

УДК 577.15.27 277:612.8.015

А. А. Дургарян¹, О. А. Дмитренко², М. М. Матевосян¹,
академик А. А. Галоян¹

**Протекторная активность богатых пролином полипептидов при
генерализованной стафилококковой инфекции, вызванной
метициллин-резистентным *Staphylococcus aureus***

(Представлено 7/IV 2010)

Ключевые слова: *MRSA*, богатые пролином полипептиды, галармин, $Gx-NH_2$, протекция

Введение. Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) за последние десять лет превратился в одну из основных угроз здравоохранению во многих странах мира. Способность микроорганизма приобретать устойчивость практически ко всем вновь вводимым в лечебную практику антибиотикам существенно ограничивает возможности антимикробной терапии и затрудняет эффективное лечение стафилококковых заболеваний. Последние эпидемиологические данные показывают, что *S. aureus* и в особенности его метициллин-резистентные варианты (*MRSA*) ответственны за большинство тяжелых случаев внутри- и внебольничных стафилококковых инфекций [1-4]. В сложившихся условиях необходимость нового подхода к терапии инфекций, вызванных золотистым стафилококком, становится все более актуальной. Несомненно, что одним из таких подходов может явиться поиск препаратов для лечения стафилококковых инфекций среди соединений, стимулирующих факторы естественной резистентности макроорганизма.

Открытые академиком А. Галояном богатые пролином пептиды (PRPs), выделенные из нейросекреторных ядер гипоталамуса, представляют новую семью гипоталамических нейропептидов. Эти пептиды синтезируются в форме общего белка-предшественника (нейрофизин-вазопрессин ассоциированного гликопротеина) и генетически детерминированно разделяются

протеолизом во время аксонального транспорта. Обнаружено, что PRP₅ обладают широким спектром биологической активности, включая иммуномодулирующие и нейропротективные свойства, и могут являться регуляторами гуморального и клеточного иммунитета, миелопоэза, дифференциации тимоцитов [5-8]. Показано, что один из этих пептидов — галармин (PRP-1), обладает свойствами цитокина и стимулирует антиген-представляющую функцию макрофагов, продукцию этими клетками фактора некроза опухолей (TNF- α) и секрецию интерлейкинов (IL-1 и IL-6) астроцитами [9-12].

В условиях *in vivo* выявлена высокая биологическая активность PRP-1 против ряда инфекций, вызванных грамотрицательными микроорганизмами, в том числе *Salmonella typhimurium*, *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* [8]. Однако их действие на инфекционный процесс, вызванный грамположительными микроорганизмами, изучено еще недостаточно. Установлено, что при заражении экспериментальных животных эпизоотическим штаммом сибирской язвы одновременное введение PRP-1 способствует быстрой элиминации *Bacillus anthracis* из всех пораженных органов [13]. Показана элиминирующая активность PRP-1 к некоторым штаммам *S. aureus* и *Streptococcus pneumoniae*. Полученные результаты позволили предположить, что новые выделенные цитокины мозга могут оказаться эффективными при заражении бактериями, резистентными к антибиотикам, и, в частности, метициллин-резистентными штаммами *S. aureus*.

Целью проведенных исследований было изучение антистафилококковой активности PRP-1 и производного аналога Gx-NH₂ на модели септической инфекции, вызванной MRSA, в организме экспериментальных животных.

Материалы и методы. *Бактериальный штамм.* Для заражения мышей линии C57Black использован клинический изолят MRSA, выделенный при бактериемии от пациента травматологического стационара. Изолят принадлежал к российскому эпидемическому штамму EMRSA-2, имел следующие молекулярно-генетические характеристики: *coa* тип 5, *spa* тип t008 и нес композитную стафилококковую хромосомную кассету *SCCmec* (*ccr1*⁺, *ccr2*¹, комплекс *mec* тип B), гены энтеротоксинов SEA (*sea*) и SEC (*sec*). Помимо бета-лактамов антибиотиков штамм проявлял устойчивость к макролидам и хлорамфениколу и являлся продуцентом альфа-токсина.

Препараты. Используются богатые пролином пептиды: PRP-1 и его амидированный аналог Gx-NH₂ [14]. PRP-1, состоящий из 15 аминокислотных остатков, имеет следующую первичную структуру: Ala-Gly-Ala-Pro-Glu-Pro-Ala-Glu-Pro-Ala-Gln-Pro-Gly-Val-Tyr (AGAPEPAEPAQPGVY). Открытый проф А. Галояном Gx-NH₂ состоит из 10 аминокислотных остатков — APEPAEPAQP,

последний пролин амидирован (см.: А. А. Галоян, патент N1951 A2, N AM 20060142 (Армения)).

