

ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ИЗ КРОВЯНЫХ ПЛАСТИНОК ЛОШАДИ ДОМАШНЕЙ (*EQUUS FERUS CABALLUS*)

Пешкова Ю. И.¹, Сычева М. В.^{1,2}, Рогожин Е. А.³,
Васильченко А. С.², Карташова О. Л.²

¹ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный аграрный университет», Оренбург;

²ФГБУН Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург;

³Институт биоорганической химии им. ак. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН,
Москва, Россия

Целью нашей работы являлось выделение очищенных АМП из кровяных пластинок лошади домашней (*Equus ferus caballus*) и изучение их антимикробной активности. Используя метод обращённо-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) было получено десять фракций. У четырёх пептидных фракций зафиксирована антимикробная активность в отношении *S. aureus*.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, лошадь домашняя, кровяные пластинки

Длительное время тромбоциты и кровяные пластинки рассматривались исключительно как клетки, играющие важную роль в гемостазе, остановке кровотечения при повреждении, а также в заживлении и регенерации тканей. Однако, обнаруженная антимикробная активность пептидов, продуцируемых тромбоцитами, наряду со способностью последних активировать антигенпредставляющие клетки, генерировать активные формы кислорода, стимулировать образование внеклеточных нейтрофильных ловушек и взаимодействовать с различными иммунокомпетентными клетками, способствовали признанию существенной роли тромбоцитов в противомикробной защите макроорганизма [1].

Одна из ключевых ролей тромбоцитов и кровяных пластинок в защите организма от инфекции связана с инициацией процессов синтеза антимикробных пептидов (АМП) и белков, происходящей в результате взаимодействия инфекционных агентов со специфическими toll-подобными рецепторами, которые экспрессируются на кровяных пластинках человека [2] и обеспечивают распознавание патогенассоциированных молекулярных паттернов.

О наличии антимикробных пептидов в кровяных пластинках лошади свидетельствует тот факт, что под влиянием липополисахаридов и липотейхоевых кислот клеточной стенки

бактерий происходит их активация и, как следствие, подавление роста *E. coli in vitro* [3]. Эти наблюдения определили цель нашей работы – выделить очищенные АМП из кровяных пластинок лошади домашней (*Equus ferus caballus*) и изучить их антимикробную активность.

Материалы и методы. Антимикробные пептиды получали из уксуснокислого экстракта кровяных пластинок лошади домашней методом обращённо-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) в ступенчатом и линейном градиентах увеличения концентрации органического растворителя [4].

Молекулярные массы пептидов измеряли на MALDI времяпролетном масс-спектрофотометре Ultraflex (Bruker Daltonics, Германия), оснащённом УФ-лазером с длиной волны 337 нм в линейном режиме. Масс-спектры анализировали с помощью программы Bruker DataAnalysis for TOF.

Антимикробную активность полученных пептидов определяли методом микротитрования в бульоне [5] в отношении тест-штаммов микроорганизмов: *Escherichia coli* K 12, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* P209.

Основные результаты исследований. В результате фракционирования уксуснокислого экстракта кровяных пластинок лошади домашней (*E. ferus caballus*) в гомогенном виде было

получено десять фракций с наиболее высоким поглощением при длине волны 214 нм. Содержание соединений в экстракте оказалось довольно обедненным, и в «гидрофобной зоне» был отмечен максимум поглощения, приходящийся на долю трёх фракций (№№ 8-10) с временами удерживания около 55-65 минут, которые в количественном аспекте более чем на 90% обеспечивали весь состав полипептидов данного экстракта.

В результате измерения молекулярных масс выделенных полипептидов был получен набор значений масс-зарядов в пептидном (2-10,8 кДа) и белковом (около 15-16 кДа) диапазонах, при этом преимущественное количество компонентов было локализовано в интервале 2,7-5,8 кДа, что может свидетельствовать о довольно значимом разнообразии пептидов.

Исследование антимикробных свойств соединений, полученных при хроматографии уксуснокислого экстракта кровяных пластинок лошади, методом серийных разведений в бульоне с наблюдением за ростом и развитием клеточных популяций не выявили значимых эффектов в отношении культур *B. subtilis* и *E. coli* K12.

У четырёх пептидных фракций (№№ 2-5) зафиксирована антимикробная активность в отношении *S. aureus*. В сравнительном аспекте наиболее выраженным антимикробным действием в отношении золотистого стафилококка обладали пептиды второй фракции. Однако полного подавления жизнеспособности клеток тест-штамма зафиксировано не было, вероятно в силу недостаточной концентрации пептидов в исследуемых препаратах.

Выводы.

Полученные данные свидетельствуют о том, что кровяные пластинки лошади домашней являются источником десяти фракций, четыре из которых характеризуются антимикробной активностью в отношении *S. aureus*. Проведённые исследования открывают перспективу для дальнейшего изучения функциональной активности АМП из кровяных пластинок *E. ferus caballus*.

Благодарности. Работа велась при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-44-560914).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yeaman, M. R. Platelets: At the nexus of antimicrobial defence. *Nature Reviews Microbiology*. 2014, 12(6), 426-437.
2. Micota B., Sadowska B., Ryjalska B. The role of blood platelets in infections. *Postepy Hig. Med. Dosw.* (Online). 2015, 69, 624-632.
3. Aktan I., 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. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2013, 152(3-4), 209-217.
4. Сычева М. В., Васильченко А. С., Рогожин Е. А., Пашкова Т. М., Попова Л. П. и др. Биологическая активность антимикробных пептидов из тромбоцитов кур. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2016, 2, 24-30.
5. 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.

CHARACTERIZATION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM DOMESTIC HORSE'S PLATELETS

Peshkova Yu. I.¹, Sycheva M. V.^{1,2}, Rogozhin E. A.³,
Vasylchenko A. S.¹, Kartashova O. L.²

¹Orenburg State Agrarian University, Orenburg; ²Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UrD RAS, Orenburg; ³M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry RAS, Moscow, Russia

The aim of this work was to investigate an antimicrobial properties of platelets of domestic horse (*Equus ferus caballus*) and isolate an antimicrobial components. Using a liquid chromatography technique (RP-HPLC) ten fractions were collected from platelet's acid extract. Among these a four fractions demonstrated antimicrobial activity against *S. aureus*.

Key words: antimicrobial peptides, domestic horse, platelets