

УДК 577.15 27 277:612.8.015

А. А. Дургарян

Исследование прямого антибактериального воздействия галармина и его аналогов на грам-положительные и грам-отрицательные микроорганизмы в условиях *in vitro*

(Представлено академиком А.А. Галояном 29/XII 2010)

Ключевые слова: *богатые пролином полипептиды, грам-положительные и грам-отрицательные микроорганизмы, антибактериальный тест in vitro*

Введение. Для познания центральных нейрогуморальных механизмов регуляции всей иммунной системы, и в частности генеза, дифференциации, пролиферации и мобилизации клеток костного мозга в кровь большое значение имеют выявленные новые иммуномодуляторы мозга – богатые пролином полипептиды (ПБП), продуцируемые нейросекреторными клетками гипоталамуса и установление их химической структуры [1-5]. ПБП (галармин) состоящий из 15 аминокислотных остатков, имеет следующую первичную структуру: АГАРЕРАЕРАQPGVY. Открытый А. Галояном амидированный аналог Gx-NH₂ состоит из 10 аминокислотных остатков – АРЕРАЕРАQР, последний пролин амидирован [6].

Галармин обладает свойствами цитокина и стимулирует антиген-представляющую функцию макрофагов, продукцию этими клетками фактора некроза опухолей (TNF-α), секрецию интерлейкинов (IL-1 и IL-6) астроцитами и является регулятором гуморального и клеточного иммунитета, миелопоэза, дифференциации тимоцитов [7-9]. Галармин оказывает неспецифическое влияние на самые различные, в том числе особо опасные инфекции (*Bacillus anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Clostridium perfringens*) [10].

Метициллин-резистентные штаммы *Staphylococcus aureus* (MRSA) ответственны за большинство тяжелых случаев внутри- и внебольничных стафилококковых инфекций, и проявляют неспецифическую резистентность

к основным классам антибиотиков [11]. Нами показана высокая протекторная активность галармина и Gx-NH₂ на модели септической инфекции, вызванной MRSA, с повышением выживаемости зараженных животных (линейные мыши C57Black) на 30-40% по сравнению с контрольной группой [12].

В настоящей статье исследовано прямое антибактериальное воздействие галармина и его аналогов на различные грам-положительные и грам-отрицательные бактерии, в том числе MRSA, в условиях *in vitro*, с целью получить ответ на вопрос: обладают ли ПБП прямым антибактериальным воздействием в условиях *in vitro* или их протекторный эффект обусловлен иммуномодулирующими свойствами. Работы проводились в лаборатории "Биогенез пептидных сигналов" (BIOSIPE), Университет Пьер и Мари Кюри (ER3, UPMC, Париж, Франция), при содействии проф. Али Ладрама, которому автор выражает свою благодарность.

Материалы и методы. Прямая антибактериальная активность галармина и его аналогов (Gx-NH₂, dGx-NH₂ и d-15 галармин) исследовалась методом антимикробного теста согласно стандартам CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006) на охарактеризованных штаммах грам-положительных: *B. megaterium*, *S. aureus* (ATCC 25923), MRSA (ATCC BAA-44), MRSA (ATCC 43300), а также грам-отрицательных: *E. Coli* (ATCC 25922) и *P. Aeruginosa* (ATCC 27853) бактериях. Все исследуемые штаммы являлись зарегистрированными изолятами (LGC Standarts). Перед началом экспериментов гомогенность всех исследуемых пептидов была протестирована на обращенно-фазной HPLC (Breeze) при длине волны поглощения 220 и 280 нм. С этой целью 10 мл пептидного раствора вместе с 100 мл 0,1% раствора TFA (3-флюороуксусная кислота) вводилось в анализатор. Пептиды были проанализированы также на возможные следы заражения единицами эндотоксина (липополисахаридно-протеиновые комплексы наружных мембран грам-отрицательных бактерий) методом *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) (стандарт: 1987 US FDA LAL test). LAL-реактив представляет из себя лиофильно высушенный препарат водного экстракта (лизата) амебоцитов. При наличии эндотоксина LAL-реактив приобретает желтый цвет. Концентрацию эндотоксина определяли по скорости роста оптической плотности.

Микробы выращивали на стандартной жидкой среде Лурия – Бергани (LB) (состав среды в расчете на 1 литр: триптон – 10 г, дрожжевой экстракт – 5 г, NaCl – 10 г) в течение 2-3 ч при 37°C, при скорости перемешивания 250 г/м. Микробная взвесь в логарифмической фазе роста разбавлялась в среде LB до плотности 10⁶ микробных клеток на мл. среды, которая определялась измерением оптической плотности (ОП) культуры на фотоэлектрокалориметре (SECOMAM) при длине волны 630 нм.

