

ANTIBACTERIAL PEPTIDES ISOLATED FROM THE URINE OF HEALTHY ADULTS

ADAM J, CHAVKOVA Z, SURZIN J, GREGA B

ANTIBAKTERIÁLNE PEPTIDY IZOLOVANÉ Z MOČU ZDRAVÝCH LUDÍ

Abstract

Adam J, Chavkova Z, Surzin J, Grega B:
Antibacterial Peptides Isolated from the Urine of Healthy Adults
 Bratisl Lek Listy 1999; 100 (3): 135–138

Gel chromatography on Sephadex G-25, DEAE Sephadex A-25 and electrophoresis were used for isolation of two peptides from urine of healthy adults. Isolated peptides exhibited a higher antibacterial activity than antibiotics penicillin and tetracycline. The inhibitory zone of these peptides is similar to that of ampicillin. Chemical analysis of the isolated peptides revealed that one is composed of 5 and the other of 7 amino acids. In both peptides was the concentration of glycine the highest from all amino acids. the highest. (Tab. 1, Fig. 4, Ref. 22.)

Key words: antibacterial activity, peptides, urine, antibiotics, *S. aureus*.

Pôvod peptidov v rôznych orgánoch organizmu nie je dostatočne objasnený. Niektorí autori sa domnievajú, že sú to medzi-produkty syntézy bielkovín (Herp a spol., 1970; Moschera a spol., 1970; Avramenko a spol., 1972), ale existujú i názory, že vznikajú ako produkty degradácie exogénnych, alebo endogénnych bielkovín, alebo majú bakteriálny pôvod (Tupiková, 1983). Skutočnosť, že vo viacerých z nich sa vyskytujú i tzv. modifikované aminokyseliny β -alanín, taurín, sarkozín, citrulín, α -Abu, β -Abu, (Dzúrik a spol., 1972; Barna a spol., 1983), nás vedie k predpokladu, že uvedené látky môžu byť aj v organizme syntetizované za účelom špeciálnych funkcií.

Tento náš predpoklad nie je v rozpore ani s doteraz platnými koncepciami a zisteniami, že mnohé peptidy aj veľmi jednoduchej štruktúry preukazujú významné biologické účinky a zúčastňujú sa na metabolických reguláciách (Dzúrik a spol., 1973; Lođin a Faltin, 1991; Abiko a spol., 1979) a preukazujú antibakteriálne vlastnosti, ako je to zrejme aj z našich predchádzajúcich prác (Adam a spol., 1982).

Abstrakt

Adam J., Chavková Z., Suržin J., Grega B.:
 Antibakteriálne peptidy izolované z moču zdravých ľudí
 Bratisl. lek. Listy, 100, 1999, č. 3, s. 135–138

Metódou gélovej chromatografie boli na Sephadex G-25, DEAE Sephadex A-25 a elektroforézou z moču zdravých dospelých ľudí izolované peptidy. Dva z izolovaných peptidov sú antibakteriálne účinnejšie ako penicilín a tetracyklín a preukazujú veľkosť inhibičnej zóny ako ampicilín. Ich bližšia charakteristika ukázala, že ide o nízkomolekulové peptidy zložené z 5 a 7 aminokyselín. V oboch peptidoch preukazuje najvyššiu koncentráciu aminokyselina glycín. (Tab. 1, obr. 4, lit. 22.)

Kľúčové slová: antibakteriálna aktivita, peptidy, moč, antibiotiká, *S. aureus*.

Odpoveď na otázku, či sa takéto peptidy vylučujú aj do moču ľudí, bola cieľom našej práce.

Materiál a metódy

Na analýzu sme použili vybranú 24-hodinovú vzorku moču od piatich zdravých dospelých jedincov (vo veku približne 40 rokov). Jednotlivé kolekcie moču boli počas odberu uskladnené v chladničke za pridania toluénu (1 ml/1000 ml) ako konzervačného činidla.

