проведенных исследований было установлено, что антимикробные пептиды из тромбоцитов сельскохозяйственных животных усиливали чувствительность *S. aureus* и *C. albicans* к антагонистически активным веществам бактерий рода *Lactobacillus*.

Максимальное увеличение чувствительности клонов *S. aureus* к антагонистическим факторам штамма L370 отмечено после соинкубирования с тромбодифенсинами крупного рогатого скота в МПК, при этом коэффициент антагонистической активности увеличился в 3,3 раза ($15,2 \pm 6,51$ против $4,6 \pm 1,43$ в контроле) (рис.).

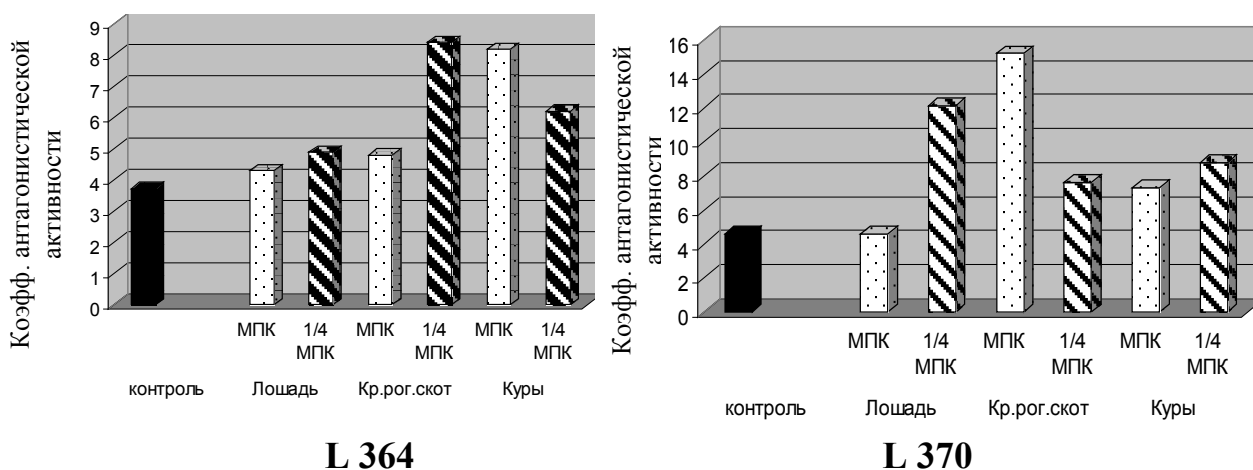


Рисунок - Влияние тромбодифенсина сельскохозяйственных животных на чувствительность *S. aureus* к антагонистически активным веществам лактобацилл

Коэффициенты антагонистической активности для штамма L 364 в отношении *S. aureus* после соинкубирования с тромбодифенсинами крупного рогатого скота в МПК и 1/4 МПК составили, соответственно, $4,8 \pm 1,02$ и $8,4 \pm 2,31$ против $3,72 \pm 0,58$ в контроле, а для штамма L370 – в 1/4 МПК $7,6 \pm 3,8$ против $4,6 \pm 1,43$ в контроле. При воздействии тромбоцитарного катионного белка, полученного от других животных, на *S. aureus* также регистрировали выраженное изменение признака. Так, у клонов *S. aureus* при соинкубировании с ТКБ птицы в 1/4 МПК отмечено увеличение чувствительности к антагонистически активным веществам L 370 в 1,9 раз, а при соинкубировании с кислотным экстрактом из тромбоцитов лошади в той же концентрации изучаемый показатель увеличивался в 2,6 раза. Также у клонов *S. aureus* было установлено значительное изменение чувствительности к антагонистическим факторам L364 при соинкубировании с ТКБ птицы в МПК, с увеличением коэффициента антагонистической активности в 2,2 раза. Изменения значений чувствительности клонов *S. aureus* к антагонистически активным веществам лактобацилл были в пределах ошибки средней арифметической, а поэтому различия между величинами оказались недостоверными.

