

**ЗУРОЧКА ВЛАДИМИР АЛЕКСАНДРОВИЧ**

**ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА  
СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ АКТИВНОГО ЦЕНТРА  
ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО  
КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА (ГМ-КСФ)**

14.03.09 - клиническая иммунология, аллергология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

Екатеринбург– 2016

Работа выполнена в лаборатории иммунологии воспаления Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук

**Научные консультанты:**

академик РАН, доктор медицинских наук, профессор,

Черешнев  
Валерий Александрович

доктор медицинских наук, профессор

Гриценко  
Виктор Александрович

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, исполняющий обязанности директора, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии и серозидемиологии ФГБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»

Тотолян  
Арег Артемович

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России

Козлов  
Иван Генрихович

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фундаментальной и прикладной микробиологии ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России

Мавзютов  
Айрат Радикович

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» (г. Санкт-Петербург)

Защита состоится "\_\_\_" \_\_\_\_\_ 2016 года в 10-00 часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 004.027.02 на базе ИИФ УрО РАН (620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106)

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке УрО РАН и на сайте ИИФ УрО РАН - <http://iip.uran.ru>, с авторефератом – на сайте ВАК РФ <http://vak3.ed.gov.ru>.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 года

Ученый секретарь Совета Д 004.027.02  
на базе ИИФ УрО РАН,  
доктор медицинских наук, профессор

И.А. Тузанкина

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Получение новых химических соединений, обладающих иммуотропной активностью, является одной из актуальных задач современной иммунологии. Необходимость создания новых иммуоактивных соединений на основе эндогенных пептидов обусловлена важной ролью иммунной системы в развитии практически всех известных заболеваний. Иммунологический надзор относится к основным регуляторным системам организма, определяющим развитие, течение и исход различных патологических процессов (В.А. Черешнев, Е.Ю. Гусев, 2001; В.А. Черешнев, Б.Г. Юшков, 2005; В.А. Черешнев и соавт., 2008; Р.М. Хаитов и соавт., 2009; А.А. Ярилин, 2010).

Наиболее интересными в этой связи являются биологически активные молекулы, продуцируемые иммунокомпетентными клетками для поддержания гомеостаза организма, которые при определенных условиях могут стать надежными лекарственными препаратами, восстанавливающими поврежденные звенья иммунной системы. К таким препаратам относятся различные цитокины (С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев, 2008; А.С. Симбирцев, 2013), в том числе гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), нашедший широкое применение в клинической практике, прежде всего при лечении лейкозов (С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев 2008; В.А. Козлов и соавт., 2009; A. Van Nieuwenhuijze et al., 2013; A.F. Cruz et al., 2014).

В конце 90-х годов прошлого века из активного центра ГМ-КСФ были получены пептиды, обладающие активностью, идентичной цельной молекуле ГМ-КСФ (А.В. Зурочка и соавт., 1995; В.Е. Жемчугов, 2004; В.Е. Жемчугов, 2005). Все это позволило создать основу для дальнейшего изучения иммунобиологических свойств синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ. При этом очень важно знать обладают ли эти препараты дополнительными свойствами, и каков спектр их активности.

Одним из таких направлений является изучение иммуномодулирующих эффектов у новых соединений, наличия у них антимикробной активности, репаративного действия и других свойств.

В связи с постоянным формированием и расширяющейся циркуляцией антибиотикорезистентных возбудителей инфекционно-воспалительных заболеваний человека, остро стоит задача создания новых более эффективных лекарственных препаратов. Одним из наиболее приоритетных путей её решения является разработка антибактериальных средств на основе эндогенных антимикробных пептидов, которые относятся к гуморальным факторам системы врожденного иммунитета макроорганизма, обеспечивающим его защиту от патогенов (В.Н. Кокряков и соавт., 2006; 2010). (П.С. Громовых и соавт., 2004; А.С. Будихина, Б.В. Пинегин, 2008; О.В. Шамова и соавт., 2013). Благодаря ярко выраженным антимикробным свойствам и небольшому размеру молекул, эти пептиды рассматриваются как потенциальные агенты для лечения инфекционных заболеваний человека (Л.В. Ковальчук и соавт., 2003; Л.В. Волкова и соавт., 2005; О.А. Ганковская и соавт., 2008; C. Loose et al., 2006; A.E. Garcia et al., 2008).

Несомненными преимуществами антимикробных пептидов перед традиционными антибиотиками, в частности, при терапии латентных инфекций, являются более широкий спектр антибактериального действия, функциональная активность при малых концентрациях, практически полное отсутствие возможности формирования резистентности возбудителей к антимикробным пептидам, и возможность синтеза аналогов природных пептидов с измененными биологическими свойствами (Л.В. Волкова и соавт., 2005; О.В. Шамова и соавт., 2013).

Доклиническое изучение биологической активности веществ предусматривает определение их терапевтической эффективности. Одной из таких интегральных моделей является изучение влияния биологически активных молекул на процессы репарации тканей и заживления ран. На данной модели исследуются все основные механизмы воспалительного процесса (фазы альтерации, экссудации, образования струпа, регенеративно-пластические процессы, эпителизации и полного заживления ран первичным или вторичным натяжением), что позволяет более полно охарактеризовать иммунобиологическую активность любого активного соединения.

Многие пептиды обладают и другими свойствами, знание о которых может не только значительно расширить представления о характере их действия на макроорганизм, но и найти им более широкое применение в медицинской практике (Е.В. Ямщикова и соавт., 2012; О.В. Шамова и соавт., 2012; Г.М. Алешина и соавт., 2013; М.С. Жаркова и соавт., 2014).

Вовлеченность ГМ-КСФ в регуляцию гомеостаза и функциональной активности клеток иммунной системы, перспективность его использования в клинической практике, недостаточная изученность иммунобиологических свойств синтетических аналогов активного центра данного цитокина и потребность в создании более эффективных лекарственных препаратов послужили основанием для проведения настоящего исследования.

**Цель исследования** – выявление новых иммунобиологических свойств и механизмов действия синтетических пептидов активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ).

**Задачи исследования:**

1. Синтезировать различные варианты пептидов активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, выявить пептид, обладающий наиболее выраженными иммуностропными свойствами.
2. Выявить спектр иммуностропных эффектов синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора.
3. Определить наличие у синтетических пептидов активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора антимикробной активности в отношении микроорганизмов разной таксономической принадлежности.

4. Определить влияние синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора с выраженными иммуотропными свойствами на рост и размножение стафилококков разных видов и их биопленкообразование в условиях *in vitro*.
5. В модельных экспериментах на лабораторных животных оценить репаративное действие синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, обладающего иммуностимулирующими и антибактериальными свойствами.
6. С учетом выявленных плеiotропных эффектов синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора создать новые косметические репарационные средства.

**Методология и методы исследования.** Работа выполнена на базе лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН (Екатеринбург). Иммунологические, гистологические и другие исследования репарации ран проведены на 136 беспородных мышках-самцах (из питомника лабораторных животных «Светлые горы» (г. Москва)) в соответствии с рекомендациями и этическими нормами, указанными в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 1985). Все манипуляции с животными проводили под эфирным наркозом. Проведены эксперименты на 52 музейных и выделенных от больных людей штаммах грамотрицательных и грамположительных бактерий, а также 10 культурах грибов рода *Candida*. Для получения и изучения клеток крови использована кровь 60 здоровых доноров (образцы крови получены с учетом положений Хельсинской Декларации ВМА 2000 г. и протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г.); критерием отбора доноров являлось отсутствие хронических, аутоиммунных, аллергических заболеваний, отсутствие приема гормональных, иммуотропных и анаболических препаратов и наличие информированного согласия на использование биологического материала в научных целях. Исследования одобрены локальным этическим комитетом ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН протокол № 11 от 10 декабря 2015 г. В соответствии с поставленной целью в модельных экспериментах *in vitro* и *in vivo* изучено влияние синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ на пролиферативную активность лимфоцитов, хемотаксис и хемокинез фагоцитов, дифференцировку стволовых клеток, продукцию нейтрофилами цитокинов, рост и размножение микроорганизмов разных видов, биопленкообразование бактерий и репарационные процессы в ране.

**Степень достоверности, апробация результатов, личное участие автора.** Достоверность полученных результатов исследования обеспечена обоснованностью исходных теоретических позиций, достаточным объемом выборки, использованием широкого спектра адекватных и апробированных лабораторных методов и

сертифицированных наборов реагентов, воспроизводимостью результатов исследований, применением современных методов и компьютерных программ статистического анализа полученных данных. Достоверность результатов подтверждена актом проверки первичной документации от 15 апреля 2016 г.

Основные материалы диссертационной работы были представлены и обсуждены на конференциях «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2011, 2015), конференциях иммунологов Урала (Тюмень, 2012; Сыктывкар 2013; Екатеринбург, 2014; Пермь 2015), Объединенном иммунологическом форуме (Нижний Новгород, 2013), 7,8,9,10 Всероссийских конференциях с международным участием «Иммунологические чтения в г. Челябинске» (Челябинск 2012, 2013, 2014, 2015), на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Дни иммунологии в Сибири» (Абакан, 2011).

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования. Основная идея, планирование научной работы, включая формулировку рабочей гипотезы, определение методологии и общей концепции диссертационного исследования, формулировка цели и задач работы проводились совместно с научными консультантами: д.м.н., профессором, академиком РАН Черешневым Валерием Александровичем и д.м.н., профессором Гриценко Виктором Александровичем. Часть экспериментов проводилась совместно с сотрудниками Тюменского филиала Института клинической иммунологии СО РАМН (директор, д.м.н., профессор Суховой Ю.Г., д.м.н., профессор Петров С.А., к.б.н., Костоломова Е.Г., к.м.н. Унгер И.Г.), с сотрудниками лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН Института иммунологии и физиологии УрО РАН (директор академик РАН, д.м.н., профессор В.А.Черешнев, зав. лабораторией д.м.н., профессор Гусев Е.Ю., в.н.с., д.м.н., профессор Зурочка А.В., с.н.с., к.б.н., Зуева Е.Б., н.с., аспирант Добрынина М.А., аспирант Дукардт В.В.), лаборатории клеточного симбиоза ФГБУН Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН (директор д.м.н. С.В.Черкасов, зав. лабораторией д.м.н., профессор Гриценко В.А., аспирант Тяпаева Я.В., аспирант Белозерцева Ю.П.), НИИ Особо чистых биопрепаратов ФМБА России (директор института, д.м.н., профессор Симбирцев А.С., к.б.н. Колобов А.А.). Анализ современной отечественной и зарубежной литературы по исследуемой проблеме цитокинов и, в частности, ГМ-КСФ, организация и проведение экспериментальных исследований, статистическая обработка, интерпретация и обобщение полученного фактического материала, написание и оформление рукописи диссертации, представление результатов работы в научных публикациях и докладах на конференциях осуществлялись лично автором.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Наиболее активный синтетический пептид активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ZP2) с химической формулой – THR-NLE-NLE-ALA-SER-HIS-TYR-LYS-GLN-HIS-CYS-PRO отобран из широкого спектра синтезированных пептидов, который, помимо основного эффекта, стимуляция костномозгового кроветворения, обладает иммуномодулирующей, антибактериальной и

репарационной активностью.