Do pokusu sa bralo 800 ml moču, ktorý sme naniesli na kolónu s Dowexom 50x8 v H^+ cykle za účelom zbavenia solí a ostatných nežiaducich látok rušivo vplývajúcich na delenie látok chromatografickými metódami (Adam a spol., 1985).

Odsolenú vzorku moču sme frakcionovali gélovou chromatografiou na Sephadex G-25. Subfrakcionáciu získaných frakcií sme uskutočnili elektroforézou v pyridín-acetátovom tlmivom roztoku (pyridín—kyselina octová—voda v pomere 6:1:1993 a s pH

Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, Safarikensis Univerzity, Kosice

Address for correspondence: J. Adam, MD, PhD, Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, Trieda SNP 1, SK-040 66 Košice, Slovakia.

Phone/Fax: +421.95.6423849, Internet:

Ústav lekárskej chémie a biochémie Lekárskej fakulty Univerzity P.J. Šafárika v Košiciach

Adresa: Doc. MUDr. J. Adam, CSC., Ústav lekárskej chémie a biochémie LF UPJŠ, Trieda SNP 1, 040 66 Košice.

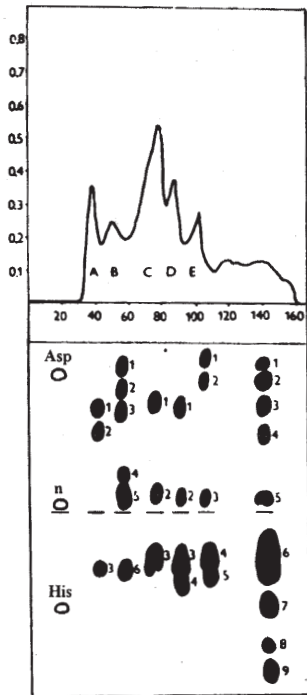


Fig. 1. Gel chromatography of urine sample on Sephadex G-25 (above). Separation of fractions obtained by middle-voltage electrophoresis (below).

Obr. 1. Gélová chromatografia vzorky moču na Sephadexe G-25 (hore). Separácia frakcií získaných gélovou chromatografiou na Sephadexe G-25 elektroforézou (dole).

5,6) a potenciálovom gradiente (20 V/cm počas 120 min) a chromatografiou na anexe DEAE Sephadex A-25.

Časť eluátu získaného po delení na DEAE Sephadex A-25 bola hydrolyzovaná HCl $c=6$ mol/l pri teplote 105 °C počas 24 h. Aminokyseliny získané po kyslej hydrolyze sa identifikovali na automatickom analyzátore aminokyselín (Amino acid analyzer T 339).

Ďalšia časť eluátu sa použila na testovanie antibakteriálnych vlastností. Metódu testovania sme uviedli v našich predchádzajúcich prácach (Adam a spol., 1983; Suržin a spol., 1977).

Výsledky

Výsledky frakcionácie vzoriek moču na Sephadex G-25 sú na obrázku 1 (horná časť). Z obrázka vyplýva, že nami sledované dusíkové látky sa rozdelili na 5 samostatných frakcií, ktoré bolo možné kvantifikovať (frakcie A—E).

Frakcie v množstve 1 mg/1 ml demineralizovanej vody sme použili na testovanie antibakteriálnej účinnosti oproti baktériám *Staphylococcus aureus*. Z výsledkov inkubácie (obr. 2) vyplýva, že významné antibakteriálne účinky (posudzujúc podľa inhibičných zón) majú len frakcie B, D a E.

Frakcie A—E sme v ďalšom podrobili deleniu elektroforézou (obr. 1, dolná časť). Analýzy ukázali, že frakcie A—E sa pri elektroforetickom delení rozdelili na viaceré subfrakcie. Ich testovanie na antibakteriálne vlastnosti ukázalo, že niektoré z nich (sub-