Следует отметить, что тромбодифенсины крупного рогатого скота по сравнению с антимикробными пептидами из тромбоцитов лошади и кур в наибольшей степени увеличивали чувствительность клонов *S. aureus* к антагонистически активным веществам лактобацилл.

При изучении влияния тромбодифенсина лошади в МПК на чувствительность *C. albicans* к антагонистически активным веществам лактобацилл было установлено увеличение изучаемого показателя в среднем на 35,45% (табл. 1). При соинкубировании *C. albicans* с тромбодифенсинами лошади в 1/4 МПК отмечено увеличение коэффициента в 2,1 раза для L364 ($p < 0,05$) и в 1,9 раза – для L370 ($p < 0,05$).

Таблица 1. - Влияние тромбодифенсинов сельскохозяйственных животных на чувствительность *S. albicans* к антагонистически активным веществам лактобацилл

		Коэффициент антагонистической активности лактобацилл	
		L 364	L370
Тромбодифенсины	Контроль	5,5±1,20	6,6±1,53
	МПК	8,4±1,70	7,8±1,40
Лошади	1/4 МПК	11,7±2,04*	12,7±2,22*
	МПК	7,5±1,19	5,4±0,63
Крупного рогатого скота	1/4 МПК	12,1±1,65**	8,6±1,20
	МПК	12,8±1,27**	14,9±1,74**
Кур	1/4 МПК	14,0±2,76*	9,8±2,84

Примечание: * - достоверность различий коэффициента антагонистической активности в контроле и после соинкубирования с кислотным экстрактом тромбоцитов ($p < 0,05$); ** - ($p < 0,01$).

В меньшей степени изменялась чувствительность *S. albicans* к антагонистически активным веществам лактобацилл под действием кислотного экстракта из тромбоцитов крупного рогатого скота. В среднем изучаемый показатель увеличивался на 18,2% после соинкубирования с тромбодифенсинами в МПК. Более существенное изменение рассматриваемого параметра было отмечено при соинкубировании *S. albicans* с ТД в 1/4 МПК. Коэффициент антагонистической активности для *Lactobacillus* 364 составил 12,1±1,65 против 5,5±1,20 в контроле ($p < 0,01$), для *Lactobacillus* 370 – 8,6±1,20 против 6,6±1,35 в контроле.

Максимальное изменение признака наблюдали при воздействии на микроорганизмы тромбодифенсинами кур. Так, под влиянием ТКБ кур в МПК отмечалось увеличение коэффициента антагонистической активности лактобацилл L 364 и L 370 в отношении *S. albicans* в 2,3 раза. Разница значений по сравнению с контролем в обоих случаях достоверна ($p < 0,01$). Коэффициент антагонистической активности L 364 и L 370 в отношении *S. albicans* после соинкубирования с кислотным экстрактом из тромбоцитов птицы в 1/4 МПК возрастал по сравнению с контролем в 2,5 ($p < 0,05$) и 1,5 раза соответственно.

В ходе проведенных исследований было установлено, что в целом, тромбодифенсины повышают антибиотикочувствительность микроорганизмов. Степень выраженности данного признака как у штаммов *E. coli*, так и у штаммов *S. aureus* под влиянием ТКБ, выделенных от разных животных, зависела от его концентрации и от антибиотика, в отношении которого определяли чувствительность. Максимальное повышение антибиотикочувствительности отмечено у *E. coli* под влиянием ТКБ кур в минимальной подавляющей концентрации в отношении ломефлоксацина, средняя зона задержки роста штаммов составила 24,7±1,45 мм против 20,7±0,84 мм в контроле ($p < 0,05$). Также под влиянием ТКБ кур в 100% случаев выявлен эффект повышения чувствительности штаммов *E. coli* к ломефлоксацину, диаметр зоны подавления роста варьировал от 23,7±1,36 мм до 24,7±1,45 мм.