2. Иммуномодулирующее действие пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ZP2) проявляется стимуляцией дифференцировки стволовых клеток в сторону гранулоцитопоза, усилением пролиферации лимфоцитов в реакции бластной трансформации лимфоцитов, активацией хемотаксиса и хемокинеза гранулоцитов и моноцитов периферической крови человека, а также повышением секреции нейтрофилами периферической крови человека следующих цитокинов: G-CSF, GM-CSF, IL-12p70, INF- $\gamma$ , IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-7, TNF- $\alpha$ , IL-8, MIP-1 $\beta$ .
3. Синтетический пептид активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ZP2) обладает выраженной антибактериальной активностью в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий, при этом в условиях *in vitro* преимущественно подавляет рост и размножение стафилококков, прежде всего *S. aureus*, и их биопленкообразование.
4. Пептид ZP2 более чем в 2 раза ускоряет у лабораторных животных репарацию ран, обеспечивая их заживление с восстановлением кожного и шерстяного покрова.
5. Иммуностимулирующие, антибактериальные и репарационные свойства пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора позволили создать лечебные косметические средства АЦЕГРАМ-спрей и АЦЕГРАМ-гель.

**Научная новизна работы.** Автором впервые выявлен ряд новых иммунобиологических свойств у синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ. В экспериментах *in vitro* исследованы новые механизмы действия этих пептидов на активность иммунокомпетентных клеток. Показано, что синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ (ZP2) с химической формулой – THR-NLE-NLE-ALA-SER- HIS-TYR-LYS-GLN-HIS-CYS-PRO обладает способностью усиливать пролиферацию лимфоцитов в РБТЛ, по активности сопоставимую со стандартным стимулятором – ФГА и другими иммуномодуляторами. Установлено, что данный пептид вызывает дифференцировку стволовых клеток в сторону гранулоцитопоза, стимулирует хемотаксис и хемокинез гранулоцитов и моноцитов периферической крови человека, а также активизирует секрецию нейтрофилами периферической крови человека следующих цитокинов: G-CSF, GM-CSF, IL-12p70, INF- $\gamma$ , IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-7, TNF- $\alpha$ , IL-8, MIP-1 $\beta$ ).

Автором впервые выявлена антибактериальная активность синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ (ZP2) в отношении грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов в условиях *in vitro*, выраженность которой зависела от концентрации препарата (дозозависимый эффект) и таксономической принадлежности бактерий. На примере клинических изолятов стафилококков охарактеризована внутривидовая

(межштаммовая) вариабельность чувствительности микроорганизмов к данному пептиду. Установлено, что синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ (ZP2) в условиях *in vitro* преимущественно подавляет рост и размножение стафилококков, прежде всего *S. aureus*, и их биопленкообразование.

Впервые показано, что пептид активного центра ГМ-КСФ (ZP2) влияет на основные механизмы репаративно-пластических процессов в ране, вызывая практически двукратное ускорение процессов заживления ран.

Сформированы предпосылки для производства на основе синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ (ZP2) лекарственных препаратов нового поколения, обладающих одновременно иммуностропными, антибактериальными и репарационными свойствами, что, в частности, реализовано при создании лечебных косметических средств АЦЕГРАМ-спрея и АЦЕГРАМ-геля. Научная новизна подтверждена 3 патентами на изобретения (Зурочка А.В. Способ повышения бактерицидной активности / Зурочка А.В., Суховой Ю.Г., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Петров С.А., Унгер И.Г., Костоломова Е.Г. // Патент № 2448725 С2 (Россия); опубл. 27.04.2012. Бюл. № 12. 5 с.; Зурочка А.В. Способ повышения репаративной активности / Зурочка А.В., Суховой Ю.Г., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Петров С.А., Унгер И.Г., Костоломова Е.Г. // Патент № 2455020 С2 (Россия); опубл. 10.07.2012. Бюл. № 19. 8 с.; Зурочка А.В. Способ повышения пролиферативной активности лимфоцитов периферической крови / Зурочка А.В., Суховой Ю.Г., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Петров С.А., Унгер И.Г., Костоломова Е.Г. // Патент № 2465001 С2 (Россия); опубл. 27.10.2012. Бюл. № 30. 6 с.).

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученные данные расширяют представления о спектре возможных биологических эффектов активного центра ГМ-КСФ и его синтетических аналогов. На основе выявленных у одного из синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ (ZP2) иммуномодулирующих свойств (стимуляция пролиферации лимфоцитов, хемотаксиса и хемокинеза фагоцитов, дифференцировки стволовых кроветворных клеток в сторону гранулоцитопоза, продукции широкого спектра цитокинов нейтрофилами), антибактериальной активности (дозозависимое ингибирование репродуктивного потенциала грамотрицательных и грамположительных бактерий, подавление биопленкообразования стафилококков) и репарационного действия (двукратное сокращение сроков заживления ран) сформированы теоретические предпосылки для создания лекарственных средств с комбинированными эффектами. Выявление иммуномодулирующих, антибактериальных и репарационных свойств синтетического активного центра ГМ-КСФ легло в основу создания и разработки косметических лечебных средств – АЦЕГРАМ-спрея и АЦЕГРАМ-геля (Сертификат соответствия № 467581 от 05.11.2014), обладающих иммуностропной, антимикробной и репарационной активностью, применяющиеся при поражениях кожи и слизистых гнойно-воспалительного генеза (слизистые горла и носа, урогенитального тракта), при травмах и ожогах, при других повреждениях кожи и слизистых, имеющих в своей основе инфекционную природу и иммунологическую дисфункцию.

**Конкурсная поддержка.** Работа поддержана грантами УрО РАН: № 12-У-4-1030 «Структурно-функциональный анализ природных катионных антимикробных пептидов и синтетических активных центров цитокинов с разработкой на их основе прототипов эффективных лекарственных средств с иммунокорригирующими и противоинфекционными свойствами» (2012-2014 гг.), № 15-3-4-33 «Разработка комбинированного лекарственного препарата, обладающего одновременно антибактериальными, иммуностимулирующими, репарационными свойствами на основе синтеза новых лекарственных соединений с заданными свойствами, полученных из активных синтетических пептидных центров цитокинов и их комбинаций с другими биологически активными веществами» (2015-2017 гг.), государственным контрактом № 02.512.11.2324. Шифр 2009-02-1.2-04-36-010 «Разработка антибиотиков нового поколения на основе бактерицидных эндогенных пептидов человека».

**Внедрение результатов исследования в практику.**

Результаты исследования внедрены в практику работы ООО «Медицинского лабораторного центра «Фамилия», в работу лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, ООО «Академический инновационный научный центр», в лабораторию клеточного симбиоза ФГБУН института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, в НИИ Особо чистых биопрепаратов ФМБА РФ, НПО «Верта», в работу кафедр микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВПО Ростовского государственного медицинского университета МЗ РФ, ФГБОУ ВПО Курского государственного медицинского университета МЗ РФ.

**Публикации.** Соискатель имеет 93 опубликованные работы, из них по теме диссертации опубликовано 45 научных работ общим объемом 7,2 печатных листа, в том числе 36 публикаций (13 статей, 23 кратких научных сообщений) в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций, получено 3 патента на изобретения.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 206 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», 3-х глав собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы, включающего 221 источников, из них 165 иностранных. Работа иллюстрирована 29 таблицами и 32 рисунками.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Материалы и методы исследований.** Исследования были проведены на 136 беспородных мышах-самцах (полученных из питомника лабораторных животных «Светлые горы», Москва). Проведены эксперименты на 60 штаммах грамотрицательных и грамположительных культур бактерий (как музейных штаммах, так и изолятов от больных пациентов) и 10 культурах грибов рода *Candida*. Для получения и изучения клеток крови

была использована кровь 60 здоровых доноров. Критерием отбора доноров являлось отсутствие хронических, аутоиммунных, аллергических заболеваний, отсутствие приема гормональных, иммуностропных и анаболических препаратов и наличие информированного согласия на использование биологического материала в научных целях.

**Синтез пептидов.** В работе использована стандартная методика синтеза пептидных последовательностей активного центра ГМ-КСФ. Синтез пептидов активного центра ГМ-КСФ проводился твердофазным способом на синтезаторе «Applied Biosystems 430A» по методу *in situ* использованием N $\alpha$ -Вос-защищенных производных аминокислот. Для блокирования боковых цепей трифункциональных аминокислотных остатков использованы защитные группы бензильного и уретанового типов. Присоединение аминокислотных остатков проводили методом 1-гидроксibenзотриазоловых эфиров, используя 5 кратные избытки реагентов. По завершении сборки полипептидной цепи пептидил полимер обрабатывали жидким фтористым водородом по Sn1/Sn2 механизмам в присутствии сквенджеров. Продукт высаживали диэтиловым эфиром и очищали методом препаративной обращенно-фазовой хроматографии до гомогенного состояния. Конечные продукты охарактеризованы данными аминокислотного и масс-спектрального анализов и аналитической ОФ ВЭЖХ. Аминокислотный состав полученных соединений и их молекулярный вес соответствовали теоретическим, чистота по данным аналитической ОФ ВЭЖХ была не менее 95%. Были синтезированы следующие пептиды активного центра ГМ-КСФ (с м. м. от 1794 до 1397 дальтон):