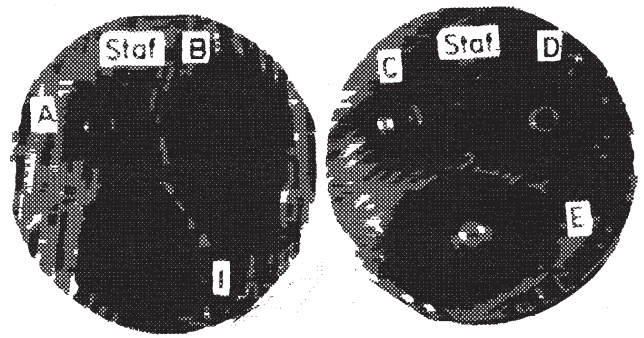


Fig. 2. Inhibition of bacterial growth of *S. aureus* by the fractions A, B and C isolated from urine using chromatography on Sephadex G-25. Obr. 2. Inhibícia rastu baktérií *S. aureus* frakciami A, B a C izolovanými z moču chromatografiou na Sephadexe G-25.

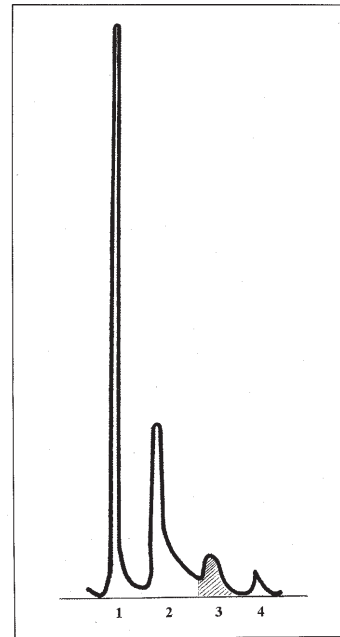


Fig. 3. Separation of subfraction D_3 (obtained by electrophoresis) on Deae Sephadex A-25. Stripped peak designates the subsubfraction with antibacterial activity.

Obr. 3. Separácia subfrakcie D_3 (získanej elektroforézou) na Deae Sephadex A-25. Prúžkované je vyznačená subsubfrakcia s antibakteriálnou aktivitou.

frakcie C5, C7, D1 a D3) majú inhibičný účinok na rast kmeňa baktérií *Staphylococcus aureus*. Ďalej sme sa zamerali len na bližšiu charakterizáciu subfrakcie D1 a D3, ktoré mali najvýznamnejšie antibakteriálne účinky.

Podrobili sme ich preto ďalšiemu deleniu metódou dvojstupňovej analýzy (Gordon a spol., 1975; Furst a spol., 1976) na kolónie anexe DEAE Sephadex. Zistili sme, že subfrakcia D1 je homogénna a subfrakcia D3 sa rozdelila na štyri subsubfrakcie 1—4 (obr. 3).

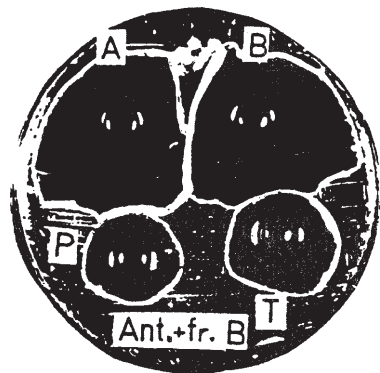


Fig. 4. Inhibition zones of *S. aureus* on agarose gel by fraction B (isolated by gel chromatography on Sephadex G-25 from urine of healthy adults) and of antibiotics tetracycline — T, penicillin — P, ampicillin — A (1 mg/1 ml).

Obr. 4. Inhibičné zóny *S. aureus* na agarovej pôde frakciou B izolovanou gélovou chromatografiou na Sephadex G-25 z moču zdravých ľudí a antibiotík tetracyklínu — T, penicilínu — P, ampicilínu — A (1 mg/1 ml).

Z uvedených subsubfrakcií antibakteriálnu aktivitu mala len subsubfrakcia, ktorú sme označili symbolom D3-3 (na obrázku 3 šrafovaná). Na obrázku 4 je uvedené porovnanie antibakteriálnej účinnosti frakcie B oproti antibiotikám penicilínu, tetracyklínu a ampicilínu.

