



Биолог. журн. Армении, 2 (74), 2022

DOI:10.54503/0366-5119-2022.74.2-35

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ГАЛАРМИНА НА ПОКАЗАТЕЛИ
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ МЫШЕЙ ПРИ ИНФЕКЦИИ
МЕТИЦИЛЛИН-РЕЗИСТЕНТНЫМ ШТАММОМ
STAPHYLOCOCCUS AUREUS (MRSA)**

Մ.Բ. МАТЕВОСЯՆ, Ա.Ա. ԴՄՐԳՐՅԱՆ

*Ереванский Государственный Университет
Институт биохимии НАН РА им. Г.Х.Бунятыана
matevosyanm@usy.am mara_matevosyan@hotmail.com*

Было исследовано влияние галармина на гематологические и серологические параметры крови зараженных MRSA мышей. Под влиянием галармина происходит перераспределение форменных элементов крови, изменение абсолютного количества лейкоцитов и тромбоцитов, а также коррелированное с дозой увеличение процентного содержания лимфоцитов.

Обобщенные данные свидетельствуют о комплексном и неспецифичном влиянии галармина на иммунологические параметры крови зараженных животных.

Нейропептиды – общий анализ крови – MRSA – иммуномодулятор

Յետազոտվել է գալարմինի ազդեցությունը MRSA-ով վարակված մկների ծայրամասային արյան սերոլոգիական պարամետրերի վրա: Գալարմինի ազդեցության հետևանքով նկատվել են արյան բջիջների վերաբաշխում, լեյկոցիտների և թրոմբոցիտների բացարձակ թվի փոփոխություն, ինչպես նաև դոզայի հետ փոխկապակցված լիմֆոցիտների տոկոսային աճ:

Ընդհանրացված տվյալները ցույց են տալիս գալարմինի կոմպլեքսային և ոչ սպեցիֆիկ ազդեցությունը վարակված կենդանիների արյան իմունոլոգիական պարամետրերի վրա:

Նեյրոպեպտիդ – արյան ընդհանուր անալիզ – MRSA – իմունամոդուլատոր

The influence of Galarmin on hemotological and serological parameters of peripheral blood of infected mice was studied. Under the influence of the Galarmin, a redistribution of blood cells, a change in the absolute number of leukocytes and platelets, as well as a dose-related increase in the percentage of lymphocytes were observed. The summarized data show the complex and non-specific effect of Galarmin on the immunological parameters of the blood of infected animals.

Neuropeptide – whole blood analysis – MRSA – immunomodulators

Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) за последние десять лет превратился в одну из основных угроз здравоохранению во многих странах мира. Способность микроорганизма приобретать устойчивость ко всем β-лактамным антибиотикам, а также к основным группам современных антибиотиков, включая тетрациклины, аминогликозиды, макролиды, хлорамфеникол, линкозамиды, фторхинолоны и др., существенно ограничивает возможности антимикробной терапии и затрудняет эффективное лечение стафилококковых заболеваний. Последние эпи-

демиологические данные показывают, что *S. aureus*, и в особенности его метициллин-резистентные варианты (MRSA), ответственны за большинство тяжелых случаев внутри- и внебольничных стафилококковых инфекций [2,4,9,10]. В сложившихся условиях необходимость нового подхода к терапии инфекций, вызванных MRSA, становится все более актуальной. Несомненно, что одним из таких подходов может явиться поиск препаратов среди соединений, стимулирующих факторы естественной резистентности макроорганизма.

Открытые А.А. Галояном богатые пролином полипептиды (ПБП), выделенные из нейросекреторных ядер гипоталамуса и нейрогипофиза крупного рогатого скота (*N. Paraventricularis* и *N. Supraopticus*), представляют новую семью гипоталамических нейропептидов. Эти пептиды синтезируются в форме общего белка – предшественника: нейрофизин-вазопрессинассоциированного гликопротеина (НВАГ) и генетически детерминированно разделяются протеолизом во время аксонального транспорта. Относящийся к группе ПБП нейроиммуномодулятор ПБП-1 (галармин) состоит из 15 аминокислотных остатков со следующей первичной структурой: AGAPEPAEPAQPGVY [6-8,11].