Как показали наши исследования, антимикробные пептиды из тромбоцитов кур повышали чувствительность штаммов *E. coli* также и к остальным изученным антибиотикам. При сокультивировании с ТКБ кур в МПК зарегистрировано повышение чувствительности к левомицетину на 6,8% (20,5±0,89 против 19,2±0,75 в контроле), при сокультивировании с 1/4 МПК чувствительность к канамицину увеличивалась на 11,6% (17,2±1,68 против 15,2±2,54 в контроле).

Наиболее подверженной влиянию изученных тромбодифенсинов оказалась чувствительность штаммов *E. coli* к канамицину. Максимальное изменение данного признака под воздействием кислотного экстракта из тромбоцитов установлено при сокультивировании с тромбодифенсинами лошади и крупного рогатого скота в МПК, что составило 18,8±1,17 мм и 19,0±1,75, соответственно, против 15,2±2,54 в контроле (табл.2).

Таблица 2. - Влияние тромбодифенсинов сельскохозяйственных животных на антибиотикочувствительность *E. coli*

Тромбодифенсины	контроль	Зоны задержки роста, Sx ± x		
		левомицетин	канамицин	ломефлоксацин
		19,2±0,75	15,2±2,54	20,7±0,84
Лошади	МПК	20,3±0,76	18,8±1,17	21,7±1,20
	1/4 МПК	19,3±0,95	16,0±2,0	22,3±0,61
Кур	МПК	20,5±0,89	15,2±0,54	24,7±1,45*
	1/4 МПК	19,0±0,63	17,2±1,68	23,7±1,36
Крупного рогатого скота	МПК	20,7±1,20	19,0±1,75	21,8±1,54
	1/4 МПК	19,8±1,40	16,5±1,61	21,5±1,73

Примечание: * - достоверность различий показателя антибиотико-чувствительности в контроле и после соинкубирования с кислотным экстрактом тромбоцитов ($p < 0,05$).

Как показали наши исследования, максимальное изменение изучаемого признака отмечено при сокультивировании *S. aureus* с ТКБ из тромбоцитов крупного рогатого скота в МПК. При сокультивировании штаммов с данным препаратом чувствительность к мономицину, левомицетину, канамицину, олеандомицину и эритромицину увеличилась на 13,7%, 2,3%, 11,5%, 1,03%, 6,7%, соответственно. При этом установлено, что все препараты наиболее эффективно изменяли чувствительность штаммов к мономицину: значения данного признака увеличивались на 9,8% при соинкубировании с тромбодифенсинами лошади в МПК, на 13,7% при соинкубировании с тромбодифенсинами птицы в 1/4 МПК и крупного рогатого скота в минимальной подавляющей концентрации (табл. 3). В результате исследований не было установлено зависимости между концентрацией тромбодифенсинов и степенью их активности.

Таблица 3. - Влияние тромбодифенсинов сельскохозяйственных животных на антибиотикочувствительность *S. aureus*

Тромбодифенсины	Контроль	Зоны задержки роста, Sx ± x				
		мономицин	левоми-цетин	кана-мицин	олеандо-мицин	эритро-мицин
		18,2±1,42	21,3±0,61	21,8±0,60	19,5±0,62	22,5±0,43
Лошади	МПК	20±0,45	22,3±0,71	23,0±1,03	19,2±1,11	24,3±0,84
	1/4 МПК	19,7±0,80	21,8±0,65	25,0±2,37	20,5±0,96	23,8±1,07
Кур	МПК	19,5±0,72	20,8±2,30	22,0±0,25	19,8±0,87	23,3±0,88
	1/4 МПК	20,7±0,61	21,8±0,65	23,8±2,10	18,2±0,65	19,7±1,28
Кр. рог. скота	МПК	20,7±0,76	21,8±0,79	24,3±1,26	19,7±0,67	24,0±0,63
	1/4 МПК	19,8±0,60	21,0±0,68	22,5±0,72	18,5±0,72	23,3±0,52