Teoretický predpoklad, že ide o peptidy, nám potvrdila minerálna hydrolyza subfrakcie D1 a D3-3 a ich následná kvalitatívna a kvantitatívna analýza na automatickom analyzátore aminokyselín. Výsledky analýz sumarizuje tabuľka 1.

Diskusia

Stavovce majú okrem špecifického imunitného systému aj nešpecifický obranný systém, na ktorom sa zúčastňujú peptidy s bakteriostatickým až baktericídny účinkom (Kharchenko, 1990; Nikolas a spol., 1992). Takéto peptidy sú v zdravých a patologickom procesom postihnutých bunkách makroorganizmov a mikroorganizmov (Anderson a spol., 1977; Menyhart, 1989). Antibakteriálne peptidy boli izolované najmä z pečenej a obličkového tkaniva vyšších živočíchov (Avramenko a spol., 1972; Kornguth a Kunin, 1973; Suržin a spol., 1983).

V predchádzajúcich prácach sme poukázali na to, že antibakteriálne peptidy sa okrem tkanív vyšších živočíchov vyskytujú aj v moči zdravých a chorých ľudí (Adam a spol., 1976, 1978, 1983).

Peptidy moču dospelých jedincov majú významné antibakteriálne účinky a vplyvajú na rast kultúr baktérií *Staphylococcus aureus*. Pri porovnaní ich inhibičných zón so zónami získanými inhibíciou rastu uvedených kmeňov baktérií s antibiotikami penicilínom, tetracyklínom a ampicilínom (obr. 4) sme zistili, že dva z izolovaných peptidov (C a D) sú antibakteriálne účinnejšie ako penicilín a tetracyklín a majú veľkosť inhibičnej zóny ako ampicilín.

Pri hodnotení ich aminokyselinového zloženia sa zistilo, že majú zhodné aminokyselinové zloženie okrem aminokyselín metionín a arginín, ktoré sú prítomné v peptide D3 a v peptide D1 sa nevyskytujú. V oboch peptidoch (D3 a D1) preukazuje najvyššiu koncentráciu aminokyselina glycin (tab. 1). Peptidy obsahujúce aminokyselinu glycin, ako uvádza Payne (1968), sú pohoto-

Tab. 1. Aminokyselinové zloženie subfrakcií izolovaných z moču zdravých ľudí. Koncentrácia aminokyselín je daná v $\mu\text{mol}/\text{celkový objem moču}$.

Tab. 1. Amino acid composition of subfractions isolated from urine of healthy adults. Concentration of amino acids is given in $\mu\text{mol}/\text{total volume of urine}$.

Found amino acids	Fraction C ₇	Fraction _{3,3}
Nájdené aminokyseliny	Frakcia C ₇	Frakcia _{3,3}
Lys	57,0	25,4
His	52,5	22,8
Arg	-	16,0
Gly	475,0	323,6
Ala	154,25	61,4
Ser	147,5	74,2
H-ser	-	-
Val	72,25	25,8
Leu	52,2	22,4
Ile	36,5	12,8
Nleu	254,2	205,8
Phe	21,0	16,2
Thr	116,7	39,6
Tyr	18,0	20,0
Met	-	11,2
Pro	58,2	28,0
Asp	273,2	137,0
Glu	274,0	174,0
CySO ₃ H	50,25	14,0
M-cys	63,75	25,0

vo a rýchlo transportované do vnútra bunky, kde majú extrémne vysoký inhibičný účinok na rast baktérií *Lactobacillus casei*, typu 7469 (Leach a Snell, 1963).

Je zrejme, že pre splnenie inhibičných vlastností musí byť zachovaná podmienka pomerne ľahkého transportu peptidu do bunky a odolnosti voči intracelulárnej hydrolyze. Budúcnosť v tomto smere, ako uvádza Payne (1972), patrí peptidom všeobecne odolným voči hydrolyze, z ktorých najvhodnejšie sa zdajú peptidy majúce metylovú skupinu na dusiku peptidovej väzby.