ZP1 – LYS-GLY-PRO-LEY-THR-NLE-NLE-ALA-SER-HIS-TYR-LYS-GLN-HIS-CYS-PRO

ZP2 – THR-NLE-NLE-ALA-SER-HIS-TYR-LYS-GLN-HIS-CYS-PRO

ZP3 – LEY-THR-NLE-NLE-ALA-SER-HIS-TYR-LYS-GLN-HIS-CYS-PRO

ZP4 – GLY-PRO-LEY-THR-NLE-NLE-ALA-SER-HIS-TYR-LYS-GLN-HIS- CYS-PRO

ZP5 – ALA-NLE-NLE-ALA-SER-HIS-TYR-LYS-GLN-HIS-CYS-PRO

ZP6 – THR-ALA-NLE-ALA-SER-HIS-TYR-LYS-GLN-HIS-CYS-PRO

ZP7 – THR-NLE-ALA-ALA-SER-HIS-TYR-LYS-GLN-HIS-CYS-PRO

ZP8 – THR-NLE-NLE-ALA-ALA-HIS-TYR-LYS-GLN-HIS-CYS-PRO

ZP9 – THR-NLE-NLE-ALA-SER-ALA-TYR-LYS-GLN-HIS-CYS-PRO

ZP10 – THR-NLE-NLE-ALA-SER-HIS-ALA-LYS-GLN-HIS-CYS-PRO

ZP11 – THR-NLE-NLE-ALA-SER-HIS-TYR-ALA-GLN-HIS-CYS-PRO

ZP12 – THR-NLE-NLE-ALA-SER-HIS-TYR-LYS-ALA-HIS-CYS-PRO

ZP13 – THR-NLE-NLE-ALA-SER-HIS-TYR-LYS-GLN-ALA-CYS-PRO

ZP14 – THR-NLE-NLE-ALA-SER-HIS-TYR-LYS-GLN-HIS-ALA-PRO

ZP15 – THR-NLE-NLE-ALA-SER-HIS-TYR-LYS-GLN-HIS-CYS-ALA

В качестве дополнительных контролей были использованы рекомбинантные пептиды HNP 1-3 (представитель семейства альфа-дефенсинов человека) и LL37 (представитель семейства кателицидинов) производства компании HyCultbiotechnology (Нидерланды).

### **Методы оценки иммунотропной активности синтетических пептидов ГМ-КСФ**

**Оценка пролиферативной активности.** РБТЛ оценивали методом проточной цитометрии (Справочник «Медицинские лабораторные технологии»..., 1999). Определяли пролиферативное действие полученных синтетических пептидов: ZP1– LYS-GLY-PRO-LEU-THR-NLE-NLE-ALA-SER-HIS-TYR-LYS-GLN-HIS-CYS-PRO и ZP2 – THR-NLE-NLE-ALA-SER- HIS-TYR-LYS-GLN-HIS-CYS-PRO в концентрациях 10 мкг/мл. В качестве контроля был использован ФГА («Дифко», США) в стандартной концентрации для РБТЛ (1 и 10 мкг/мл) и Интерлейкин 2 (ИЛ- 2) в концентрации 10 мкг/мл. Также была исследована РБТЛ при воздействии синтетических аналогов (аланинзамещенных пептидов) в концентрации 10 мкг/мл. В качестве сравнимого материала также было использовано вещество, полученное из супернатантов клеток CD34<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup> и коммерческие дефенсины LL37 и HNP.

**Оценка миграционной активности нейтрофилов и моноцитов периферической крови на синтетические пептиды активного центра ГМ-КСФ.** Для изучения хемотаксиса нейтрофилов периферической крови человека используется метод, предложенный R.D. Nelson et al., 1975, основанный на оценке миграционной активности лейкоцитов под агарозным гелем. Исследовалось влияние синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ (ZP2) в различных дозах-10-300 мкг/мл на хемотаксис и хемокинез нейтрофилов и моноцитов периферической крови.

**Оценка дифференцировки фетальных клеток *in vitro*.** Материалом для исследования служили фетальные (стволовые) клетки человека с фенотипом CD34<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup> (по протоколу ISHAGE) с жизнеспособностью 95% (в тесте с 7ADD), выделенные из криоконсервированного абортного материала (16–20 недель гестации, n=10). После добавления пептида ZP2 в дозе 10 мкг/мл каждые сутки исследовали субпопуляционный состав клеточной суспензии, с определением жизнеспособности и подсчетом цитоза. Фенотипирование клеточной суспензии проводили методом проточной цитометрии на проточном цитофлуориметре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, USA) с помощью специфических маркеров. Для определения фенотипа клеток в культуре используем двухцветные моноклональные антитела анти-pan-CD45- FITS и анти- CD34- PE (Beckman Coulter), краситель 7 ADD (Becton Dickenson) для определения жизнеспособности, пробирки TruCOUNT™ (Beckman Coulter), содержащие известное количество лиофилизированных полифлюорисцентных частиц для абсолютного счета, вместе со стратегией гейтирования, как описано в протоколе ISHAGE. Антигенный профиль оценивали в популяции лейкоцитов (гейтирование по CD45). В каждом образце анализировали не менее 5x10<sup>4</sup> клеток.

Степень дифференцировки фетальных (стволовых клеток) определяли с помощью набора 3-параметровых наборов моноклональных антител фирмы Beckman Coulter CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD13<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>. При помощи данных наборов антител

определяли процент и количество Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, НК-клеток, моноцитов и гранулоцитов (Зурочка А.В. и соавт., 2014).

**Метод оценки секреции цитокинов нейтрофилами *in vitro*.** Нейтрофилы, выделенные на двойном градиенте фиколл-верографина (метод выделения описан выше), доводили после промывки до концентрации  $5 \times 10^6$  клеток/мл, и инкубировали в среде RPNI-1640 в течение одного часа при  $37^\circ\text{C}$  в термостате. В опытных образцах добавляли синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ - ZP2 (химическая формула – THR-NLE-NLE-ALA-SER- HIS-TYR-LYS-GLN-HIS-CYS-PRO). Влияние данного пептида (в дозе 20 мкг/мл) на секрецию цитокинов определяли на приборе MagPix-100 (USA), с использованием иммунофлюоресцентных мультиплексных наборов компании БиоРад (США) для определения 17 цитокинов (G-CSF, GM-CSF, IL-10, IL-12p70, INF- $\gamma$ , IL-13, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, TNF- $\alpha$ , IL-8, MCP-1, MIP-1beta) в супернатантах клеток после 1 часа инкубации с нейтрофилами. Дополнительными контролями служили среда RPMI-1640, и среда RPMI-1640 с добавлением пептида в той же концентрации. Полученные результаты округляли до 0,1- 0,9 пкг/мл.

**Методы оценки антимикробной активности.** Антимикробная активность синтетических пептидов и других изученных веществ оценивалась общепринятым диско-диффузионным методом (Справочник по микробиологии и вирусологическим методам исследования..., 1982). Для этого в стерильные чашки Петри заливали 20 мл 2% официального мясо-пептонного агара, на подсушенную поверхность которого стерильным ватным тампоном, смоченным в 2-х миллиардной взвеси микробной культуры, засеивали сплошным газоном штаммы *Staphylococcus aureus* (n=10), *Escherichia coli* (n=10) и культуры грибов рода *Candida* (n=10) и раскладывали диски, пропитанные исследуемыми субстанциями путем погружения дисков в состав до полного пропитывания. Зоны подавления роста микроорганизмов учитывали через 18 ч, измеряя их диаметр в миллиметрах линейкой.

**Оценка кинетики роста микробных культур при воздействии пептидов активного центра ГМ-КСФ.** Опыты *in vitro* проведены на музейных культурах *Micrococcus luteus var. lysodeikticus* (ATCC 4698), *Staphylococcus aureus* 209P (ATCC 6538-P), *S. epidermidis* №711 (из коллекции ИКВС УрО РАН) и *Escherichia coli* K12 (ATCC 25922). В опытах использован синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ - ZP2. Влияние данного пептида на рост бактерий в мясопептонном бульоне (МПБ) через 2, 4, 6 и 24 часов инкубации определялось при внесении в нее ZP2 с градиентом концентраций: 10, 30 и 100 мкг/мл. Другая серия опытов *in vitro* проведена на 36 клинических штаммах стафилококков из коллекции ИКВС УрО РАН, в том числе на 24 культурах *Staphylococcus aureus* и 12 изолятах *S. epidermidis*, выделенных из ран у больных с синдромом диабетической стопы и отделяемого из влагалища у женщин с миомой матки (концентрация ZP2 в жидкой питательной среде – 10 мкг/мл; регистрация эффекта ZP2 на 4 и 24 часах инкубации). Все варианты опытов и контролей делались в 5 повторях.

Изучение влияния ZP2 на рост микроорганизмов осуществлялось путем инкубации бульонных культур бактерий в микроячейках стерильной пластиковой планшеты в присутствии синтетического пептида. Развитие бактерий в жидкой питательной среде оценивалось по динамике оптической плотности культуры (ОД), измеряемой на 0 (исходный уровень), 2, 4, 6 и 24 часах инкубации в каждой микроячейке при длине волны ( $\lambda$ ) 492 нм на Multiscan Accent (Thermo Labsystems, Финляндия).

Для определения степени влияния ZP2 на рост бактериальных культур рассчитывали Индекс ингибирования (ИИ, %) по формуле (Бухарин О.В., Гриценко В.А., 2000):

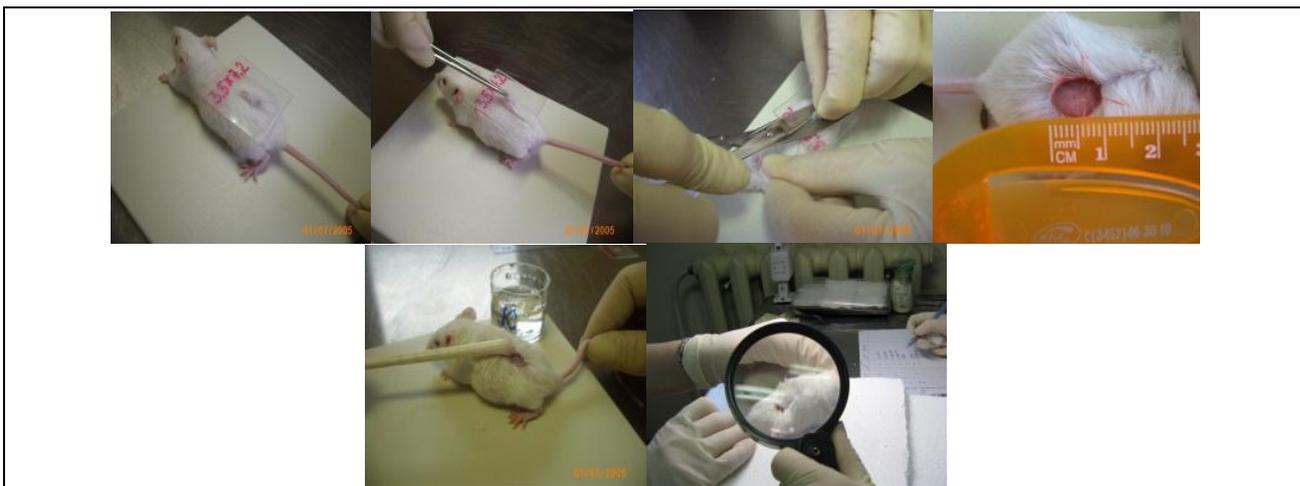
$$\text{ИИ} = (\text{ОДк} - \text{ОДо}) / \text{ОДк} * 100\%,$$

где ИИ – Индекс ингибирования (%); ОДк и ОДо – оптическая плотность контрольной и опытной культур соответственно. Индекс ингибирования бактериальных популяций оценивался на 4 и 24 часах. Чувствительными считались штаммы, если ИИ был больше 5%.