Заключение

Таким образом, тромбодифенсины сельскохозяйственных животных оказывают стимулирующее влияние на чувствительность условно-патогенных микроорганизмов к антагонистически активным веществам бактерий рода *Lactobacillus* и чувствительность микроорганизмов к антибиотикам. Наиболее выраженную активность в отношении антибиотикочувствительности штаммов *S. aureus* проявляли тромбодифенсины крупного рогатого скота в отношении *E. coli* - ТКБ кур. Максимальное увеличение антибиотикочувствительности установлено у *S. aureus* к мономицину и *E. coli* к канамицину.

В ходе проведенного исследования отмечено максимальное повышение чувствительности *S. aureus* к антагонистическим факторам лактобацилл L364 под воздействием тромбоцитарного катионного белка крупного рогатого скота. Однако, наиболее выраженным стимулирующим действием на чувствительность *C. albicans* к факторам межмикробного взаимодействия лактобацилл обладает кислотный экстракт из тромбоцитов птицы.

Известно, что большинство антимикробных пептидов эндогенного происхождения, в том числе и тромбодефенсины, являются мембраноактивными агентами [9]. Полученные нами данные позволяют предположить, что соинкубирование с ТД приводит к изменению структуры и функции цитоплазматических мембран, что способствует проникновению в микробную клетку антибиотических веществ, обуславливающих антагонистическую активность лактобацилл в отношении условно-патогенных микроорганизмов, а также синтетических антибиотиков.

Список литературы

1. Кудлай Д.Г. Бактериоциногенез / Д.Г. Кудлай, В.Г. Лиходед. - М.: Медицина, 1966. - 203 с.
2. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. - М.: Высшая школа, 1990. - 288 с.
3. Методические указания МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 4 марта 2004 г.).
4. Сычёва М.В. Влияние тромбодефенсинов некоторых видов животных на антилактоферриновую активность микроорганизмов / М.В. Сычёва, Е.В. Шейда, О.Л. Карташова // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э.Баумана. - Казань. – 2010. - С. 256-259.
5. Сычева М.В. Влияние антимикробных пептидов из тромбоцитов сельскохозяйственных животных на способность микроорганизмов к образованию биопленок / М.В. Сычёва, Е.В. Шейда, О.Л. Карташова И.В. Вальшева // Известия КрасГАУ. – 2011. -№1. – С. 130-132.
6. Яковлев В.П. Рациональная антимикробная фармакотерапия / В.П. Яковлев, С.В. Яковлев. - М.: Мир, 2008.- 1001 с.
7. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // Anal. Biochem. - 1976. - Vol. 72. – P. 248-254.
8. Tang Y.Q. Antimicrobial peptides from human platelets / Q.Y. Tang, M.R. Yeaman, M.E. Selsted // Infection and Immunity. – 2002. - Vol. 70. - №12 - P. 6524-6533.

УДК 619:636:616-093-08-035

ОПТИМИЗАЦИЯ КОНТРОЛЯ ОСНОВНЫХ ХОЗЯЙСТВЕННО-ЗНАЧИМЫХ БАКТЕРИОЗОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Л.Г. Улько, кандидат ветеринарных наук, доцент
Т.И. Фотина, доктор ветеринарных наук, профессор
А.В. Березовский, кандидат ветеринарных наук, доцент
А.А. Фотина, кандидат ветеринарных наук, доцент
Сумский национальный аграрный университет, Украина
(0542) 62-78-58, larisau@ukr.net

Ключевые слова: микрофлора, антибиотикорезистентность, бактериозы, крупный рогатый скот, лечение, профилактика

Работа посвящена изучению антибиотикорезистентности микрофлоры изолированной от коров с ассоциативным течением бактериозов и разработке эффективной схемы их лечения и профилактики.

Введение. Среди заболеваний крупного рогатого скота наиболее распространенными остаются