Nález metylovaného cysteínu v oboch nami izolovaných peptidoch toto zistenie len podporuje.*

Literatúra

Abiko T., Kumikawa M., Sekino H.: Inhibition effect of rosette formation between human lymphocytes and sheep erythrocytes by specific heptopeptides isolated from uremic fluid and its analogs. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 86, 1979, č. 4, s. 945—952.

Adam J., Suržin J., Barna K., Grega B.: Výskyt peptidov s bakteriostatickým účinkom v moči zdravého dieťaťa. *Biochem. clin. bohemoslov.*, 5, 1976, s. 47—53.

Adam J., Suržin J., Barna K., Grega B.: Peptidy s bakteriostatickým účinkom izolované v moči detí s pyelonefritídou. *Čs. Pediat.*, 33, 1978, č. 4, s. 203—206.

Adam J., Barna K., Grega B.: Vplyv tetrachlormetánu na obsah peptidov s bakteriostatickými vlastnosťami v pečeni potkanov. X. Xenobiochemické sympóziu, Košice, 3.—4.6.1982.

* Práca je venovaná k životnému jubileu prof. MUDr. Viliama Mézeša, DrSc.

Adam J., Barna K., Grega B.: Peptidy s bakteriostatickými vlastnosťami v moči detí s poruchami funkcie pečeneňého parenchýmu. *Biochem. clin. bohemoslov.*, 12, 1983, č. 1, s. 29–38.

Adam J., Paščenko A.Je., Suržin J., Grega B.: Occurrence of free amino acids and peptides in human urine as dependent on age. *Biológia*, 40, 1985, č. 8, s. 775–784.

Avramenko M.M., Gladyšev B.N., Vejnova M.K., Afanasjeva E.M.: Vlijanije pirogenala i glukomannana na sodržanije peptidov i nukleo-peptidov v tkani pečeni i belki syvorotki krovi pri CC14- gepatoze u krys. *Vopr. med. Chim.*, 18, 1972, s. 627–630.

Barna K., Suržin J., Adam J., Grega B.: The effect of tetracycline administration of rat liver peptide fractions modifying alanine aminotransferase activity in blood serum of rats. *Biológia*, 18, 1983, č. 8, s. 807–817.

Dzúrik R., Adam J., Grega B.: Inhibition of glucose utilization in rat diaphragm by peptides of uremic serum isolated by high-voltage electrophoresis. *International urology and nephrology*, 4, 1972, s. 297–301.

Dzúrik R., Adam J., Moščovič F.: Inhibition of glucose utilization in rat diaphragm by the urinary peptides fractionated by high-voltage electrophoresis. *Intern. Urol. Nephrol.*, 5, 1973, s. 217–221.

Frst P., Zimmerman L., Bergstrm J.: Determination of endogenous middle molecules in normal and uremic body fluids. *Clin. Nephrol.*, 5, 1976, s. 178–188.

Herp A., Liska M., Payza N., Pigman W., Vitek J.: Ultrafilterable peptides from rat liver and *E. coli* homogenates. *FEBS Lett.*, 6, 1970, s. 321–325.

Kharchenko, E. P., Samedov, A. Sh., Kalikhevich, Z.A.: Malije peptidy belkov životnych kak antibiotiki i vozmožnyje faktory nespecificheškogo immuniteta. *Ukr. biochim. žurn.*, 62, 1990, s. 21–26.

Kornguth M.L., Kunin C.M.: Purification of antibacterial compounds from calf liver. *Proc. Soc. Exp. Med.*, 142, 1973, č. 4, s. 1083–1086.

Leach F.R., Snell E.E.: The effect of prior incubation with glycyl-L-alanine on the uptake of peptides by *Lactobacillus casei*. *Biochem. biophys. Acta*, 71, 1963, s. 454–456.

Lodin Z., Faltin J.: O součinnosti mediátor s neuropeptidy. *Čs. Fyziol.*, 40, 1991, s. 421–455.

Menyhart J.: Endogenous Regulatory Peptides. Budapest, Akadémia Kiadó 1989, 920 s.

Moschera J., Mound R., Payza N., Pigman W., Weiss M.: Ultrafilterable peptides from homogenates of bovine and porcine submaxillary glands. *FEBS Lett.*, 1970, 6, s. 326–328.