Заражение мышей и введение препаратов. Для заражения мышей использовали смыв 18-часовой агаровой культуры стафилококка в физиологическом растворе. Микробную взвесь в объеме 0.2 мл вводили внутрибрюшинно. PRP-1 и Gx-NH₂ вводились внутримышечно в объеме 0.2 мл в различные сроки до и после заражения. Мыши находились под наблюдением в течение недели. Гибель животных учитывали через 24, 48, 120, 144 ч после заражения.

Результаты. В первой серии экспериментов изучали активность различных доз препаратов. Опыты проводились на 42 мышах, которые были разделены на три группы: 1) мыши, получавшие инъекции Gx-NH₂ перед заражением, 10 шт.; 2) мыши, получавшие инъекции PRP-1 перед заражением, 22 шт.; 3) контрольные животные, которым вводился физ.раствор, 10 шт.

PRP-1 и Gx-NH₂ были введены в концентрации 1 мкг/мышь за 24 ч до заражения и повторно непосредственно после заражения в той же концентрации. Заражающая доза составила 8×10^8 микробных клеток/мышь. Результаты опыта представлены в табл. 1.

Таблица 1

Выявление протективного действия препаратов PRP-1 и Gx-NH₂ на выживаемость лабораторных животных

Группа	Доза/ мышь	Число зараженных животных	Число погибших животных через				Число выживших животных, %
			24ч	48ч	120ч	144ч	
Gx-NH ₂	8×10^8	10	4	0	0	1	5 (50)
PRP-1	8×10^8	22	15	2	0	0	17 (23)
Контроль	8×10^8	10	3	4	1	0	2 (20)

Как видно из представленных в таблице данных, препарат Gx-NH₂ оказывал существенный протективный эффект, снижая смертность животных более чем в 2 раза по сравнению с контролем. Доза препарата PRP-1 1 мкг/мышь, введенная за сутки и непосредственно перед заражением, оказалась завышенной и не показала защитного действия.

Следующая серия экспериментов была поставлена с использованием PRP-1 в значительно меньших дозах и с иной схемой введения препарата. PRP-1 вводили в концентрации 10 и 100 нг/мышь. Препарат в концентрации 100 нг вводился внутримышечно (в/м) за 5 дней до заражения однократно. Для изучения действия PRP-1 в концентрации 10 нг использовали две подопытные

группы мышей, одной из которых препарат вводился однократно за 5 суток до заражения, второй – непосредственно после заражения. Контрольной группе вводился физ. раствор за 5 суток до заражения. Были сформированы три экспериментальные группы по пять мышей и контрольная группа, в которую включили 9 животных. Доза заражения составила 1.2×10^9 микробов/мышь. Результаты опыта представлены в табл. 2.

Из таблицы видно, что PRP-1 в дозах 10 и 100 нг, введенный за 5 суток до заражения, не обладал протективным действием, а введенный за 24 ч до заражения в дозе 10 нг/мышь оказывал выраженный протективный эффект, обеспечив 100% -ную выживаемость животных.

Таблица 2

Выявление протективного действия PRP-1 в зависимости от дозы и срока введения препарата

Группа и дозировка	Доза/мышь	Число зараженных животных	Число погибших животных через				Число выживших животных, %
			24ч	48ч	120ч	144ч	
1. PRP-1 100 нг за 5 дней	1.2×10^9	5	0	1	0	1	3 (60)
2. PRP-1 10 нг за 5 дней	1.2×10^9	5	1	1	1	-	2 (40)
3. PRP-1 10 нг за 24 ч	1.2×10^9	5	0	0	0	0	5(100)
4. Контроль	1.2×10^9	9	0	2	0	1	6 (66)

Выводы. Полученные результаты указывают на протективные возможности препаратов PRP-1 и его аналога Gx-NH₂ в отношении генерализованного инфекционного процесса, вызванного эпидемическим метициллин-резистентным штаммом *S. aureus*.

¹Институт биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА

²ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН

А. А. Дургарян, О. А. Дмитренко, М. М. Матевосян, академик А. А. Галоян

Протекторная активность богатых пролином полипептидов при генерализованной стафилококковой инфекции, вызванной метициллин-резистентным *Staphylococcus aureus*

Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*), и в частности метициллин-резистентный штамм *S. aureus*, несут ответственность за большинство случаев

осложнений стафилококковой этиологии. Богатые пролином полипептиды, в особенности PRP-1 (галармин) и его аналог Gx-NH₂, открытые академиком А.А. Галояном, являются эффективными средствами в случаях заражения бактериями, нечувствительными к антибиотикам, а именно, метициллин-резистентным штаммом S.aureus. Исследованы эффекты галармина и аналога Gx-NH₂ против инфекции, вызванной S.aureus.

