

УДК 577.152.851-48+616.34-006

**Механизмы химиотерапевтической активности
препарата "Арменикум" (концентрат) при
экспериментальной генерализованной
стафилококковой инфекции**

**И.С. Акопян¹, Т.К. Давтян¹, Т.Г. Оганян¹, Н.О. Мовсесян²,
Н.Х. Алчуджян², В.Т. Оганян¹**

¹ЗАО "Арменикум"

0084, Ереван, ул. Г. Шерами, 2

²Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА

0014, Ереван, ул. П. Севака, 5/1

Ключевые слова: L-аргинин, препарат "Арменикум" (концентрат), протеолитическая активность, С-реактивный белок, стафилококковый сепсис

Препарат "Арменикум" (концентрат) (АРМ), содержащий йод, литий, альфа-декстрин в комплексе с органическими соединениями, обладает широким спектром антимикробного действия и, как показали наши исследования, его дозозависимое введение позволяет добиться полной эрадикации вирулентных штаммов бактерий и грибов из внутренних органов и крови зараженных лабораторных животных [1]. В представленной работе осуществлено изучение химиотерапевтической активности препарата АРМ в зависимости от дозы и водородного показателя (pH) раствора, в котором вводили препарат при генерализованной инфекции у крыс, вызванной L-формой *Staphylococcus aureus*.

Материал и методы

Опыты осуществляли с соблюдением правил содержания и обращения с животными, изложенных в Директивах Европейского Сообщества и Советом от 22.09. 2010 (2010/63/ЕС) и одобренных комитетом по биомедицинской этике при Институте биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА.

Схема исследования. Беспородные белые крысы-самцы в возрасте около 4 недель были разделены на группы (12/группу): интактные; опытные – инфицированные; инфицированные крысы, получившие внутривенно (хвостовая вена) одну или двукратную лечебную дозу препарата АРМ (0.4 мл/кг массы), который вводили в кислом (pH 5.13) и/или слабоще-

лочном (рН 7.15) физиологическом растворе. Крыс декапитировали на 11-й день с начала инфицирования (пятый день после приема препарата).

Получение плазмы. Кровь, полученную при декапитации, стабилизировали антикоагулянтом, 5 % Na_2EDTA , центрифугировали при 6000 об/мин 10 мин при 4°C и в супернатанте получали плазму [5].

Протеолитическая активность в плазме крови определялась с использованием в качестве субстрата свежевыделенного гемоглобина крови крыс (предварительно очищенного ионообменной хроматографией) [2]. Образцы плазмы инкубировали (37°C 2 ч) в 20 мМ HEPES буфере, содержащем 1 мМ EDTA, 2мМ дитиотрейтол, 3 мМ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, рН 7.35, при насыщающей концентрации гемоглобина (267 мкг/мл), и реакцию останавливали 0.5 N NaOH и 10% ZnSO_4 . Пробы центрифугировали 15000 об/мин 3 мин и в безбелковом супернатанте определяли протеолитическую активность по приросту L-аргинина, образующегося в течение часа в результате гидролиза гемоглобина.

Определение содержания L-аргинина осуществляли согласно методу Akamatsu&Watanabe [6]. К супернатантам депротеинизированных проб добавляли реагент: 0.02 % 8-оксихинолина в 96% этиловом спирте, 2.5 % сульфосалицилат натрия в 0.01 М глицине и 2.5% NaOH (1:1:1 по объему), после чего вводили 1% гипобромит натрия, тщательно перемешивали и спустя 15 мин содержание L-аргинина определяли спектрофотометрически при длине волны 525 нм и рассчитывали по калибровочной кривой для L-аргинин-HCl (0.02 - 2 мкМ).

Определение содержания C-реактивного белка проводили с использованием CRP Latex Test Kit (Cortez Diagnostics, Inc).

Статистика. Достоверность различий оценивалась с использованием параметрического однофакторного дисперсионного анализа (one-way Anova) и последующим постдисперсионным тестом Холм-Сидака с помощью пакета программ SigmaStat 3.5 for Windows. В качестве критерия достоверности принималась $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение

Результаты изучения влияния препарата АРМ на протеолитическую активность (ПА) в плазме крови инфицированных животных представлены на рис. 1. Генерализованная инфекция, индуцированная *S. aureus*, вызывает возрастание ПА примерно в 4.2 раза по сравнению с контролем. Однократные инъекции раствора препарата в кислой среде не оказывали статистически достоверного влияния на ПА, тогда как в нейтральной среде он снижает ПА более, чем вдвое. Двукратная инфузия препарата практически нормализует ПА независимо от рН раствора АРМ. Одновременно препарат оказывал воздействие на содержание L-аргинина (рис. 2).