**Оценка влияния пептида ГМ-КСФ на биопленкообразование бактерий.** Опыты *in vitro* по влиянию синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 на биопленкообразование (БПО) бактерий проведены на 36 клинических штаммах стафилококков из коллекции ИКВС УрО РАН, в том числе на 24 культурах *Staphylococcus aureus* и 12 изолятах *S. epidermidis*, выделенных из ран у больных с синдромом диабетической стопы и отделяемого из влагалища у женщин с субмукозной миомой матки. Изучение влияния синтетического пептида ZP2 на БПО клинических изолятов стафилококков осуществлялось с помощью «планшетного метода» (по протоколу Stepanovic S. et al., 2007) путем их выращивания в стерильной 96-луночной полистироловой планшете. Для этого в микроячейки с 225 мкл мясопептонного бульона (МПБ) без синтетического пептида ZP2 (контроль) и с его наличием в концентрации 10 мкг/мл (опыт) вносили 25 мкл взвесей микроорганизмов, приготовленных из суточных агаровых культур бактерий и содержащих  $5 \times 10^8$  КОЕ/мл. После инкубирования планшет в течение 24 ч при 37°C из лунок удаляли планктонные клетки, отсасывая микропипеткой надосадок; образовавшиеся на дне микроячеек биопленки трехкратно отмывали 300 мкл стерильного фосфатно-солевого буфера (рН 7,2), фиксировали (подсушивание при 37°C в течение 2 ч) и окрашивали их 2% раствором кристаллвиолета (150 мкл; 15 мин при комнатной температуре), после чего лунки трех- или четырехкратно промывали дистиллированной водой (до ее полного просветления); для экстракции красителя из биопленок в лунки вносили по 200 мкл смеси этанола и уксусной кислоты (95:5), выдерживали 30 мин, а затем 150 мкл надосадка отсасывали и переносили в чистую планшету для замера оптической плотности (ОД) при длине волны 540 нм с помощью планшетного фотометра Multiscan Accent (Thermo Electron Co., China). Интенсивность окрашивания надосадка, рассчитанная путем вычитания из ОД (биопленка) ОД отрицательного контроля (лунка с МПБ без культуры бактерий), соответствовала степени биопленкообразования (БПО, усл. ед.) исследуемыми культурами стафилококков. Эксперименты делали в трех повторах, высчитывая средние значения БПО.

**Модель открытой раны.** Для стандартизации площади и глубины формирования раны использовался трафарет из тонкого оргстекла с отверстием размером 3,5x7,2 мм. Животному предварительно дается легкий эфирный наркоз – мышь помещается на 10 секунд в эксикатор, где лежит вата, обильно смоченная эфиром. Затем один исследователь фиксирует мышь руками, а другой – обрабатывает среднюю линию нижней трети спины мыши 70° спиртом, прикладывает трафарет, вытягивает за шерсть кожу на высоту 1 мм и делает срез стерильными хирургическими ножницами. При этом способе не затрагивается мышечный слой. В результате у мыши получается открытая рана площадью 7-10 мм<sup>2</sup> на глубину кожного покрова. Вся процедура занимает около 15 минут. Резанные раны были бледно-розовыми, гладкими, мягкими, без больших кровопотерь. После этого рана обрабатывается одним из тестируемых биологически активным веществом (рисунок 1).

Для анализа динамики заживления проводилось измерение площади раневой поверхности. Для этого на рану накладывалась стерильная пластинка целлофана и на нее маркером переносили контуры раны. Затем дважды проводили измерение диаметра контура раны штангенциркулем и с учетом среднего значения вычисляли площадь раны по формуле  $S = \pi \cdot A \cdot B$ , где А и В – радиусы овала. Затем рассчитывалось посуточное уменьшение площади раны в процентах.



**Рисунок 1 - Последовательность нанесения, обработки раны и наблюдение за динамикой репаративного процесса**

Проводилось ежедневное взвешивание животных через 2 часа после кормления, измерение ректальной температуры тела.

Для гистологического изучения материала выполняли биопсию раны. Отбор биопсийного материала производили на 1, 5, 7, 10 и 15 сутки от трёх животных из каждой экспериментальной группы. Материал фиксировали в 96% этиловом спирте, заливали в парафин и готовили гистологические срезы, которые окрашивали гематоксилином Майера и эозином с последующим анализом морфологической картины.

**Статистические методы исследования.** Результаты исследований обрабатывались на ПК под управлением операционной системы Windows XP с использованием пакета прикладных программ «Statistica for Windows 6.0» и применением методов

параметрической и непараметрической статистики (Лакин Г.Ф. 1990; Медик В.А. и соавт., 2000). Статистически значимыми считались отличия при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### I. Иммуностропные эффекты синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ

Поиск лекарственных средств защиты при различных заболеваниях, обладающих плейотропными свойствами, является одной из приоритетных задач современной науки. Как показано ранее в обзоре литературы, одними из таких средств могут быть биологически активные синтетические пептидные центры ГМ-КСФ (Зурочка А.В. и соавт. 1995; Жемчугов В.Е. и соавт., 2004-2005).

Прежде чем исследовать антибактериальные и другие свойства синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ, было проанализировано влияние этих пептидов и их аланинзамещенных синтетических аналогов на реакцию бластной трансформации лимфоцитов (РБТЛ). РБТЛ относится к стандартной методике выявления иммуностропных свойств у различных химических соединений. Именно поэтому данная реакция была выбрана как основная для оценки иммуностропного действия исследуемых синтетических пептидов.

На первом этапе было изучено влияние 2 пептидов (обладающих колониестимулирующей активностью аналогичной основной молекуле ГМ-КСФ) ZP1 – LYS-GLY-PRO-LEU-THR-NLE-NLE-ALA-SER-HIS-TYR-LYS-GLN-HIS-CYS-PRO и ZP2 – THR-NLE-NLE-ALA-SER- HIS-TYR-LYS-GLN-HIS-CYS-PRO.

Как показали результаты исследования, оба пептида обладали способностью вызывать бластную трансформацию лимфоцитов *in vitro*. При этом надо отметить, что пептид, состоящий из 12 аминокислот (ZP2), обладал значительно более высокой активностью как по сравнению с пептидом, состоящим из 16 аминокислот, так и по сравнению со стандартным митогеном ФГА и ИЛ-2 (таблица 1) [8, 13,25,38].

**Таблица 1 - Изучение влияния пептидов активного центра ГМ-КСФ на РБТЛ**

№	Исследуемое вещество	Содержание бластных клеток, %
1	Спонтанный уровень	11,65 ± 1,3
2	ФГА - 1 мкг/мл	26,2 ± 1,7
3	ФГА - 10 мкг/мл	62,85 ± 2,8*
4	ИЛ-2 - 10 мкг/мл	72,46 ± 3,24*
5	ZP1 - 10 мкг/мл	46,55 ± 4,1*
6	ZP2 - 10 мкг/мл	97,35 ± 5,4*,**

*Примечание:* \*  $p < 0,05$  по отношению к спонтанному уровню РБТЛ; \*\*  $p < 0,05$  по отношению к ИЛ-2 и ФГА. ZP – синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ.

Таким образом, синтетические пептиды вызывают бластную трансформацию лимфоцитов. Последнее свидетельствует о возможности их влияния на процессы пролиферации клеток и об их выраженной иммуностимулирующей активности.

Следующим этапом исследований было изучение влияния различных синтетических аналогов наиболее активного синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ с помощью замены каждой аминокислоты в составе пептида ZP2 на аланин (аланинзамещенные пептиды).

Как показали проведенные исследования, синтез аланинзамещенных аналогов (замена одной из аминокислот на аланин) приводила к инактивации иммуностимулирующего их действия, что свидетельствует о том, что эффекты связаны с биологически активной молекулой, состоящей из 12 аминокислот в определенной последовательности, а именно THR-NLE-NLE-ALA-SER- HIS-TYR-LYS-GLN-HIS-CYS-PRO (ZP2) [8, 13,25,38].

В последующем было проведено сравнение иммуностимулирующей активности полученного пептида с другими соединениями, обладающими иммуностимулирующей и антибактериальной активностями. В качестве сравниваемых веществ были выбраны дефенсины LL37, HNP и вещество из супернатантов клеток CD34<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup>.

Дефенсины LL37 и HNP практически не влияли на бластную трансформацию лимфоцитов. В то же время как по отдельности, так и в различных комбинациях с веществом из супернатантов клеток CD34<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup> синтетический пептид ГМ-КСФ (ZP2) вызывал бластную трансформацию лимфоцитов *in vitro* в различных соотношениях и дозах препаратов, при этом эффект действия сохранялся до концентраций 10 мкг/мл (таблица 2) [8, 9, 13, 15, 16, 25, 38].

Метод оценки хемотаксиса и хемокинеза нейтрофилов и моноцитов периферической крови под агарозой позволяет не только оценить локомоторную функцию лейкоцитов, но и определить наличие хемотаксических рецепторов к хемоаттрактантам на данных типах клеток (R.D. Nelson et al., 1975). Поэтому было важно оценить как хемотаксическую активность нейтрофилов и моноцитов периферической крови по отношению к синтетическому пептиду активного центра ГМ-КСФ, так и их хемокинетическую активность [18, 19, 32, 36].

Учитывая, что наибольшей иммуностимулирующей активностью обладал пептид ZP2 – THR-NLE-NLE-ALA-SER- HIS-TYR-LYS-GLN-HIS-CYS-PRO, в дальнейшем исследовалось его влияние в дозах 10, 30, 100, 300 мкг/мл на хемотаксис и хемокинез нейтрофилов и моноцитов периферической крови условно-здоровых доноров.

Как показали исследования, синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ обладал в широком диапазоне доз свойствами хемоаттрактанта, вызывая как целенаправленное движение клеток грануляцитарно-макрофагального ростка кроветворения против градиента концентрации пептида, так и усиливая хемокинез клеток (таблица 3) [16, 18, 19, 32, 36].