Было показано, что галармин обладает свойствами цитокина и проявляет широкий спектр биологической активности, включая иммуномодулирующие, антиоксидантные, противоопухолевые, нейропротекторные и антибактериальные свойства, является регулятором гуморального и клеточного иммунитета, миелопоэза, дифференциации тимоцитов. На основании полученных данных А.А. Галоян сформулировал концепцию о нейроэндокринной иммунной системе мозга [5-8]. В условиях *in vivo* была выявлена высокая биологическая активность галармина против ряда инфекций, вызванных грамотрицательными и грамположительными микроорганизмами, в том числе *Salmonella typhimurium*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* [1,3].

Полученные результаты позволили предположить, что новые выделенные цитокины мозга могут оказаться эффективным средством при заражении бактериями, резистентными к антибиотикам, в частности метициллин-резистентными штаммами *S. aureus*.

В данной работе впервые было изучено влияние галармина и его аналогов на серологические показатели при инфекции MRSA, выявлено существенное увеличение лимфоцитов, а также тромбоцитов на фоне их снижения при инфекции MRSA.

Материал и методика. Было исследовано влияние галармина и его аналогов на гематологические и серологические параметры крови зараженных MRSA белых мышей. Для заражения использовали 18 ч культуру MRSA, выращенную на элективной солевой среде для стафилококков (ФГУП “Аллерген”, Ставрополь, РФ), а также штаммы *S. aureus*. Белые беспатогенные инбредные мыши массой 24-25 г. (самцы) были разделены на экспериментальные и контрольные группы (количество животных в группе - 10). Каждый эксперимент включал негативный (стерильный), и позитивный контроль (инфицированная группа без применения пептидов). Все эксперименты были воспроизведены 10 раз.

Заражение производили в/б в дозах 8×10^8 - $1,2 \times 10^9$ КОЕ/мышь. Галармин вводился в/м за 24 ч до заражения в объеме 0.2 мл физ. раствора. В позитивном контроле животным вводился в равном объеме физ. раствор. На 4-ые сутки после заражения (через 96 ч) в стерильных условиях бралась кровь из сердца в вакуумные пробирки “Vacutest”. Гематологический анализ осуществляли через 96 ч после введения галармина.

Клинический анализ крови производили автоматическими гематологическими анализаторами “Systemx” (TOA Medical Electronics, Япония) и “Horiba ABX Micros 60” (HORIBA ABX, Франция). Лейкоцитарная картина крови была также определена подсчетом клеток на камере Горяева.

Было установлено абсолютное содержание тромбоцитов (PLT#), лейкоцитов (WBC#) вместе с относительным и абсолютным содержанием лимфоцитов (LYM %, LYM#), моноцитов (MON%, MON#), эозинофилов (EOS% EOS#), гранулоцитов (GRA% GRA#), а также абсолютное содержание эритроцитов (RBC), гемоглобин (HGB), гематокрит (HCT) и эритроцитарные индексы: MCV – средний объём эритроцита в кубических фемтолитрах (известный также как микроцитоз, нормоцитоз, макроцитоз); MCH – среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците в абсолютных единицах (цветной показатель крови), пропорциональное отношению «гемоглобин/количество эритроцитов»; MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците, отражающая степень насыщения эритроцита гемоглобином. Определялись также показатели гетерогенности эритроцитов RDW и, в частности RDW-SD – стандартное отклонение относительной ширины распределения эритроцитов по объёму, и RDW-CV – коэффициент вариации относительной ширины распределения эритроцитов по объёму; тромбоцитарные индексы: MPV – средний объём тромбоцитов, PDW – относительная ширина распределения тромбоцитов по объёму, показатель гетерогенности тромбоцитов и P-LCR – коэффициент больших тромбоцитов.

Таблица 1. Клинический анализ крови животных в экспериментальных (зараженных MRSA) и контрольных группах под воздействием галармина в концентрациях 1, 5 и 10 мкг