Антимикробный тест производился на пластиковых 96-луночных планшетах Eppendorf с ячейками объемом 100 мкл. С этой целью приготавливались растворы пептидов в концентрации от 400 до 3 μM в объеме 100 мкл. Исключение составлял пептид d-15 галармин, ввиду сравнительно большой молекулярной массы и низкой концентрации исходного апирогенного раствора начальная концентрация раствора являлась 200 μM . При постановке теста использовалось 50 $\mu\text{л}$ каждого из приготовленных растворов, конечная тестируемая концентрация пептидов составляла от 200 до 1,5 μM . Каждый тест включал негативный (физиологический раствор вместо пептида) и позитивный контроль (0,7% формальдегида), а также контроль стерильности (питательная среда без бактерий). В каждую лунку (ячейку) добавлялось 50 $\mu\text{л}$ питательной среды с бактериями и 50 $\mu\text{л}$ раствора пептидов либо негативный/позитивный контроль. После заполнения всех лунок планшет покрывался адгезивной воздухопроницаемой пленкой и помещался на 1ч при 4°C, затем инкубировался сутки при 37°C, при скорости перемешивания 150 г/м. Плотность бактериального роста определялась на следующий день путем определения ОП всех лунок при длине волны 630 нм оптическим анализатором (Asys UVM 340). Показатели ОП 0,2 и ниже свидетельствуют об отсутствии/ингибции бактериального роста; 0,3 и выше – о присутствии роста бактерий, количество которых пропорционально показателю ОП. Каждый тест (планшет) позволял тестировать два пептида в 8-и поочередно разведенных концентрациях (от 200 до 1,5 μM) на одном бактериальном штамме. Помимо прямой антибактериальной активности Галармина и его аналогов, был исследован их возможный синергизм в присутствии другого антибактериального пептида – SLPI (Secretory leukocyte protease inhibitor). Сигнальная антипротеаза SLPI человека представляет из себя катионный не гликолизированный пептид с молекулярным весом 117 кДа, с выраженной антипротеазной и антибактериальной активностью, играющий важную роль в гомеостазе и при воспалении [13]. SLPI применяли в двух концентрациях: 10 μM которая является ингибирующей для роста большинства бактерий [13], и 5 μM . Концентрация Галармина и его аналогов составляла 100 μM . Рекombинантный SLPI был предоставлен проф. Ж.М. Сальнавом (Институт Пастера, Париж, Франция).

Все антимикробные тесты были воспроизведены 5 раз. Статистическую обработку данных производили общепринятым методом вариационной статистики Стьюдента – Фишера с вычислением t-критерия Стьюдента.

Результаты. Анализ всех исследуемых ПБП на обращенно-фазной HPLC выявил их гомогенность. Результаты LAL-теста на возможное присутствие следов эндотоксинов дали отрицательные показатели (отсутствие

желтой окраски реактивов) для всех тестируемых пептидов, выявив таким образом их абсолютную стерильность.

Ниже представлены суммарные результаты тестирования для пептидов галармин и Gx-NH₂, а также dGx-NH₂ и d-15 галармин (табл. 1) на бактериальных штаммах – *B. megaterium*, *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), MRSA (ATCC BAA-44) и MRSA (ATCC 43300). В табл. 2 приведены суммарные данные по влиянию ПБП на антибактериальную активность SLPI.

Таблица 1

Антибактериальный эффект галармина и аналогов на грам-положительные и грам-отрицательные штаммы

Штамм	Пептиды				Контроль	
	Галармин	GxNH ₂	GxNH ₂	d15 галармин	Позитивный	Негативный
Грамм-положительные						
<i>B. megaterium</i>	–	–	–	–	+	–
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	–	–	–	–	+	–
MRSA ATCC BAA-44	–	–	–	–	+	–
MRSA ATCC 43300	–	–	–	–	+	–
Грамм-отрицательные						
<i>E. coli</i> ATCC 25922	–	–	–	–	+	–
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	–	–	–	–	+	–

Ни одна из концентраций пептидов галармин и Gx-NH₂, а также dGx-NH₂ и d-15 галармин не явилась ингибирующей для роста указанных штаммов, о чем свидетельствуют показатели ОП. SLPI в концентрации 10 мкМ подавляет рост бактерий как в сочетании с ПБП, так и без них, однако при концентрации 5 мкМ антибактериальный эффект отсутствует во всех вариантах, таким образом взаимовлияния между ПБП и SLPI выявлено не было.

Выводы. Полученные результаты указывают на отсутствие прямого антибактериального, ингибирующего эффекта богатых пролином полипептидов мозга – галармина и его аналогов на различные грам-положительные и грам-отрицательные бактерии, в том числе метициллин-резистентные штаммы *S. aureus*. ПБП не влияют также на активность других антибактериальных пептидов на примере SLPI в условиях *in vitro*. В то же время ранее выявленная высокая активность галармина и аналогов на бактериальные инфекции в условиях *in vivo* свидетельствует об их комплексной, иммуномодулирующей активности.