Ա. Ա. Դուրգարյան, Օ. Ա. Դմիտրենկո, Մ. Մ. Մաթևոսյան,
ակադեմիկոս Ա. Ա. Գալոյան

Պրոլինով հարուստ պոլիպեպտիդների պաշտպանողական ակտիվությունը
ընդհանրացված ստաֆիլոկոկային ինֆեկցիայի ժամանակ, առաջացած
մեթիցիլին-կայուն Staphylococcus aureus-ի միջոցով

Staphylococcus aureus բակտերիան, հատկապես S.aureus-ի մեթիցիլին-կայուն (MSRA) տարբերակները պապասխանաբար են մեծ մասամբ ներքին և արտաքին ստաֆիլոկոկային ծանր դեպքերի ժամանակ: Ակադեմիկոս Ա.Գալոյանի կողմից հայտնաբերված պրոլինով հարուստ պոլիպեպտիդները, հատկապես ՊՀՊ-1 (գալարմինը) եւ նրա անալոգ Gx-NH₂, արդյունավետ դեղամիջոց են հակաբիոպիկների դեմ կայունություն ցուցաբերած բակտերիաներով վարակման դեպքում, մասնավորապես մեթիցիլին-կայուն S.aureus-ի շրամի ժամանակ: Ուսումնասիրվել է գալարմինի եւ Gx-NH₂ անալոգի ազդեցությունը Staphylococcus aureus-ի կողմից առաջացված ինֆեկցիայի ժամանակ:

A. A. Durgaryan, O. A. Dmitrenko, M. M. Matevosyan, academician A. A. Galoyan

Protectory Activity of Proline Rich Polypeptides at Generalized Staphylococcus
Infections Induced by Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus

S.aureus and particularly strains of methicillin-resistant S.aureus are responsible for the majority of complicated cases of intra- and extra diseased Staphylococcus infections. Proline rich polypeptides, namely PRP-1 (Galarmin) and its analogue Gx-NH₂ discovered by Academician A.A. Galoyan, are efficient at cases of being infected with bacteria resistant to antibiotics, namely to methicillin-resistant strains of S.aureus. The effects of Galarmin and its analogue Gx-NH₂ on Staphylococcus aureus infections have been studied.

Литература

1. Lowy F.D. - J. Clin. Invest. 2003. V. 111. N 9. P. 1265-1273.
2. Cauda R., Garau J. - Clin. Microbiol. Infect. 2009. V. 15. N 2. P. 109-111.

3. *Furuya E.Y., Lowy F.D.* - Nat Rev Microbiol. 2006. V. 4. N 1. P. 36-45.
4. *Lode H.M.* - Clin. Microbiol. Infect. 2009. V. 15. N 3. P. 212-217.
5. *Galoyan A.A.* In: Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology, v. Neuroimmunology 3rd Edition (Lajtha, A., Galoyan, A. and Besedovsky, H. eds), 2008, Springer Science+Business Media. P. 155-195.
6. *Galoyan A.A., Sarkissian J.S., Kipriyan T.K., Sarkissian E.J., Grigorian Y.Kh., Sulkhanyan R.M., Khachatrian T.S.* - Neurochem. Res. 2000. V. 25. P. 1567-1578.
7. *Aprikyan V.S., Galoyan K.A., Galoyan A.A.* - Neurokimiya. 1998. V. 15. P. 189-195.
8. *Aprikyan V.S., Galoyan K.A., Galoyan A.A.* - J. Neurochemistry. 1999. V. 77. Suppl. S68D.
9. *Galoyan A.A.* - Neurochem. Res. 2000. V. 25. P. 1343-1355.
10. *Galoyan A.A.* - Biochemistry of Novel Cardioactive Hormones and Immunomodulators of the Functional System Neurosecretory Hypothalamus. Endocrine Heart. Nauka Publ. 1997. 240 p.
11. *Markossian K.A., Gurvits B.Ya., Galoyan A.A.* - Neurochemistry (RAS & NAS RA) 1999. V. 16. N 1. P. 22-25.
12. *Galoyan A.A.* - Brain Neurosecretory Cytokines: Immune Response and Neuronal Survival. Kluwer Academic/Plenum Publishers. 2004. 188 p.
13. *Galoyan A.A., Grigoryan S.L., Badalyan K.V.* - Neurochem Res. 2006. V. 31. P. 795-803.
14. *Galoyan A.A.* - Proceedings of the International Scientific Conference dedicated to the 75th anniversary of YSMU. Yerevan. 2005. P. 135-136.