Эти данные свидетельствуют не только о том, что исследуемый пептид обладает способностью вызывать хемотаксис (а значит, привлекать, например, фагоциты в очаг

повреждения или место введения препарата), но и о том, что на клетках этого ряда имеются хемотаксические рецепторы к нему. Что подтверждает результаты, полученные В.Е. Жемчуговым (2004), о том, что данные пептиды взаимодействуют с основным рецептором к ГМ-КСФ на гранулоцитах и макрофагах.

**Таблица 2 - Изучение влияния различных комбинаций синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ (ZP2) и вещества из супернатантов клеток CD34<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup> на РБТЛ лимфоцитов**

№	Исследуемые вещества	Концентрация [мкг/мл]	n	РБТЛ
1	ZP2	300 мкг/мл	10	65,0 ± 0,84*
2	ZP2	30 мкг/мл	10	67,0 ± 0,48*
3	ZP2	10 мкг/мл	10	68,5 ± 0,12*
4	Вещество из супернатанта CD34 <sup>+</sup> CD45 <sup>dim</sup> клеток	300 мкг/мл	10	69,0 ± 0,24*
5	Вещество из супернатанта CD34 <sup>+</sup> CD45 <sup>dim</sup> клеток	30 мкг/мл	10	69,5 ± 0,60*
6	Вещество из супернатанта CD34 <sup>+</sup> CD45 <sup>dim</sup> клеток	10 мкг/мл	10	69,0 ± 0,36*
7	Комбинация ZP2 + Вещество из супернатанта CD34 <sup>+</sup> CD45 <sup>dim</sup> клеток	300 мкг/мл + 300 мкг/мл	10	66,75 ± 0,36*
8	Комбинация ZP2 + Вещество из супернатанта CD34 <sup>+</sup> CD45 <sup>dim</sup> клеток	300 мкг/мл + 30 мкг/мл	10	66,25 ± 0,84*
9	Комбинация ZP2 + Вещество из супернатанта CD34 <sup>+</sup> CD45 <sup>dim</sup> клеток	300 мкг/мл + 10 мкг/мл	10	65,75 ± 0,72*
10	Комбинация Вещество из супернатанта CD34 <sup>+</sup> CD45 <sup>dim</sup> клеток + ZP2	300 мкг/мл + 30 мкг/мл	10	68,25 ± 0,36*
11	Комбинация Вещество из супернатанта CD34 <sup>+</sup> CD45 <sup>dim</sup> клеток + ZP2	300 мкг/мл + 10 мкг/мл	10	66,25 ± 0,36*
12	Комбинация Вещество из супернатанта CD34 <sup>+</sup> CD45 <sup>dim</sup> клеток + ZP2	30 мкг/мл + 30 мкг/мл	10	70,0 ± 0,36*
13	Комбинация Вещество из супернатанта CD34 <sup>+</sup> CD45 <sup>dim</sup> клеток + ZP2	10 мкг/мл + 10 мкг/мл	10	70,75 ± 0,12*
14	Дефенсин LL37	300 мкг/мл	10	12,3 ± 0,13
15	Дефенсин HNP	300 мкг/мл	10	10,22 ± 0,11
16	Спонтанная РБТЛ		10	10,25 ± 0,36

*Примечание:* \* p < 0,05 по отношению к спонтанному уровню РБТЛ; ZP2 – синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ.

Как показали ранние исследования (Жемчугов В.Е. и соавт., 1996), синтетические пептиды активного центра ГМ-КСФ обладают колониестимулирующими свойствами, усиливая колониобразование клеток гранулоцитаро-макрофагального ростка кроветворения. Вместе с тем оставалось неясным, способны ли данные пептиды вызывать целенаправленную дифференцировку клеток этого ростка кроветворения. Фетальные клетки плода печени представляют собой, по сути, кроветворные стволовые клетки, поэтому являются достаточно адекватной моделью при оценке влияния различных биологически активных веществ на дифференцировку стволовых клеток (Г.Т. Сухих, 1998; В.С. Репин, 2001; Г.Т. Сухих и соавт., 2002; В. С. Репин и соавт., 2002; J. Cai, M.S.Rao, 2002; М.Н. Dahlke, Н.Ј. Schlitt, 2003; С. Di Campli et al., 2003; М. Franchini, 2003).

**Таблица 3 - Оценка влияния различных доз пептида ГМ-КСФ (ZP2) на хемотаксис нейтрофилов и моноцитов условно-здоровых доноров *in vitro***

Исследуемые показатели	Статистические показатели	Группы				
		Контрольная (среда 199) Спонтанная миграция	Опыт пептид ГМ-КСФ (ZP2) В дозе 10 мкг/мл	Опыт пептид ГМ-КСФ (ZP2) В дозе 30 мкг/мл	Опыт пептид ГМ-КСФ (ZP2) В дозе 100 мкг/мл	Опыт пептид ГМ-КСФ (ZP2) В дозе 300 мкг/мл
		n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
Индекс хемотаксиса нейтрофилов к пептиду ГМ-КСФ (ZP2)	M±m p	1,01±0,05	1,44±0,11 <0,05	1,56±0,12 <0,05	1,64±0,13 <0,05	1,78±0,13 <0,05
Индекс Хемотаксиса моноцитов к пептиду ГМ-КСФ (ZP2)	M±m p	1,01±0,05	1,54±0,11 <0,05	1,66±0,12 <0,05	1,78±0,13 <0,05	1,82±0,13 <0,05
Индекс Хемокинеза нейтрофилов к пептиду ГМ-КСФ (ZP2)	M±m p	1,01±0,05	1,52±0,11 <0,05	1,69±0,12 <0,05	1,72±0,13 <0,05	1,89±0,13 <0,05
Индекс Хемокинеза моноцитов к пептиду ГМ-КСФ (ZP2)	M±m p	1,01±0,05	1,62±0,11 <0,05	1,73±0,12 <0,05	1,79±0,13 <0,05	1,88±0,13 <0,05

*Примечание:* p - достоверность различий между исследуемыми группами и спонтанной миграцией клеток, p <0,05; ZP2 – синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ.

Исследование влияния пептида активного центра ГМ-КСФ (ZP2) и вещества из супернатанта CD34<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup> клеток, а так же их комбинаций выявило, что при добавлении в среду культивирования пептида ГМ-КСФ, практически в 1,5 раза увеличивалась

дифференцировка клеток гранулоцитарного ряда, что приводило к некоторому снижению количества жизнеспособных клеток и значительному снижению стволовых клеток уже к 1 суткам культивирования. Последнее вполне объяснимо, так как время жизни нейтрофилов значительно меньше, чем лимфоцитов, натуральных киллеров и моноцитов, и стволовые клетки, уходя в дифференцировку гранулоцитов «расходуются» значительно быстрее (таблицы 4-5) [4, 10, 15, 18, 26].

**Таблица 4 - Культивирование стволовых клеток и их дифференцировка при добавлении пептида активного центра ГМ-КСФ в дозе 30 мкг/мл и/или вещества из супернатанта CD34<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup> клеток. Цитоз клеток (n=10)**

Исследуемые параметры	Исходное количество	1 сутки	2 сутки	3 сутки	4 сутки	5 сутки	6 сутки	7 сутки
Спонтанная дифференцировка (контроль), $\times 10^6$	1,0 $\pm$ 0,0	0,9 $\pm$ 0,01	0,7 $\pm$ 0,009	0,05 $\pm$ 0,002	0,01 $\pm$ 0,001	0,008 $\pm$ 0,0002	0,006 $\pm$ 0,0003	0,004 $\pm$ 0,0003
Вещество из супернатанта CD34 <sup>+</sup> CD45 <sup>dim</sup> клеток в дозе 30 мкг/мл, $\times 10^6$	1,0 $\pm$ 0,0	0,9 $\pm$ 0,01	0,7 $\pm$ 0,009	0,05 $\pm$ 0,002	0,01 $\pm$ 0,001	0,008 $\pm$ 0,0002	0,006 $\pm$ 0,0003	0,004 $\pm$ 0,0003
ZP2 в дозе 30 мкг/мл, $\times 10^6$	1,0 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,01	0,4 $\pm$ 0,007 *	0,03 $\pm$ 0,002 *	0,009 $\pm$ 0,0002 *	0,009 $\pm$ 0,0004 *	0,005 $\pm$ 0,0003 *	0,003 $\pm$ 0,0001
Комбинация ZP2 и вещества из супернатанта CD34 <sup>+</sup> CD45 <sup>dim</sup> клеток в дозе 30 мкг/мл, $\times 10^6$	1,0 $\pm$ 0,0	0,9 $\pm$ 0,01	0,8 $\pm$ 0,009	0,2 $\pm$ 0,003 *	0,08 $\pm$ 0,0003 *	0,01 $\pm$ 0,0005	0,008 $\pm$ 0,0003	0,006 $\pm$ 0,0002 *

*Примечание:* \*  $p < 0,05$  по отношению к контролю; ZP2 – синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ.

Вещество из супернатанта CD34<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup> клеток практически не влияло на характер дифференцировки клеток, при этом несколько тормозило гибель всех субпопуляций дифференцирующихся клеток. Комбинация пептида ГМ-КСФ и вещества несколько снижала дифференцировочную активность ГМ-КСФ в сторону гранулоцитарного ростка кроветворения, и приводило к уменьшению гибели клеток и снижению скорости дифференцировки стволовых клеток в зрелые нейтрофилы, моноциты и лимфоциты. По-видимому, в плане дифференцировки пептид ГМ-КСФ и вещество из супернатантов CD34<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup> клеток являются функциональными антагонистами при дифференцировке стволовых клеток.

Активация гранулоцитопоэза синтетическим пептидом активного центра ГМ-КСФ была также подтверждена другими авторами на модели радиационно-индуцированной

миелосупрессии, где авторами было показано, что данный пептид стимулировал гранулоцитопоез, после облучения у мышей *in vivo* (А.В. Аклеев и соавт., 2014).