Влияние галармина и аналогов на антибактериальную активность SLPI

Штамм	Пептиды + SLPI										Контроль	
	SLPI 10 μM	SLPI 10 μM + галар- мин	SLPI 10 μM + GxNH ₂	SLPI 10 μM + dGxNH ₂	SLPI 10 μM + dIS га- лармин	SLPI 5 μM	SLPI 5 μM + галар- мин	SLPI 5 μM + GxNH ₂	SLPI 5 μM + dGxNH ₂	SLPI 5 μM + dIS га- лармин	По- зи- тив- ный	Не- га- тив- ный
Грам-положительные												
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
ATCC 25923	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
MIRSA	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
ATCC 1144	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
MIRSA	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
ATCC 4170	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
Грам-отрицательные												
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
ATCC 25922	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
ATCC 27853	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-

Примечание. Позитивный контроль: 0.7% формальдегида; негативный контроль H₂O; + -ингибирующая активность; - отсутствие активности.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Федерации Европейских Биохимических Обществ (FEBS).

Институт биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА

А. А. Дургарян

Исследование прямого антибактериального воздействия галармина и его аналогов на грам-положительные и грам-отрицательные микроорганизмы в условиях *in vitro*

Исследовано прямое антибактериальное воздействие богатых пролином полипептидов гипоталамуса — галармина и его аналогов на ряд грам-положительных и грам-отрицательных микроорганизмов включая MRSA в условиях *in vitro*. Показано, что галармин, а также его аналоги Gx-NH₂, dGx-NH₂ и d-15 галармин не обладают прямой антибактериальной активностью в условиях *in vitro*.

Ա.Ա. Դուրգարյան

Գալարմինի և նրա անալոգների ուղիղ հակաբակտերիալ ազդեցության ուսումնասիրությունը *in vitro* պայմաններում մի շարք գրամ-դրական և գրամ-բացասական բակտերիաների դեմ

Ուսումնասիրվել է հիպոթալամուսի պրոլինով հարուստ պոլիպեպտիդներ՝ գալարմինի և նրա անալոգների ուղիղ հակաբակտերիալ ազդեցությունը *in vitro* պայմաններում մի շարք գրամ-դրական և գրամ-բացասական բակտերիաների նկատմամբ, այդ թվում՝ MRSA-ի դեմ: Տույց է փրված, որ գալարմինը, ինչպես նաև իր անալոգներ Gx-NH₂, dGx-NH₂ և d-15 գալարմինը չունեն ուղիղ հակաբակտերիալ ազդեցություն *in vitro* պայմաններում:

A. A. Durgaryan

Investigation of Direct Antibacterial Activity of Galramin and Analogues on Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria *in vitro*

Direct antibacterial activity of hypothalamic proline-rich polypeptides, galaramin and analogues, against different gram-positive and gram-negative bacteria including MRSA strains in the *in vitro* conditions was investigated. It was shown that galaramin and its analogues Gx-NH₂, dGx-NH₂ and d-15 galaramin have not direct antimicrobial activity *in vitro*.

Литература

1. Galoyan A. A. Biochemistry of Novel Cardioactive Hormones and Immunomodulators of the Functional System Neurosecretory Hypothalamus - Endocrine Heart. Nauka Publ. 1997. 240 p.

2. Galoyan A A. Brain Neurosecretory Cytokines: Immune Response and Neuronal Survival. Kluwer Academic/Plenum Publishers. 2004. 188 p.
3. 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.
4. Маркосян К.А., Гурвиц Б.Я., Галоян А.А. - Нейрохимия. 1999. Т. 16. N 1. С. 22-25.
5. Galoyan A A. - Neurochem. Res. 2000. V. 25. P. 1343-1355.
6. Galoyan A A. Patent No.1951 A2, No. AM20060142, Issued on 15.06.2007.
7. Galoyan A.A., Krieglstein J., Klumpp S., Danielian K.E., Galoian K.A., Kremers W., Bezirganyan K.B., Davtyan T.K. - Neurochem. Res. 2007. V. 32. N11. P. 1898-905.
8. Galoyan A.A., Korochkin L.I., Rybalkina E.J., Pavlova G.V., Saburina I.N., Zaraiski E.I., Galoyan N.A., Davtyan T.K., Bezirganyan K.B., Revishchin A.V. - Cell Transplant. 2008. V. 17. N 9. P. 1061-6.
9. Galoyan A.A., Aprikyan V.S. - Neurochem. Res. 2002. V. 27. N 4. P. 305-312.
10. Galoyan A A., Grigoryan S.L., Badalyan K.V. - Neurochem. Res. 2006. V. 31. P. 795-803.
11. Cauda R., Garau J. - Clin. Microbiol. Infect. 2009. V. 15. N2. P. 109-111.
12. Дургарян А. А., Дмитренко О. А., Матевосян М. Б. и Галоян А. А. - ДНАН РА 2010. Т. 110. N4. С. 384-89.
13. Williams S.E., Brown T.I., Roghanian A., Sallenave J.M. - Clinical Science. 2006. V. 110. P. 21-35.