



ПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ БОГАТЫХ ПРОЛИНОМ ПОЛИПЕПТИДОВ - ГАЛАРМИНА И ЕГО АНАЛОГА D-15 ГАЛАРМИНА ПРИ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОЙ СТАФИЛОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ МЕТИЦИЛЛИН-РЕЗИСТЕНТНЫМ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* В УСЛОВИЯХ *IN VIVO*

**А.А. ДУРГАРЯН, М.Б. МАТЕВОСЯН, Т.Е. СЕФЕРЯН,
М.А. САРГСЯН, С.Л. ГРИГОРЯН, А.А. ГАЛОЯН**

Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА

В работе обобщены результаты исследований протекторного влияния богатых пролином полипептидов - галармина и его аналога d-15 галармина на генерализованную стафилококковую инфекцию, вызванную метициллин-резистентным *S. aureus* (MRSA) в условиях *in vivo*. Было показано, что эти препараты являются эффективными средствами при инфекции, вызванной MRSA.

*Богатые пролином полипептиды – галармин – d-15 галармин –
MRSA – выживаемость*

Աշխատանքում ներկայացված են պրոլինով հարուստ պոլիպեպտիդներ՝ գալարմինի և նրա նմանակ d-15 գալարմինի պաշտպանիչ ազդեցության ուսումնասիրության արդյունքները մեթիցիլին-կայուն *S. aureus*-ի (MRSA) կողմից հարուցված ստաֆիլոկոկային ընդհանրացված ինֆեկցիայի դեպքում *in vivo* պայմաններում: Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս, որ այդ պրեպարատները հանդիսանում են արդյունավետ միջոցներ MRSA-ով պայմանավորված ինֆեկցիայի դեպքում:

*Պրոլինով հարուստ պոլիպեպտիդներ – գալարմին – d-15 գալարմին –
MRSA – կենսունակություն*

Data on protective effect of hypothalamic proline rich polypeptides during generalized *Staphylococcus aureus* infection induced by methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) *in vivo* were summarized. Received results indicate that galarmin and its analogue d-15 galarmin appear to be effective remedies against MRSA infection.

Proline rich polypeptides – galarmin – d-15 galarmin – MRSA – survival

Новейшие эпидемиологические данные свидетельствуют о том, что золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) и в особенности его метициллин-устойчивые штаммы (MRSA), ответственны за большинство тяжелых случаев внутри- и внебольничных стафилококковых инфекций. Штаммы MRSA проявляют неспецифическую резистентность к основным классам антибиотиков и существенно ограничивают возможности антимикробной терапии [3]. В сложившихся условиях необходимость нового подхода к терапии инфекций, вызванных золотистым стафилококком, становится все более актуальной.

Богатые пролином полипептиды (ПБП), продуцируемые нейросекреторными клетками гипоталамуса, являются регуляторами гуморального и клеточного иммунитета, миелопоэза, дифференциации тимоцитов, факторов активации макрофагов [5,6]. Относящийся к группе ПБП нейроиммунотропный PRP-1 (галармин) состоит из 15 аминокислотных остатков со следующей первичной структурой: AGAPERAEPAQPGVY [7]. Исследования показали, что он обладает антибактериальными свойствами против возбудителей ряда особо опасных инфекций в условиях *in vivo* (*Bacillus anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Clostridium perfringens* и т.д.) [8]. Ранее нами была показана высокая протекторная активность препаратов галармина и Gx-NH₂ при инфекции MRSA, повышающих выживаемость зараженных животных (линейные мыши C57Black) на 30-40% по сравнению с контрольной группой [1]. Однако возникла необходимость дальнейшего исследования полученных позитивных эффектов галармина и его аналогов о протекторном влиянии при инфекции MRSA, с использованием различных доз и схем применений ПБП на септической модели *in vivo*.

Целью данной работы являлось комплексное исследование антистафилококковой активности галармина и его аналога d-15 галармина при генерализованной стафилококковой инфекции, вызванной штаммом MRSA, на белых лабораторных мышах в условиях *in vivo*.