**Таблица 5 - Культивирование клеток и их дифференцировка в CD13<sup>+</sup>/45<sup>+</sup>(нейтрофилы) при добавлении пептида активного центра ГМ-КСФ в дозе 30 мкг/мл и/или вещества из супернатанта CD34<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup> клеток (n=10)**

Исследуемые параметры	Исходное количество	1 сутки	2 сутки	3 сутки	4 сутки	5 сутки	6 сутки	7 сутки
Спонтанная дифференцировка (контроль), %	0,0±0,0	76,1± 1,21	46,2± 0,72	42,4± 0,72	50,4± 0,61	48,3± 0,61	49,4± 0,72	51,4± 0,84
Вещество из супернатанта CD34 <sup>+</sup> CD45 <sup>dim</sup> клеток в дозе 30 мкг/мл, %	0,0±0,0	75,3± 1,2	39,3± 1,2	40,3± 0,966	48,4± 1,2	48,4± 1,2	47,4± 0,96	50,0± 0,96
ZP2 в дозе 30 мкг/мл, %	0,0±0,0	90,4± 2,4*	71,5± 1,2*	50,4± 1,2*	51,4± 0,96	50,4± 1,2	56,6± 0,96	62,5± 1,2*
Комбинация ZP2 и вещества из супернатанта CD34 <sup>+</sup> CD45 <sup>dim</sup> клеток в дозе 30 мкг/мл, %	0,0±0,0	80,3± 2,4	44,0± 1,2	46,4± 1,2	52,4± 2,4	5,6± 1,2	49,4± 0,96,4	52,2± 0,96

*Примечание:* \*  $p < 0,05$  по отношению к контролю; ZP2 – синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ.

Учитывая, что синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ вызывал усиление дифференцировки кроветворных стволовых клеток в гранулоциты, и наличие хемотаксических рецепторов к нему на гранулоцитах (см. результаты описанные выше), было важно определить обладает ли он свойствами характерными для основного цитокина ГМ-КСФ - усиливать секрецию различных цитокинов клетками, в том числе и периферической крови, и в первую очередь нейтрофилами. Учитывая, что зрелые нейтрофилы относятся к короткоживущим клеткам (максимальный срок жизни от нескольких дней до 14 суток), важно было разработать методику оценки секреции нейтрофилами цитокинов при короткой инкубации в питательной среде, и оценить возможность исследования продукции цитокинов при кратковременной инкубации с биологически активными веществами. С этой целью проводилось исследование уровня спонтанной и индуцированной пептидом ГМ-КСФ продукции цитокинов в супернатантах

нейтрофилов после 1 часовой инкубации при 37°C в среде RPMI-1640 с и без добавления пептида.

Как показали полученные данные, инкубация нейтрофилов с синтетическим пептидом активного центра ГМ-КСФ - ZP2 оказывала заметное влияние на секрецию значительного количества цитокинов (таблица 6) [6,17,18,40].

При этом важно отметить, что тест система на выявление ГМ-КСФ показывает увеличение концентрации ГМ-КСФ в среде RPMI-1640 при инкубации с пептидом. Это возможно говорит о том, что тест система, в какой-то мере, улавливает пептид активного центра ГМ-КСФ, как гомолог самого цитокина, но скорее всего степень связывания его не велика, ввиду незначительного размера пептида.

**Таблица 6 - Изучение влияния синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ на секрецию цитокинов нейтрофилами периферической крови человека**

Цитокины	Стат. показатели	Среда RPMI-1640	Среда RPMI-1640 + пептид	Супернатант нейтрофилов	Супернатант нейтрофилов + пептид
G-CSF, пкг/мл	M±m	16,2±1,5	17,1±1,3	19,3±1,6	34,6±2,7 <sup>*,**</sup>
GM-CSF, пкг/мл	M±m	210,2±6,2	251,3±7,3 <sup>*</sup>	250,3±5,6 <sup>*</sup>	277,6±7,3 <sup>*,**</sup>
IL-10, пкг/мл	M±m	32,2±2,6	38,1±3,2	35,4±3,4	42,3±4,3
IL-12p70, пкг/мл	M±m	13,3±1,7	17,2±1,9	23,5±1,6	60,5±4,2 <sup>*,**</sup>
INF-γ, пкг/мл	M±m	13,2±1,3	13,1±1,4	13,5±1,5	23,6±2,7 <sup>*,**</sup>
IL-13, пкг/мл	M±m	10,1±1,1	10,3±1,4	11,4±1,3	18,6±3,8
IL-17A, пкг/мл	M±m	29,5±2,6	29,4±3,4	62,5±5,6 <sup>*</sup>	337,8±11,8 <sup>*,**</sup>
IL-1β, пкг/мл	M±m	13,4±1,5	14,1±1,6	42,3±3,4 <sup>*</sup>	287,5±16,8 <sup>*,**</sup>
IL-2, пкг/мл	M±m	35,5±3,5	35,3±3,8	38,4±4,5	49,2±6,8
IL-4, пкг/мл	M±m	17,3±1,8	18,1±2,1	23,5±2,4	53,5±5,9 <sup>*,**</sup>
IL-5, пкг/мл	M±m	9,1±1,1	9,4±1,5	9,5±1,3	12,7±2,3
IL-6, пкг/мл	M±m	17,6±1,8	18,4±2,1	122,5±9,7 <sup>*</sup>	1574,6±76,8 <sup>*,**</sup>
IL-7, пкг/мл	M±m	10,3±1,2	10,3±1,5	12,5±1,6	18,6±2,2 <sup>*,**</sup>
TNF-alfa, пкг/мл	M±m	15,3±1,8	15,4±1,6	16,2±1,9	67,7±6,7 <sup>*,**</sup>
IL-8, пкг/мл	M±m	13,4±2,3	14,4±2,2	320,9±14,5 <sup>*</sup>	3541,7±211,4 <sup>*,**</sup>
MCP-1, пкг/мл	M±m	12,7±1,8	12,6±1,6	12,4±1,9	19,4±3,7
MIP-1beta, пкг/мл	M±m	40,7±4,8	40,2±4,9	1492,8±72,7 <sup>*</sup>	12538,2±768,9 <sup>*,**</sup>

*Примечание:* \* p<0,05 - по отношению к среде RPMI-1640, \*\* p<0,05 - по отношению к супернатантам нейтрофилов.

При спонтанной продукции цитокинов после 1 часовой инкубации в среде RPMI-1640, нейтрофилы способны секретировать в окружающую среду (супернатант) цитокины, такие как GM-CSF, IL-17A, IL-1β, IL-6, IL-8, MIP-1beta. Инкубация нейтрофилов с синтетическим пептидом активного центра ГМ-КСФ с одной стороны вызывает достоверное увеличение спектра секретируемых клетками цитокинов, а с другой стороны

резко увеличивает продукцию ряда цитокинов. Так, пептид ГМ-КСФ стимулировал секрецию цитокинов G-CSF, GM-CSF, IL-12p70, INF- $\gamma$ , IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-7, TNF- $\alpha$ , IL-8, MIP-1beta, при этом наиболее выраженное усиление секреции было выявлено для 5 цитокинов- IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, MIP-1beta.

Полученные данные свидетельствуют о том, что синтетических пептид активного центра ГМ-КСФ, помимо иммуностимулирующего действия, обладает способностью активировать регуляторные механизмы клеток периферической крови и, в частности, нейтрофилов, что расширяет возможности применения лекарственных препаратов на его основе для коррекции состояний с нарушенной функцией секреции цитокинов. В то же время способность данного препарата усиливать провоспалительную цитокино-продукцию должна учитываться в тех ситуациях, где активация данных механизмов является противопоказанием для назначения препаратов со сходным механизмом действия, или там, где при развитии патологического процесса имеется выраженная секреция таких цитокинов как IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, MIP-1beta.

Таким образом, выявленный и охарактеризованный синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ (ZP2) обладает иммуотропной активностью в широком диапазоне концентраций и имеет рецептор на клетках гранулоцитарно-макрофагального ростка кроветворения, а так же способен вызывать дифференцировку стволовых кроветворных клеток в сторону гранулоцитарного ряда и активировать продукцию нейтрофилами широкого спектра цитокинов.

Поэтому, необходимо было выявить наличие других биологических свойств у данного пептида. Одним из таких направлений является поиск у эндогенных пептидов антимикробной активности.

## **II. Антибактериальная активность синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ**

На первом этапе изучения антимикробной активности синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ были проведены исследования влияния различных концентраций полученных пептидов на рост госпитальных штаммов *S. aureus* 155, *E. coli* 2290 и *Candida albicans* на плотной питательной среде. Одновременно были проведены сравнительные исследования активности других бактерицидных соединений (супернатантов клеток мононуклеарного ряда, тромбодифенсина, интерцида, коммерческих дифенсинов LL 37, HNP, растворенных как в фосфатно-солевом буфере, так и физиологическом растворе).

Полученные результаты выявили наличие антибактериальной активности у следующих образцов: 1пик МНК, интерцид, пептид 1, пептид 2, LL 37, HNP [2,14, 37].

Установлено, что выраженной бактерицидной активностью в отношении *S. aureus* 155 обладают коммерческие БЭП LL 37 и HNP, растворенные в буферном растворе в концентрации 10 мкг/мл (20,1 $\pm$ 1,9 и 22,2 $\pm$ 2,15 мм диаметр зоны подавления роста микроорганизма соответственно). У них же в той же концентрации проявляется самая высокая антибактериальная активность в отношении *E. coli* 2290 (23,2 $\pm$ 1,7 и 24,7 $\pm$ 2,15 мм

диаметр зоны подавления роста микроорганизма соответственно). Подобной же активностью обладает полученный пептид (ZP2), состоящий из 12 аминокислот. У него ингибирующая активность в отношении *S. aureus* 155 и *E. coli* 2290 достоверно не отличалась от известных коммерческих БЭП и составила соответственно  $22,3 \pm 2,16$  и  $19,6 \pm 1,6$  мм диаметр зоны подавления роста микроорганизмов. Отличие было лишь в том, что подобная антибактериальная активность проявилась не только в буферном растворе, но и при разведении в физиологическом растворе (коммерческие дефенсины в физиологическом растворе являются неактивными).

В отношении *S. aureus* 155 и *E. coli* 2290 антибактериальная активность проявилась также у интерцида (диаметры зон подавления роста микроорганизмов составили  $15,1 \pm 0,9$  в концентрации 10 мг/мл и  $10,3 \pm 0,6$  мм – при 30 мг/мл соответственно). Однако его активность была ниже в отношении *S. aureus* 155 в 1,3-1,5 раза, а в отношении *E. coli* 2290 в 2,2-2,4 раза по сравнению с анализируемыми коммерческими БЭП.

Другие полученные фракции супернатантов клеток крови человека антимикробную активность демонстрировали только в отношении *S. aureus* 155.