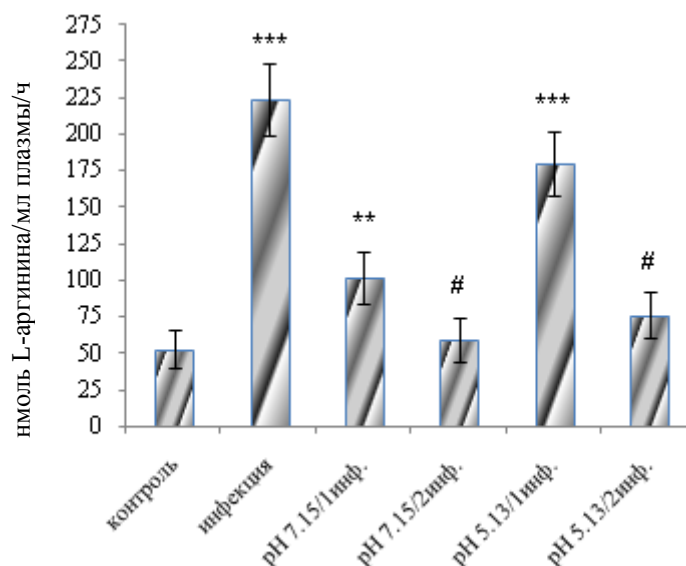


Рис. 1. Дозо- и pH-зависимое влияние препарата “Арменикум” (концентрат) на протеолитическую активность в плазме крови крысы при *S. aureus*-индуцированной генерализованной инфекции. Здесь и далее результаты представлены в виде $M \pm SEM$, $n=12$, достоверность (p) различий по сравнению с контролем представлена обозначениями: # $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

L-аргинин, условно незаменимая аминокислота – ее экзогенные поступления необходимы в период роста, восстановления после физического стресса, хирургии и/или травмы: он оказывает иммуномодулирующие эффекты, влияя на активность Т-клеток, естественных киллеров, уровень некоторых провоспалительных цитокинов, а также стимулирует секрецию гормона роста, пролактина, инсулина, инсулиноподобного фактора роста-1, осуществляющих эндокринную, аутокринную и паракринную регуляцию процессов роста, развития и дифференцировки клеток и тканей организма [17].

При генерализованной инфекции в плазме крови наблюдалось повышение уровня аргинина, который превышал в 2.1 раза таковой у интактных животных. При этом только при двукратной инфузии АРМ pH 7.15 получилось снизить содержание аргинина в 1.54 раза, которое однако не достигало контрольных значений. Детектируемое повышение уровня аргинина может быть связано с распадом белков, вследствие их повышенной внутриклеточной деградации на фоне генерализованной инфекции, что будет способствовать устойчивому повышению содержания аргинина. Возрастание уровня аргинина влияет на состояние ионного баланса, оказывая гиперкалемический эффект, и может стимулировать посттрансляционное аргинилирование белков, ускоряя процесс их убиквитинизации

и последующего протеолиза [14, 18]. Таким образом, процессы протеолиза белков и метаболизирования аргинина взаимосвязаны.

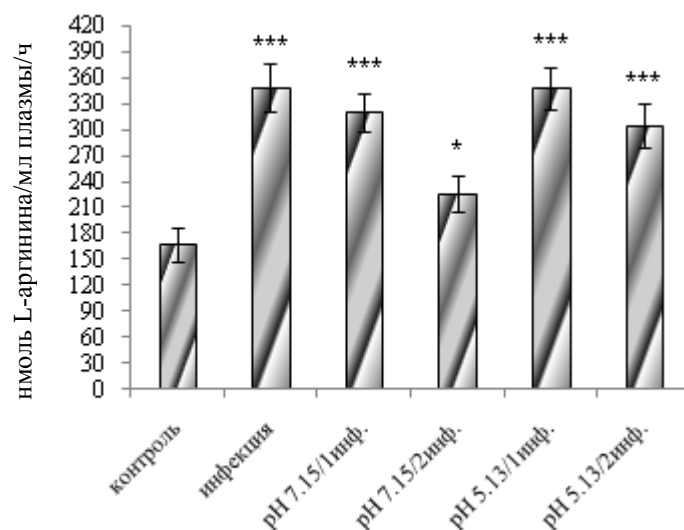


Рис. 2. Дозо- и рН-зависимое влияние препарата “Арменикум” (концентрат) на содержание L-аргинина в плазме крови крыс при *S. aureus*-индуцированной генерализованной инфекции