Nicolas P., Mor A., Delfour A.: Les peptides de la defense antibacterienne des vertebres. *Medicine/Science*, 8, 1992, s. 423–431.

Payne J.W.: Oligopeptide utilisation in *Escherichia Coli*; Specificity with respect to side chain distinction from dipeptide transport. *J. Biol. Chem.*, 243, 1968, s. 3395.

Payne J.W.: Effect of N-metylpeptide bonds of peptide utilization by *Escherichia Coli*. *J. gen. Microbiol.*, 71, 1972, s. 259.

Suržin J., Barna K., Adam J., Chavková Z.: Isolation of highly active antibacterial peptidic substances from rabbit kidneys and effect of tetracycline on their occurrence. *Biológia*, 34, 1983, 4, s. 359–365.

Tupikova Z.A.: Srednomolekuljarnyje uremičeskije toksiny. *Vopr. med. Chim.*, 29, 1983, č. 1, s. 2–10.

Do redakcie došlo 24.3.1998.

PREDSTAVUJEME NOVÉ KNIHY

Preiss M. a kol.: **Klinická neuropsychologie.** Grada Publ. 1998, 13 obr. čb., 37 tab., V4, B5, 408 s., cena 628 Sk.



Neuropsychológia je definovaná ako disciplína skúmajúca vzťahy medzi poškodením mozgu a správaním. Klinická neuropsychológia je aplikovaná disciplína, ktorá je súčasťou psychológie, najmä klinickej, ale súčasne je na hraniciach ďalších odborov – najmä neurológie, psychiatrie a špeciálnej pedagogiky. Neuropsychológia vyšetruje klinicky a experimentálne poruchy mozgu, ktoré súvisia s jeho poškodením, vychádza od riešenia otázok afázií, praxie, gnózie, pamäti a inteligencie a smeruje k diagnostike a klasifikácii pacientov s organickým podkladom neuropsychologických príznakov.

Podľa slov autorov obsahuje neuropsychológia u nás všeobecne zatiaľ len zárodky psychologickéj disciplíny. Chýbajú špecializované neuropsychologické pracoviská, metódy rehabilitácie a širší okruh odborníkov, ktorí by túto problematiku rozvíjali. Práve v predloženej publikácii sa kolektív českých autorov pokúsil spojiť prácu odborníkov z oblasti psychológie, neurológie, logopédie a psychiatrie a priniesť priere skúsenosťami v tomto odbore.

Autir rozdelili knihu do 6 častí. V úvode definujú predmet neuropsychológie v kontexte jeho vývoja a súčasného pohľadu na túto problematiku. V 1. časti sa venujú neuropsychologickému vyšetreniu a opisu dostupných techník. 2. časť sa zaoberá poruchami pamäti (včítane poruchami pamäti pri starnutí) a možnosťami liečby. 3. časť sa zaoberá hlavnými problémami neuropsychológie v klinickej praxi (demencia, Huntingtonova choroba, Parkinsonova choroba, neuropsychológia cievnych mozgových príhod, epilepsia, schizofrénia, neurotoxicita – vždy vo vzťahu k neuropsychológii). Vo 4. časti sa autori venujú problematike neuropsychológie a porúch reči. Počítačové testovacie batérie (metódy aplikovanej neuropsychológie) tvoria 5. časť a neuropsychologická rehabilitácia poslednú 6. časť.

Publikácia je spracovaná ako vedecká publikácia s dostatočným počtom vedeckých prameňov (literatúra je v závere každej časti), čo náročnému čitateľovi umožňuje vytvárať si vlastný náhľad v danej problematike. Publikáciu odporúčam do pozornosti nielen klinickým psychológom, ale aj neurológom, psychiatrom a praktickým lekárom, pre ktorých môže byť zdrojom ďalších informácií v spleti zložitých neuropsychologických vzťahov, v ktorých sa uvedení odborníci vo vzťahu k pacientom pohybujú.

M. Bernadič