Параметр	Контроль		Экспериментальные группы		
	1. Негативный	2. Позитивный	3. Галармин 1 мкг	4. Галармин 5 мкг	5. Галармин 10 мкг
WBC $10^3/\text{мм}^3$	4.8±0.82	5.6±1.13	10.4±2.33	4.6±1.56	4.8±1.87
LYM %	46.7±8.26	52.9±10.35	32.3±9.72	52.9±12.16*	59.1±11.81
LYM# $10^3/\text{мм}^3$	3.2±0.42	3.0±0.53	3.4±0.62*	2.4±0.21	2.8±0.20
RBC $10^6/\text{мм}^3$	8.46±0.90	9.31±10.12	8.64±0.94	8.34±0.87	9.25±0.76
HGB г/дл	14.0±0.86	14.4±0.77	13.8±0.35	13.7±0.97	14.7±0.13
HCT %	44±3.56	48.7±4.12*	44.1±4.56	43.8±3.98*	49.0±4.78*
MCV $\mu\text{м}^3$	50.4±2.77	52.3±3.04	51.0±4.01	52.5±4.21	53.0±4.89
MCH пг	15.4±0.66	15.5±0.98	16.0±1.15	16.4±1.67	15.9±1.05
MCHC г/дл	30.6±2.83	29.6±2.98	31.3±3.18	31.3±3.09	30.0±3.45
RDW SD фл	31.5±3.73	32.1±3.67	30.4±2.78	29.7±2.86	29.4±3.00
RDW CV %	17.5±2.60	18.5±1.88	17.4±1.60	15±2.10	16.2±0.8*
PLT $10^3/\text{мм}^3$	446±25.62*	410±23.96*	888±56.88**	634±40.86*	786±59.91*
PDW фл	11.1±0.75	12.6±0.55	10.4±0.45*	10.7±0.61	8.8±0.32*
MPV фл	7.6±2.15	7.8±2.09	7.5±1.79	7.6±1.67	7.3±1.99
P_LCR %	12.8±0.61	13.1±0.45	12.9±0.67	10.5±0.66*	8.9±0.74**

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Результаты и обсуждение. В первой серии экспериментов было исследовано влияние галармина в трех различных концентрациях - 1, 5 и 10 мкг, которые наиболее эффективно зарекомендовали себя в экспериментах по протекторному действию при инфекции MRSA *in vivo* [3]. Результаты экспериментальных данных представлены в табл. 1а.

Как следует из табл.1, наиболее высокий показатель был отмечен при концентрации галармина 1 мкг, при этом наблюдалось увеличение лейкоцитов более чем на 80% по сравнению с контрольной группой. Концентрации галармина – 5 и 10 мкг существенного влияния на количество лейкоцитов не оказывали и приближали показатели к норме (стерильный контроль). При этом, под влиянием галармина происходит коррелированное с дозой увеличение процентного соотношения

лимфоцитов, достигающее своего максимума при концентрации 10 мкг. Количество эритроцитов, гемоглобина и эритроцитарных индексов практически не менялось. Наблюдалось увеличение количества тромбоцитов под влиянием галармина, наибольшее их содержание наблюдалось при концентрации 1 мкг ($888 \times 10^3/\text{мм}^3$), т.е. происходило более чем двукратное увеличение их количества по сравнению с контролем.

Далее было проведено исследование влияния Галармина в концентрации 5 мкг на клинические параметры крови зараженных животных. Эксперимент включал также исследование воздействия Галармина в данной концентрации на клиническую картину крови интактных животных. Результаты исследования представлены на табл. 2.

Таблица 2. Клинический анализ крови животных в экспериментальных (зараженных MRSA) и контрольных группах под воздействием галармина в концентрации 5 мкг

Параметр	Контроль		Экспериментальные группы	
	1. Негативный	2. Позитивный	3. Галармин 5 мкг (MRSA)	4. Галармин 5 мкг (стериль)
WBC $10^3/\text{мм}^3$	3.6±0.54	4.5±0.67	3.8±0.45	8.3±0.56*
LYM %	40.9±11.34	29.7±8.67	38.9±10.34	59.6±12.11
MON %	6.2±3.08	6.2±2.98	5.2±3.01	5.9±2.80
GRA %	52.9±12.56	64.1±12.78	55.9±11.98	34.5±9.87
EOS %	11.4±3.75	7.2±2.56	7.3±2.86	2.5±1.25
LYM # $10^3/\text{мм}^3$	2.30±0.76	1.30±0.53	1.40±0.87	4.90±1.24
MON # $10^3/\text{мм}^3$	0.30±0.06	0.20±0.05	0.10±0.06	0.40±0.07
GRA # $10^3/\text{мм}^3$	3.10±1.34	3.00±1.21	2.30±1.00	3.00±1.67
EOS # $10^3/\text{мм}^3$	0.64±0.01	0.32±0.01	0.28±0.03	0.20±0.01
RBC $10^6/\text{мм}^3$	9.42±0.134	8.22±0.145	8.84±0.122	9.57±0.135
HGB г/дл	15.3±0.65	13.8±0.56	14.4±0.46	16.0±0.78
HCT %	43.9±2.56*	39.8±3.56	40.9±3.90	48.0±4.01*
MCV $\mu\text{м}^3$	47±2.45	48±3.78*	46±4.87	50±6.34
MCH пг	16.3±0.89	16.8±0.99	16.3±1.00	16.7±2.56
MCHC г/дл	34.9±1.45	34.6±1.88	35.1±2.05	33.4±2.67
RDW %	16.6±1.76	17.8±1.89	16.0±1.88	17.2±1.90
PLT $10^3/\text{мм}^3$	401±31.45	230±28.80	651±56.90	421±47.00
MPV $\mu\text{м}^3$	14.3±0.56	15.8±0.78	10.2±0.10	12.0±0.56