В то же время повышение содержания аргинина может способствовать активированию метаболизирующих его ферментов, аргиназы и, особенно, индуцибельного изофермента синтазы оксида азота (iNOS) [7]. Данный изофермент в большей степени зависит от концентрации аргинина, поскольку продуцирует NO в течение длительного времени, стойко повышая его уровень в иммунных клетках и запуская механизмы иммуносупрессии [15]. Реципрокная регуляция NOS и аргиназы контролирует пул аргинина во всех органах и тканях, в которых они конкурируют за общий субстрат, и их взаимовлияние играет роль в процессах иммунорегуляции [17]. Известно, что L-аргинин способствует сборке активных димеров NOS и стабилизации их структуры [13]. К тому же аргинин обеспечивает нормальное протекание трансляции iNOS в воспалительных макрофагах [12]. Следует отметить, что iNOS используется организмом хозяина для эрадикации патогенов через запуск суицидной программы клеток-мишеней и синтез биоактивных соединений, токсичных для патогена, препятствуя диссеминации инфекции [9]. NO выбивает из хелатных комплексов сидерохромов микробов, а также связывает его в трансферрине и ферритине, препятствуя отъему от них железа энтерохелином микробов [4]. С другой стороны, iNOS способен включаться в ряд разрушительных процессов, вызывая повреждения в самом организме [8]. Примечательно, что iNOS не только экспрессируется под воздействием цито-

кинов, INF- γ , TNF- α , и интерлейкинов (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12), но и влияет на их продукцию, оказывая воздействие на весь спектр их биологических эффектов [11, 16]. Это касается и продукции белков острой фазы при действии вышеуказанных цитокинов, к которым, в частности, относится С-реактивный белок (СРБ), концентрация которого повышается при воспалении и служит его индикатором [3].

Таблица

*Химиотерапевтическая эффективность препарата
"Арменикум" (концентрат) при стафилококковой инфекции*

Группы	Масса (г) на 11-й день	СРБ	Количество колоний <i>S. aureus</i> в логарифмах					
			печень	кровь	лимфо- узел	селезенка	легкое	почки
Контроль	38	-	Посевы не проводились					
Инфекция 1	22.0	+	3.85	3.53	3.79	3.92	3.76	3.09
Инфекция 2	21.5	+	3.79	3.62	3.7	3.89	3.79	3.89
Инфекция 3	22.4	+	3.83	3.61	3.76	3.88	3.7	3.88
АРМ 1 инф. рН 5.13	23.0	-	2.62	3.08	2.45	2.53	2.49	2.28
АРМ 1 инф. рН 5.13	21.5	-	2.59	2.99	1.98	2.62	2.31	2.2
АРМ 2 инф. рН 5.13	21.0	-	1.0E	2,9	0.78	1.98	1.0	1.0
АРМ 2 инф. рН 5.13	21.6	-	0.95	2.E1	1.08	1.26	0.48	0.78
АРМ 1 инф. рН 7.15	32.5	+	t.23	1.08	1.65	1.3	1.48	2.68
АРМ 1 инф. рН 7.15	33	+	1.28	1.26	t.E1	1.32	1.41	2.51
АРМ 2 инф. рН 7.15	35.0	+	EK	EK	EK	EK	EK	1.11
АРМ 2 инф. рН 7.15	35.5	+	EK	EK	1.18	1.0	0.9	1.23

Примечание. EK – единичные колонии

В таблице представлены результаты изучения показателей СРБ, массы тела и количество колоний *S. aureus*, полученных из одного грамма ткани органов подопытных животных. Как видно из таблицы, антимикробное действие препарата наиболее выражено при его двукратной инфузии как при введении его в кислой среде, так и слабощелочной. Тем не менее наиболее эффективное терапевтическое воздействие оказывает двукратная инфузия препарата АРМ (рН 7,15), который способствует улучшению состояния животных за счет снижения обсемененности органов патогеном, в которых отмечался лишь рост единичных колоний по сравнению с тысячами колоний стафилококка. Именно этим можно объяснить и нормализацию прибавки массы инфицированных животных, получив-

ших двукратную дозу препарата в слабощелочном растворе. Интересно, что пробы на СРБ оказались положительными при приеме АРМ рН 7.15, как и у инфицированных крыс, не получивших препарат, в отличие от АРМ рН 5.13. Отметим, что СРБ, как и прочие белки острой фазы, участвует в развитии защитной воспалительной реакции, проявляет антимикробное действие, присоединяясь к лимфоцитам, нейтрофильным фагоцитам, стимулирует фагоцитоз, активирует комплемент, способствует формированию и ликвидации очага воспаления, а также подавляет продукцию супероксидных радикалов и высвобождение ферментов из гранул фагоцитов, защищая тем самым ткани от повреждения [10].

Подытоживая можно сказать, что выявлены оптимальные условия и доза препарата "Арменикум" (концентрат), обеспечивающие успешную элиминацию патогенов с вовлечением плейотропных аргинин-зависимых механизмов в крови и способствующие подавлению деструктивных процессов, которые развиваются при инфекции.