Материал и методика. В каждой экспериментальной группе использовалось по 10 лабораторных белых мышей массой 20-25 г. Были определены процентные показатели выживаемости и смертности мышей при генерализованной стафилококковой инфекции, вызванной MRSA под воздействием галармина и его аналога d-15 галармина в различных концентрациях и времени применения в сравнении с контрольной группой. Для заражения мышей был применен изолированный нами изолят MRSA, выделенный при бактериемии от пациента травматологического стационара. Идентификация принадлежности штамма к *S. aureus* проводилась согласно характерным биохимическим свойствам данного штамма. Ориентировочные данные о принадлежности культуры к виду определялись при изучении характера колоний, выросших после посева исходного материала на селективную среду стафилококков - желточно-солевой агар (ЖСА). Основой среды являлся 1,8%-ный питательный агар, содержащий 7,5 г NaCl на 100 мл среды. К 200 мл растопленного и охлажденного до 50°C агара добавляли желточную смесь, состоящую из 2 мл яичного желтка. Готовая среда содержала примерно 1% яичного желтка. Элективность этой среды состояла в том, что NaCl подавлял рост большинства представителей другой микрофлоры, главным образом грамотрицательной, а добавленный яичный желток позволял выявлять лецитиназную активность, которая являлась одним из показателей патогенности стафилококков. Дальнейшая дифференциация штаммов *S. aureus* от представителей двух коагулазоотрицательных видов стафилококка *S. epidermidis* или *S. saprophyticus* проводилась с помощью выявления коагулазной активности на средах с цельной кровью кролика и способности ферментировать маннит в анаэробных условиях, что характерно для коагулазоотрицательных культур. При наличии положительного результата в реакции плазмокоагуляции хотя бы в одном из двух предварительных тестов (лецитиназа, отсутствие ферментации маннита) исследуемый штамм относился к виду *S. aureus* [1]. Метициллинорезистентность штамма выявлялась методом скрининга на селективной среде ЖСА с добавлением антибиотиков, резистентность к тестируемым антибиотикам (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, India) выявлялась путем определения минимальной ингибирующей концентрации (MIC₅₀ и MIC₉₀), согласно общепринятым клиническим стандартам [4]. Данный штамм депонирован в коллекции культур на кафедре эпизоотологии и паразитологии Государственного аграрного университета Армении.

При количественном определении доз бактериальной культуры с целью последующей титрации на животных для выявления LD₅₀, была установлена корреляция между показателями оптической плотности (ОП) культуры измерением на оптическом фотоэлектроколориметре (КФК-2) при длине волны 540 нм и ростом колоний-посевов на чашках Петри. С этой целью использовали смыв с косяка бактериальной культуры либо колонии

ресуспензированных в физиологическом растворе (физ. раствор) непосредственно с чашки Петри. С исходной взвеси производились поочередные разведения, определялась ОП для каждой из них, затем производился посев на твердые агаровые среды в разведении от 10^{-6} до 10^{-8} . Подсчет колоний образующих единиц (КОЕ) производился визуально на следующий день после инкубации в термостате при 37°C . На основе подсчета КОЕ производился подсчет микробных единиц в исходной культуре (логарифм посева).

Для определения сублетальных и летальных доз MRSA на белых мышах использовался смыв 18-часовой агаровой культуры стафилококка, выращенной на плотной элективной среде ЖСА. Культура для заражения готовилась путем ресуспензии колоний стафилококка с агаровой среды в стерильном физиологическом растворе. Дозу для заражения выявляли путем определения ОП используемой взвеси. Заражение производилось внутривентриально (в/б) в 0,2 мл объеме физ. раствора.

Галармин и его аналог d-15 галармин вводились внутримышечно (в/м) в объеме 0,2 мл физ. раствора в различных дозах и времени введения препаратов. В контрольной группе мышам вводился в равном объеме физ. раствор. Галармин применяли в концентрациях 0,1; 1; 5 и 10 мг/мышь с введением за 24 ч, параллельно и 1 ч после заражения. Аналог d-15 галармин применялся в концентрации 16 мг за 24, 8 и 5 ч до заражения. Концентрации препаратов были выбраны исходя из ранее полученных результатов по их эффективности против грамположительных возбудителей сибирской язвы (*Bacillus anthracis*) и MRSA в условиях *in vivo* [1,8].

Препараты разводились непосредственно перед применением на животных и были заранее протестированы на возможные следы заражения единицами эндотоксина (липополисахаридно-протеиновые комплексы ЛПС наружных мембран грамотрицательных бактерий) методом *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL). LAL-реактив представляет собой лиофильно высушенный препарат водного лизата амебоцитов и является чувствительным методом обнаружения следов ЛПС [4].

Выживаемость животных учитывалась в течение 9-ти дней после постановки эксперимента. На 9-й день эксперимента все выжившие мыши усыплялись и производился посев из крови сердца животных на элективные среды ЖСА с целью выявления колоний MRSA.