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Из табл. 2 следует, что под воздействием галармина увеличивается относительное (%) содержание лимфоцитов как при инфекции (на 9.2%) так и в стерильных группах (на 18.7%). Увеличение абсолютного числа лейкоцитов под воздействием галармина было отмечено только при отсутствии инфекции, при этом количество белых кровяных телец возрастало на 48%. При инфекции же количество лейкоцитов в группе, получавших галармин, приближалось к показателям негативного контроля. Под воздействием галармина при отсутствии инфекции наблюдалось также понижение процентного соотношения циркулирующих гранулоцитов, эозинофилов, однако при инфекции существенной разницы между этими параметрами не наблюдалось. Анализ эритроцитов и их параметров не выявил существенных различий между группами, получавшими галармин, и контролем. Абсолютное содержание тромбоцитов резко увеличивалось под воздействием галармина при наличии инфекции. При этом под воздействием галармина отмечалось некоторое снижение параметра MPV по сравнению с негативным и позитивным контролем. Полученные результаты обобщены на рис. 1 и 2.

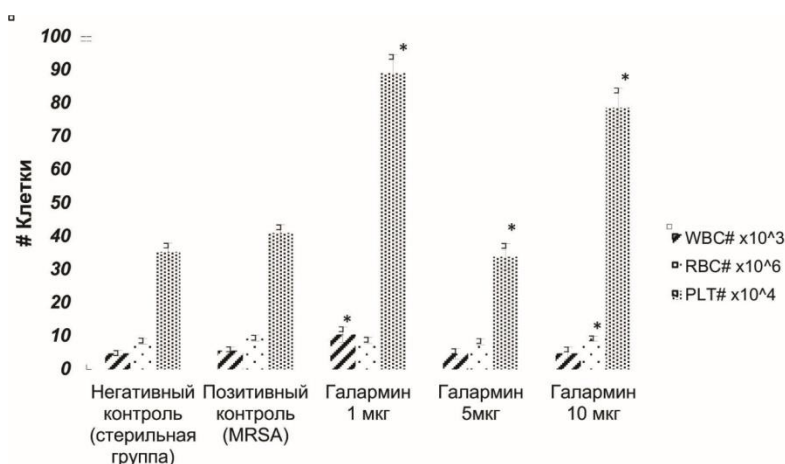


Рис. 1. Количественные показатели лейкоцитов WBC ($10^3/\text{мм}^3$), лимфоцитов LYM (%), эритроцитов RBC ($10^6/\text{мм}^3$) и тромбоцитов PLT ($10^4/\text{мм}^3$) через 96 ч после заражения MRSA под влиянием галармина введенного, за 24 ч до заражения в концентрациях 1, 5 и 10 мкг