**Таблица 7 - Оценка антимикробной активности различных синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ. (n=10)**

Пептид	Концентрация [мкг/мл]	<i>S. aureus</i> (n=10)	<i>E. coli</i> (n=10)	<i>Candida albicans</i> (n=10)
ZP1	30	$9,6 \pm 0,8^*$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
ZP2	30	$22,3 \pm 2,16^*$	$19,6 \pm 1,6^*$	$0,0 \pm 0,0$
ZP3	30	$7,3 \pm 0,5^*$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
ZP4	30	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
ZP5	30	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
ZP6	30	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
ZP7	30	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
ZP8	30	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
ZP9	30	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
ZP10	30	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
ZP11	30	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
ZP12	30	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
ZP13	30	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
ZP14	30	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
ZP15	30	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$

Примечание: \* -  $p < 0,05$  по сравнению синтетическими аналогами; ZP – синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ.

Так, у 1 пика МНК диаметр зоны подавления роста микроорганизма соответственно в концентрациях 3, 10 и 30 мг/мл составила  $7,06 \pm 0,5$ ;  $10,8 \pm 0,9$  и  $12,1 \pm 1,1$  мм, а у ZP1 в

концентрациях 10 и 30 мг/мл – соответственно  $11,5 \pm 1,9$  и  $9,6 \pm 0,8$  мм. Однако их активность была ниже в 1,7-1,9 раза анализируемых коммерческих БЭП.

В отношении *Candida albicans* ни один исследуемый пептид не проявил бактерицидную активность, в том числе и коммерческие БЭП (LL 37 и HNP).

Таким образом, выявлена антибактериальная активность у синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ, которая была максимальной у ZP2, при этом его активность проявлялась не только в фосфатно-солевом буфере, но и физиологическом растворе в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Наличие противогрибковой активности не было обнаружено ни у одного исследуемого образца.

Для того чтобы установить минимальный размер пептида активного центра ГМ-КСФ, обладающий антибактериальной активностью, была проведена следующая серия экспериментов. В структуре ZP2, были последовательно заменены аминокислоты на аланин и получены синтетические аналоги ZP2, отличающиеся только тем, что была последовательно произведена замена каждой аминокислоты на аланин (аланинзамещенные аналоги активного центра ГМ-КСФ) (таблица 7) [2,7, 14, 22,30,34,37].

Исследования показали, что только два из полученных синтетические пептиды ZP1(химическая формула – LYS-GLY-PRO-LEY-THR-NLE-NLE-ALA-SER-HIS-TYR-LYS-GLN-HIS-CYS-PRO) и ZP2 (химическая формула – THR-NLE-NLE-ALA-SER- HIS-TYR-LYS-GLN-HIS-CYS-PRO), помимо основного эффекта (иммуностимулирующего), обладают антибактериальной активностью в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий. Все изученные вещества не действовали на грибы.

Таким образом, замена любой аминокислоты на аланин в структуре пептида ZP2 ведет к инактивации бактерицидного эффекта, по-видимому, последовательность из 12-ти аминокислотных остатков (THR-NLE-NLE-ALA-SER- HIS-TYR-LYS-GLN-HIS-CYS-PRO) является минимальной цепочкой пептидов, обладающих антибактериальной активностью.

Синтез аланинзамещенных аналогов (замена одной из аминокислот на аланин) приводила к инактивации антибактериального действия пептидов, что свидетельствует о том, что антибактериальные эффекты связаны с биологически активной молекулой состоящей из 12 аминокислот в определенной последовательности (ZP2 – THR-NLE-NLE-ALA-SER- HIS-TYR-LYS-GLN-HIS-CYS-PRO).

Для выявления эффективности полученного соединения была проведена сравнительная оценка бактерицидности пептида ZP2 и вещества, выделенного из супернатантов клеток CD34+45<sup>dim</sup>. Изучена антимикробная активность супернатантов клеток CD34+45<sup>dim</sup> и комбинации супернатантов этих клеток и ZP2 в различных концентрациях.

Во всех исследованных концентрациях и дозах и при различных комбинациях пептид и вещество обладали антибактериальной активностью. Важно отметить, что при комбинировании пептида из активного центра ГМ-КСФ с веществами, полученными из супернатантов CD34+45<sup>dim</sup> клеток предшественников гемопоэза, их антибактериальная

активность значительно возрастает, при этом происходит потенцирование действия обоих препаратов (таблица 8) [2,7, 14, 22,30,34,37].

Полученные данные свидетельствуют не только о новых свойствах синтетических пептидов ГМ-КСФ, но и расширяют представления о возможных механизмах действия данных синтетических соединений.

Таким образом, возможный спектр действия препаратов, с учетом выявленных новых свойств, позволяет применять данные средства не только в иммунологии, но и в других областях медицины, например, в хирургической, акушерско-гинекологической и инфекционной практике.

В дальнейшем было проведено изучение дозозависимого влияния синтетического пептида ГМ-КСФ на рост бактериальных культур в жидкой питательной среде *in vitro* [7,10,21,22,34,37].

**Таблица 8 – Сравнительная характеристика антибактериальной активности синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ и супернатантов клеток CD34<sup>+</sup>45<sup>dim</sup>**

№	Исследуемые средства	Концентрация [мг/мл]	n	Диаметр зоны подавления, мм		
				<i>S. aureus</i> 155	<i>E. coli</i> 2290	<i>Candida albicans</i>
1.	ZP2	0,3	10	18,4±2,4	14,0 ±1,6*	0,0 ±0,0
		0,03	10	24,4 ±2,3*	17,6 ±1,6*	0,0 ±0,0
		0,01	10	12,2 ±1,6*	10,3 ±1,8*	0,0 ±0,0
2	Вещество из супернатанта CD 34 <sup>+</sup> клеток	0,3	10	25,4 ±3,8*	19,6 ±3,6*	0,0 ±0,0
		0,03	10	22,4 ±2,8*	17,6 ±2,6*	0,0 ±0,0
		0,01	10	20,4 ±1,8*	13,6 ±1,6*	0,0 ±0,0
3	Вещество из супернатанта CD 34 <sup>+</sup> клеток + ZP2	0,3+0,3	10	12,3 ±1.4*	9,2 ± 1.2*	0,0 ±0,0
		0,3+0,03	10	25,4 ±3.2*	20,3 ±2.8*	0,0 ±0,0
		0,3+0,01	10	28.6 ±3,4*	19,4 ± 2,3*	0,0 ±0,0
4	Вещество из супернатанта CD 34 <sup>+</sup> клеток + ZP2	0,3+0,3	10	12,3 ±1.4*	9,2 ± 1.2*	0,0 ±0,0
		0,03+0,3	10	25,4 ± 3,6*	22,4 ± 2,6*	0,0 ±0,0
		0,01+0,3	10	31,3 ± 2,2*	24,3 ± 2,2*	0,0 ±0,0
5	Вещество из супернатанта CD 34 <sup>+</sup> клеток + ZP2	0,3+0,3	10	12,3 ±1.4	9,2 ± 1.2*	0,0 ±0,0
		0,03+,0,03	10	18,4 ± 1,6*	22,5 ± 2,8*	0,0 ±0,0
		0,01+0,01	10	22,2 ± 1,8*	19,6 ± 2,6*	0,0 ±0,0

*Примечание:* \* p<0,05 по отношению к негативному контролю; ZP – синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ.

Прежде чем приступить к изучению различных механизмов антибактериального действия синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ (ZP2), было исследовано его

дозозависимое влияние на рост и размножение бульонных культур эталонных (музейных) штаммов микрококков, стафилококков и кишечной палочки.

Выявлено, что синтетический пептид ZP2, добавленный в МПБ, существенно и дозозависимо влиял на рост всех изученных музейных штаммов бактерий – *M. luteus var. lysodeikticus* (ATCC 4698), *S. aureus* 209P, *S. epidermidis* №711 и *E. coli* K12, снижая их биомассу, оцениваемую по величине оптической плотности контрольных и опытных культур в динамике их развития (рисунок 2) [1, 5, 37, 44, 45].

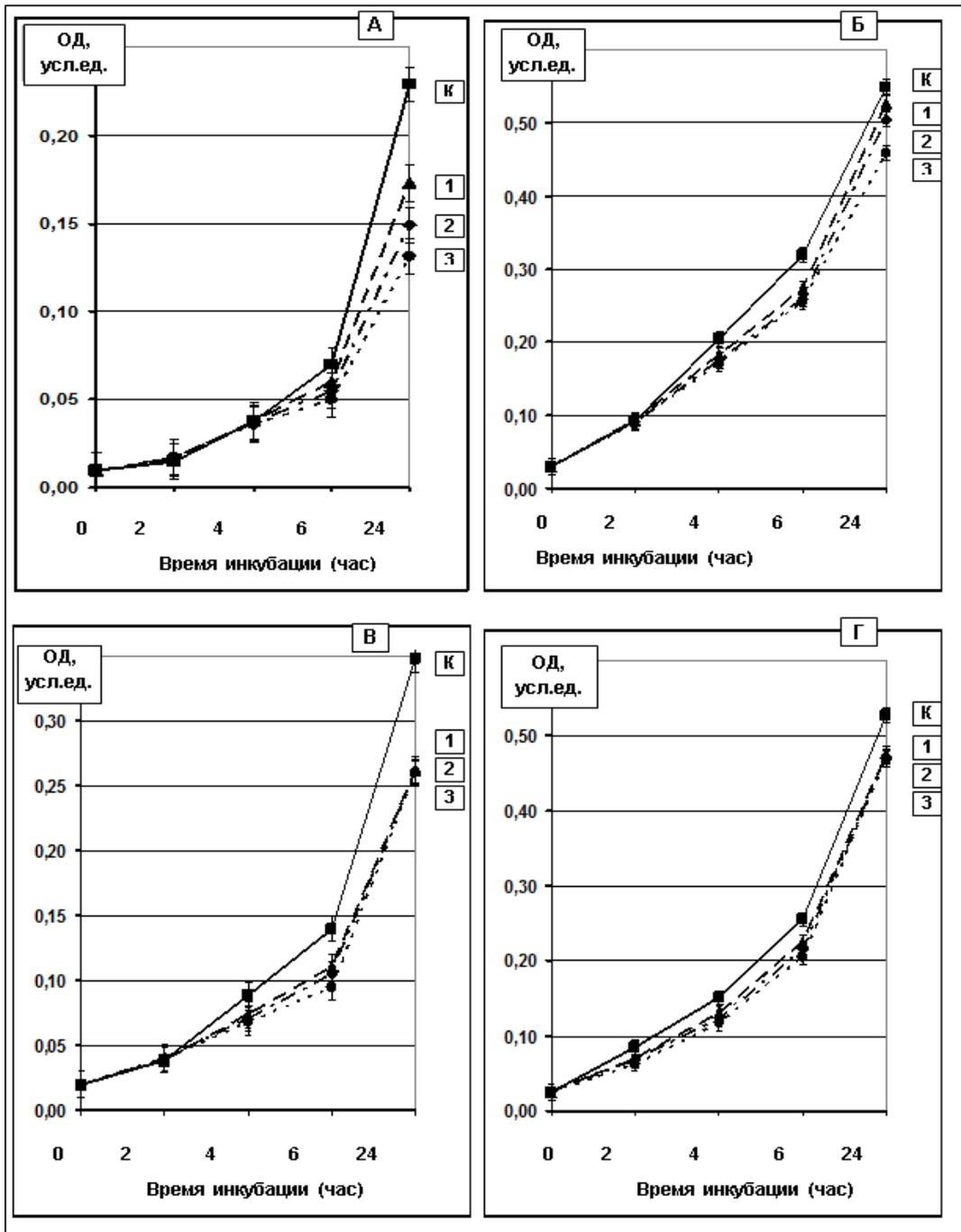


Рисунок 2 - Влияние на рост популяций *Micrococcus luteus var. lysodeikticus* (А), *S. aureus* 209P (Б), *S. epidermidis* №711 (В) и *E. coli* K12 (Г) в МПБ (ОД, усл. ед.) пептида ZP2 при разной концентрации (мкг/мл): 1 – 10; 2 – 30; 3 – 100; К – контроль