Результаты и обсуждение. По результатам ферментативных свойств исследуемого штамма было выявлено, что он относится к *S. aureus*, с выраженными реакциями плазмокоагуляции, лецитиназной активности и отсутствием ферментации маннита в анаэробных условиях. Было установлено, что исследуемый штамм проявляет устойчивость к хлорамфениколу, эритромицину, пенициллину, цефалоспорином, чувствителен к ампициллину, канамицину и тетрациклину и по своим морфобиохимическим характеристикам является MRSA.

Результаты LAL-теста на возможное присутствие следов эндотоксинов дали отрицательные показатели для всех тестируемых пептидов, выявив таким образом их абсолютную стерильность.

В табл. 1 приведены суммарные данные дозо-зависимости выживаемости зараженных белых мышей от концентраций бактериальной культуры MRSA.

Таким образом, было выявлено, что LD_{50} соответствует дозам бактерий 800 млн-1,2 млрд. КОЕ/мл (ОП 0,6-0,8), минимальная летальная концентрация между 1,5-1,9 млрд. КОЕ/мл, которые соответствуют показателям ОП 1-1,2. Для последующих экспериментов было решено использовать летальную дозу бактерий соответствующую 1,9 млрд. КОЕ/мл.

В табл. 2 представлены результаты протекторной активности галармина, введенного в/м за 24 ч до заражения в концентрациях 0,1; 1; 5 и 10 мг/мышь.

Результаты применения галармина параллельно с заражением в тех же концентрациях представлены в табл. 3.

Была исследована также протекторная активность галармина в указанных концентрациях 1 ч. спустя после заражения (табл.4).

Таблица 1. Результаты титрования по выявлению сублетальных и летальных доз MRSA

№ группы (по 10 мышей)	ОП	Доза MRSA КОЕ/мл	Число погибших животных по дням									Выживе- мость, %	Смерт- ность, %
			1	2	3	4	5	6	7	8	9		
1	0,2	$4,1 \times 10^8$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	0
2	0,4	$5,1 \times 10^8$	-	1	-	-	1	-	-	-	-	80	20
3	0,6	8×10^8	2	1	1	1	-	-	-	-	-	50	50
4	0,8	$1,2 \times 10^9$	1	3	1	1	-	-	-	-	-	40	60
5	1	$1,5 \times 10^9$	3	3	1	1	-	-	-	-	-	20	80
6	1,2	$1,9 \times 10^9$	3	4	2	1	-	-	-	-	-	0	100

Таблица 2. Протекторный эффект галармина при генерализованной инфекции MRSA введенного за 24 ч до заражения

№ группы (по 10 мышей)	Доза препарата мкг/мышь	Число погибших животных по дням									Выживаемость, %	Смертность, %	Рост MRSA с по- сегов из сердца
		1	2	3	4	5	6	7	8	9			
1	Контроль	2	4	2	1	1	-	-	-	-	0	100	+
2	0,1	-	-	-	-	1	1	2	-	-	60	40	+
3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	0	+
4	5	-	-	-	-	-	2	1	2	-	50	50	+
5	10	-	-	-	-	1	2	1	1	-	50	50	+

Таблица 3. Протекторный эффект галармина при генерализованной инфекции MRSA введенного параллельно с заражением

№ группы (по 10 мышей)	Доза препарата мкг/мышь	Число погибших животных по дням									Выживаемость, %	Смертность, %	Рост MRSA с по- сегов из сердца
		1	2	3	4	5	6	7	8	9			
1	Контроль	2	3	1	2	1	-	1	-	-	0	100	+
2	0,1	-	-	-	-	1	1	2	1	-	50	50	+
3	1	-	-	-	1	1	3	2	-	-	30	70	+
4	5	-	-	-	-	1	1	2	-	-	60	40	-
5	10	-	-	-	1	-	2	1	1	-	50	50	-

Как видно из полученных данных, галармин введенный за 24 ч до заражения, обладал выраженной профилактической активностью и существенно повышал выживаемость зараженных животных. Наиболее эффективной оказалась доза препарата 1мкг, повышающая выживаемость на 100% по сравнению с контрольной группой. Другие исследуемые концентрации также проявили высокую профилактическую активность, обеспечивая повышение выживаемости на 50-60%.