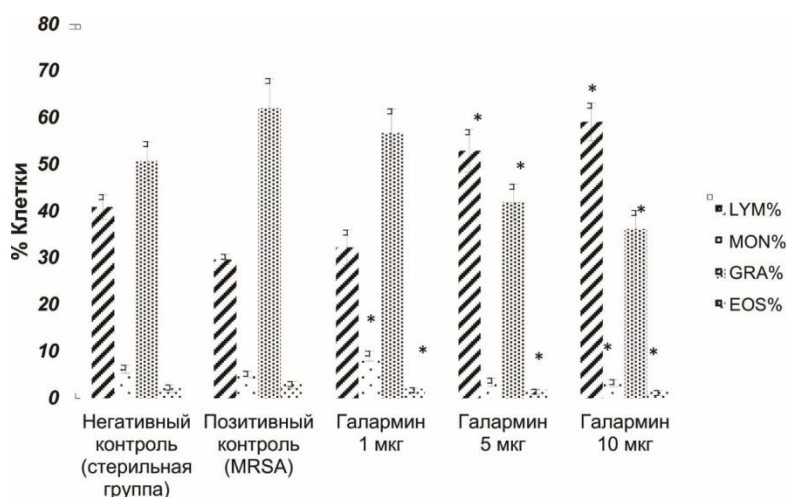


Рис. 2. Процентные показатели лимфоцитов (LYM%), моноцитов (MON%), гранулоцитов (GRA%) и эозинофилов (EOS%) через 96 ч после заражения под влиянием галармина в концентрациях 1, 5 и 10 мкг/мышь, введенного за 24 ч до заражения

Таким образом обнаружено, что галармин существенно увеличивает относительное (%) и абсолютное содержание лимфоцитов как в интактной группе, так и при заражении. Полученные данные свидетельствуют о комплексном, специфическом влиянии галармина на иммунную и кроветворную систему.

Нейропептиды галармин и аналоги являются потенциальными лекарственными соединениями для лечения гематопоетических болезней (лейкозы, лейкемии, лимфома, миелома, нейropении различного происхождения), а также болезни Альцгеймера, алюминоза и т.д., что вызывает общебиологический интерес выяснить молекулярные и генетические механизмы этих цитокинов.

Из фундаментальных механизмов действия галармина на указанные патологии можно отметить антиоксидантное влияние, способность поглощать активные радикалы и ряд других свойств. Другой вероятный путь реализации антибактериальных свойств галармина, его активность по стимулированию миелопоэза и резкого увеличения сегментоядерных нейтрофилов, ответственных за фагоцитоз, что было показано при исследовании лечения лейкоза коров галармином, а также на фоне циклофосфамидиндуцированной лейкоцитопении, вызванной *P. aeruginosa*.

В данном исследовании было выявлено, что под влиянием галармина происходит перераспределение форменных элементов крови, изменение абсолютного количества лейкоцитов и тромбоцитов, а также коррелированное с дозой увеличения процентного содержания лимфоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Aprikyan V.S., Galoyan A.A.* Hypothalamic polypeptide protects mice from lethal challenge with gram-negative bacteria // *Neurokhimiya RAS & NAS RA*, 17, p. 60-63, 2000.
2. *Cauda R., Garau J.* New insights concerning methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease. *Clin. Microbiol. Infect.*, 15, 2, p. 109-111, 2009.
3. *Durgaryan A.A., Matevosyan M.B., Seferyan T.Ye., Sargsyan M.A., Grigoryan S.L., Galoian K.A and Galoyan A.A.* The protective and immunomodulatory effects of hypothalamic proline rich polypeptide galarmin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in mice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 31, 9, p. 2153-2165, 2012.
4. *Furuya E.Y., Lowy F.D.* *Nat Rev Microbiol.* 4, 1, p. 36-45, 2006.
5. *Galoyan A.A.* Biochemistry of Novel Cardioactive Hormones and Immunomodulators of the Functional System Neurosecretory Hypothalamus. *Endocrine Heart. Nauka Publ., Moscow*, p. 240, 1997.
6. *Galoyan A.A.* Brain Neurosecretory Cytokines: Immune Response and Neuronal Survival. *Kluwer Academic. Plenum Publishers, New York*, p.188, 2004.
7. *Galoyan A.A.* Neurochemistry of Brain Neuroendocrine Immune System: Signal Molecules. *Neurochemical Research*, 25, 9, p.1343-1355, 2000.
8. *Galoyan A.A.* The brain immune system: Chemistry and biology of the signal molecules. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology, Neuroimmunology*, p.155-195., 2008.
9. *Lode, H.M.* *Clin. Microbiol. Infect.* 15, 3, p. 212-217, 2009.
10. *Lowy F.D.* Antimicrobial resistance: The example of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.*, 111, 9, p.1265-1273, 2003.
11. *Markossian K.A, Gurvitz B.Ya and Galoyan A.A.* Isolation and chemical identification of new peptides from neurosecretory granules of hypothalamus. *Neurokhimiya*, 16,1, p.22-25, 1999.

Поступила 07.04.2022