Поступила 23.03.18

«Արմենիկում» (խտանյութ) դեղամիջոցի քիմիաթերապևտիկ ակտիվության մեխանիզմները փորձարարական ստաֆիլակոկային վարակի ժամանակ

**Ի.Ս. Հակոբյան, Տ.Կ. Դավթյան, Տ.Գ. Օհանյան, Ն.Հ. Մովսիսյան,
Ն.Խ. Ալխուջյան, Վ.Տ. Օհանյան**

S. aureus-մակաձված վարակի ժամանակ հետազոտվել և որոշվել են «Արմենիկում» (խտանյութ) դեղամիջոցի ներմուծման օպտիմալ դոզան և պայմանները պաթոգենի վերացման և վնասվածքների կանխարգելման համար արգինին-կախյալ մեխանիզմների ներգրավմամբ:

Mechanisms of chemotherapeutic activity of the "Armenikum" (concentrate) pharmaceutical in experimental staphylococcal generalized infection

**I.S. Hakobyan, T.K. Davtyan, T.G. Ohanyan, N.H. Movsesyan,
N.Kh. Alchujyan, V.T. Ohanyan**

The study of chemotherapeutic effects of the "Armenikum" (concentrate) pharmaceutical revealed the optimal conditions and dose for elimination of

pathogens and prevention of the injuries in *S. aureus*-induced generalized infection with involvement of arginine-dependent mechanisms.

Литература

1. Акопян И.С., Давтян Т.К., Оганян Т.Г., Мовсесян Н.О., Алчуджян Н.Х., Оганян В.Т. Изучение широты спектра антимикробного действия и химиотерапевтической эффективности препарата «Арменикум» (концентрат) на моделях экспериментальных инфекций. Мед. наука Армении НАН РА, 2017, т. LVII, 3, с. 21-36.
2. Алексеев Л.П. Новый микрометод определения активности протеаз. Современные методы биохимии (под ред. В.Н. Ореховича). М., 1977, с. 205-215.
3. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология. М., 2001, с. 217-233.
4. Проскуряков С.Я., Бикетов С.И., Иванников А.И., Скворцов В.Г. Оксид азота в механизмах патогенеза внутриклеточных инфекций. Иммунология, 2000, 4, с. 9-20.
5. Фрик Г., Прейснер З., Иенсен Г., Бурмейстер Ю. В кн.: Иммунологические методы (под ред. В.Н. Ореховича), 1979, М.
6. Akamatsu S., Watanabe T.J. Assay for L-arginine in biological liquids. J. Biochem., 1961, v. 77, 3, p. 484.
7. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem. J., 2001, v. 357, p. 593-615.
8. Brune B. Reactive oxygen and nitrogen species. Antioxid. Redox Signal., 2005, v. 7, p. 497-503.
9. Brune B., von Knethen A., Sandau K.B. Nitric oxide and its role in apoptosis. Eur. J. Pharmacol., 1998, v. 351 (3), p. 261-272.
10. Danesh J., Wheeler J.G., Hirschfield G.M. et al. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. N. Engl. J. Med., 2004, 350 (14), p.1387-1397.
11. Diefenbach A., Schindler H., Rollinghoff M. et al. Requirement for type 2 NO synthase for IL-12 signaling in innate immunity. Science, 1999, v. 7, 284 (5416), p. 951-955.
12. El-Gayar S., Thuring-Nahler H., Pfeilschifter J. et al. C. Translational control of inducible nitric oxide synthase by IL-13 and arginine availability in inflammatory macrophages. J. Immunol., 2003, v. 171, p. 4561-4568.
13. Foxton R.H., Land J.M., Heals S.J.R. Tetrahydrobiopterin availability in Parkinson's and Alzheimer's disease; potential pathogenic mechanisms. Neurochem. Res., 2007, v. 32 (4-5), p. 751-756.
14. Kravtsova-Ivantsiv Y., Ciechanover A. Non-canonical ubiquitin-based signals for proteasomal degradation. J. Cell. Sci., 2012, 125 (Pt. 3), p. 539-548.
15. Lowenstein C. J., Padalko E. iNOS (NOS2) at a glance. J. Cell Sci., 2004, v. 117, p. 2865-2867.
16. Miller A.H., Maletic V., Raison C.L. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. Biol. Psychiatry, 2009, v. 65 (9), p.732-741.
17. Popovic P.J., Zeh III H.J., Ochoa J.B. Arginine and immunity. J. Nutr., 2007, v. 137, p.1681S- 1686S.
18. Wilkinson K.D. The discovery of ubiquitin-dependent proteolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2005, 102 (43), p. 15280-15282.