Таблица 4. Протекторный эффект галармина при генерализованной инфекции MRSA введенного спустя 1 ч после заражения

№ группы (по 10 мышей)	Доза препарата мкг/мышь	Число погибших животных по дням									Выживаемость, %	Смертность, %	Рост MRSA с посевов из сердца
		1	2	3	4	5	6	7	8	9			
1	Контроль	4	2	-	1	2	1	-	-	-	0	100	+
2	0,1	-	-	-	1	1	1	2	1	-	40	60	+
3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	0	+
4	5	-	-	1	-	2	1	1	2	-	30	70	+
5	10	-	-	-	1	3	2	2	1	-	10	90	+

При параллельном введении галармина наиболее эффективной оказались концентрации 5 и 10 мкг, повышающие выживаемость животных соответственно на 60 и 50%.

Следует отметить, что в посевах мазков крови животных данных групп не было обнаружено роста MRSA. Концентрация галармина 0,1 мкг также оказалась эффективной, повышая выживаемость на 50%, однако в посевах крови был выявлен рост колоний MRSA. Доза препарата 1 мкг, введенная параллельно с заражением, оказалась малоэффективной (30%). При введении галармина спустя 1 ч после заражения наиболее эффективной явилась концентрация препарата 1мкг (выживаемость 100%), дозы 0,1 мкг и 5 мкг существенно уступали по эффективности (соответственно 40 и 30%). Доза галармина 10 мкг при введении после заражения оказалась неэффективной, не оказывала протекторного действия.

В табл. 5 представлены результаты исследования протекторной активности аналога d-15 галармина в концентрации 16 мкг при введении за 24, 8 и 5 ч до заражения.

Таблица 5. Протекторный эффект d-15 галармина при генерализованной инфекции MRSA

№ группы (по 10 мышей)	Доза препарата мкг/мышь	Число погибших животных по дням									Выживаемость, %	Смертность, %	Рост MRSA с посевов из сердца
		1	2	3	4	5	6	7	8	9			
1	Контроль	2	2	3	3	1	1	-	-	-	0	100	+
2	16 мкг за 24ч	-	-	-	-	2	1	3	-	-	40	60	+
3	16 мкг за 8ч	-	-	-	-	-	2	-	-	-	80	20	+
4	16 мкг за 5ч	-	-	-	2	3	1	1	-	-	30	70	+

Из табл. 5 следует, что наиболее высокий показатель выживаемости был в группе с инъекцией d-15 галармина за 8 ч до заражения (выживаемость 80%), наименьший – за 5 ч до заражения (30%). Введение препарата за 24 ч повышало выживаемость на 40%.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что богатые пролином нейроиммунотропные гипоталамуса галармин и его аналог d-15 галармин являются эффективными средствами при инфекции, вызванной MRSA в

условиях *in vivo*. Применение пептидов значительно продлевало выживаемость зараженных животных по сравнению с контрольной группой. Однако следует отметить, что наряду с повышением выживаемости, был обнаружен рост колоний MRSA из посевов крови сердца зараженных мышей на элективные среды ЖСА. Исключение составляло параллельное введение галармина в дозах 5 и 10 мкг, при котором наблюдалась элиминация бактерий MRSA из крови зараженных животных. Очевидно, что протекторный эффект галармина и его аналога d-15 галармина обусловлен комплексным, модулирующим влиянием на иммунную систему, позволяющую организму лучше приспосабливаться и противостоять инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дургарян А.А., Дмитренко О.А., Матевосян М.Б. и Галоян А.А. Протективная активность богатых пролином полипептидов при генерализованной стафилококковой инфекции, вызванной метициллин-резистентным *Staphylococcus aureus*. Докл. НАН РА, 10, 1, с. 284-289, 2010.
2. Стафилококковые инфекции: российский сб. науч. тр. - С.-П., 1991.
3. Cauda R., Garau J. New insights concerning methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease. Clin. Microbiol. Infect., 15, 2, p. 109-111, 2009.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard (M7-A7). 7th edn. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006.
5. Galoyan A.A. Brain Neurosecretory Cytokines: Immune Response and Neuronal Survival. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 188 pages, 2004.
6. Galoyan A.A. In: Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology, Neuroimmunology 3-rd Edition (Lajtha, A., Galoyan, A. and Besedovsky, H. eds), Springer Science + Business Media. p.155-195, 2008.
7. Galoyan A.A. Neurochemistry of brain neuroendocrine immune system: signal molecules. Neurochem. Res., 25, p. 1343-1355, 2000.
8. Galoyan, A.A., Grigoryan, S.L., Badalyan, K.V. Treatment and prophylaxis of anthrax by new neurosecretory cytokines. Neurochem Res., 31, p. 795-803, 2006.
9. US Food and Drug Administration. Guideline on Validation of the Limulus Amebocyte Lysate test as an End-Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices, 1987.

Поступила 26.01.2011