Общей закономерностью ингибирующего эффекта ZP2 в отношении стафилококков являлось то, что его выраженность нарастала в промежутке с 2 до 6 часов инкубации. Следует отметить, что через 2 часа культивирования стафилококков в присутствии ZP2 заметного ингибирования роста бактерий не наблюдалось. Более того, в отношении *S. epidermidis* №711 регистрировалась слабо выраженная ( $3,8 \pm 0,4$  и  $2,6 \pm 0,4\%$ ) стимуляция роста бактерий под действием ZP2 в концентрациях 30 и 100 мкг/мл соответственно. Такой «парадоксальный», но более выраженный (13,3-15,3%), стимулирующий эффект ZP2 также выявлен в отношении *M. luteus var. lysodeikticus* (ATCC 4698).

Очевидно, реакция на данный пептид бактериальных клеток грамположительных кокков, взятых из периодических культур в стационарную фазу развития, отличается от таковой микроорганизмов, находящихся в стадии роста, – первые проявляют к нему большую устойчивость, чем вторые, возможно, за счет тех изменений бактериальной стенки, которые характерны для стафилококков, переходящих в стационарное состояние – увеличение количества слоев муреинового пептидогликана и пептидных «перекрестно-связывающих мостиков», накопление тейхоевых или потейхоевых кислот и др. (О.В. Кислухина и соавт. 1990; Д.Г. Дерябин, 2005). Это явление наблюдалось и у стафилококков при воздействии ZP2. Так, уже на 4 часах инкубации биомасса опытных культур стафилококков была заметно (на 11,2-23,6%,  $p < 0,05$ ) меньше, чем в контроле, вне зависимости от видовой принадлежности бактерий, хотя Индексы ингибирования *S. epidermidis* №711 превышали таковые у *S. aureus* 209P, что свидетельствовало о большей их чувствительности к антибактериальному действию ZP2. К 6-ому часу культивирования ингибирующий эффект синтетического пептида ZP2 нарастал, достигая для *S. aureus* 209P уровня 14,7-20,3%, а для *S. epidermidis* №711 – 21,4-32,1% (в обоих случаях – дозозависимо от концентрации пептида).

Отметим одну зарегистрированную особенность действия ZP2 на рост *S. aureus* 209P и *S. epidermidis* №711 – индексы ингибирования золотистого стафилококка к 24 часам снижались (относительно 6 часов) и не превышали 4,2-16,5%, в то время как значения этого показателя для эпидермального стафилококка оставались практически на тех же уровнях (24,7-25,3%). Возможно, это связано с различиями в репродуктивном потенциале изученных штаммов стафилококков – в контроле после 24 часов культивирования биомасса *S. epidermidis* №711 была на 36,7% ниже, чем биомасса *S. aureus* 209P (ОД – 0,348 против 0,550).

Принципиально иначе синтетический пептид ZP2 влиял на динамику роста в МПБ музейного штамма *Escherichia coli* K12. Как и в случае со стафилококками, он дозозависимо (в диапазоне изученных концентраций 10-100 мкг/мл) ингибировал накопление биомассы кишечной палочки, но в отличие от грамположительных кокков максимально сильно тормозил ее прирост на самых ранних этапах развития культуры (на 2 часах – 17,6-25,9%), постепенно снижая свое ингибирующее действие на более поздних сроках инкубации (на 4 и 6 часах) до 13,9-22,5% и 11,8-19,6% соответственно, которое достигало минимума на 24 часах – 9,9-11,0%. Иначе говоря, эшерихии исходно проявляли более выраженную

чувствительность к данному пептиду, а затем, очевидно, путем «включения» каких-то адаптивных механизмов (например, за счет изменения химического состава, степени гидрофильности/гидрофобности, архитектоники клеточной стенки и др. (M.R.Yeaman, N.Y.Yount, 2003), приспособлялись к его антибактериальному действию.

Представленные данные о влиянии синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ - ZP2 на рост музейных штаммов стафилококков и эшерихий в жидкой питательной среде свидетельствуют о дозозависимом и «видоспецифичном» ингибировании развития бактериальных культур в присутствии этого пептида, что в целом согласуется с ранее полученными результатами. Важно отметить, что клетки *E. coli* K12, взятые из «стационарных» (суточных) агаровых культур оказались более чувствительными к антибактериальному действию пептида ZP2, чем стафилококки.

Поскольку стафилококки и энтеробактерии, вызывающие многие инфекционно-воспалительные заболевания, в том числе эндогенной природы, нередко проявляют устойчивость к используемым в клинике антибиотикам и химиопрепаратам, разработка новых эффективных лекарственных препаратов для борьбы с данной патологией остается актуальной проблемой. В этом плане синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ - ZP2 является весьма перспективным кандидатом, так как обладает не только антибактериальной активностью в отношении грамположительной и грамотрицательной микрофлоры, но и проявляет широкий спектр иных «полезных» биоэффектов.

Анализируя характер влияния синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ - ZP2 на рост музейных штаммов стафилококков и кишечной палочки, следует подчеркнуть имеющееся сходство и выявленные таксономические отличия реакции этих бактерий на данный пептид. Вне зависимости от родовой/видовой принадлежности микроорганизмов они реагировали на присутствие в жидкой питательной среде синтетического пептида ZP2, который дозозависимо ингибировал их рост. Однако динамика ингибирующего эффекта ZP2 была, в известном смысле, видо- (или штаммо-) специфична, поскольку каждая изученная культура бактерий демонстрировала своеобразную (фазозависимую) кинетику накопления биомассы в присутствии указанного пептида.

Вместе с тем пока отсутствуют данные об особенностях влияния этого синтетического пептида на рост в жидкой питательной среде грамположительных кокков, принадлежащих к разным таксонам (род/вид) и отличающихся друг от друга степенью патогенности.

В этой связи, был проведен анализ характера влияния синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ - ZP2 на рост в жидкой питательной среде клинических изолятов грамположительных кокков разной таксономической принадлежности.

Клинические штаммы *S. aureus* и *S. epidermidis* характеризовались широкой вариабельностью по уровню своей чувствительности к ингибирующему действию синтетического пептида ZP2. Так, значения индекса ингибирования (ИИ) роста золотистых стафилококков колебались в диапазоне 5,2-24,4 и 5,1-59,2%, а эпидермальных стафилококков – 5,1-42,7 и 5,3-58,4% (на 4 и 24 часах соответственно), что

свидетельствовало о выраженном межштаммовом разнообразии клинических изолятов стафилококков по степени их чувствительности к ZP2 (таблица 9).

**Таблица 9 - Параметры чувствительности клинических штаммов стафилококков к антибактериальному действию синтетического пептида ZP2**

Параметры чувствительности	Значения параметров у разных видов стафилококков	
	<i>S. aureus</i> (n=24)	<i>S. epidermidis</i> (n=12)
Доля чувствительных к ZP2 штаммов, (%):		
- на 4 часах	75,0±9,0	91,7±8,3
- на 24 часах	91,7±5,8	67,7±14,2
Диапазон Индекса ингибирования, (%):		
- на 4 часах	5,2-24,4	5,1-42,7
- на 24 часах	5,1-59,2	5,3-58,4
Средние значения Индекса ингибирования, (%):		
- на 4 часах	15,2±1,7	20,8±3,7
- на 24 часах	30,5±3,8	21,1±6,6

Необходимо отметить, что средние значения ИИ роста чувствительных к ZP2 клинических штаммов *S. aureus* в процессе инкубации возрастали с 15,2±1,7% (на 4 часах) до 30,5±3,8% (на 24 часах), тогда как у клинических изолятов *S. epidermidis* средние значения ИИ в зависимости от фазы культивирования практически не изменялись и соответственно составили 20,8±3,7 и 21,1±6,6%.

Таким образом, несмотря на выявленную меж- и внутривидовую вариабельность чувствительности стафилококков к антибактериальному действию синтетического пептида ZP2, рост в жидкой питательной среде большинства клинических изолятов данных микроорганизмов существенно ингибировался указанным пептидом даже в низких концентрациях (10 мкг/мл), что определяет перспективность его использования при лечении инфекционно-воспалительных заболеваний стафилококковой этиологии, в том числе эндогенной природы (Д.Г. Дерябин, 2000).

В то же время влияние синтетического пептида ZP2 на качественные (биологические, патогенные, персистентные) свойства микроорганизмов пока не охарактеризовано, что послужило побудительным мотивом для проведения следующего исследования. В качестве «биомишени» была выбрана способность микроорганизмов формировать биопленки, поскольку данное свойство относится к факторам персистенции и адаптации бактерий, в том числе стафилококков (О.В. Бухарин, В.А. Гриценко, 2000; G.A. O'Toole et al., 2000).

С этой целью была проведена оценка влияния синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) – ZP2 на формирование биопленок клиническими изолятами стафилококков разных видов в экспериментах *in vitro*.

Сравнительный анализ средних значений степени биопленкообразования (БПО) клинических изолятов *S. aureus* (n=24) и *S. epidermidis* (n=24) показал, что золотистые стафилококки по этому показателю значительно (в 2 раза) уступали эпидермальным стафилококкам ( $0,44 \pm 0,04$  против  $0,87 \pm 0,14$  усл. ед.;  $p < 0,01$ ). Это отражает межвидовые отличия золотистых и коагулазоотрицательных стафилококков по способности формировать биопленки, на что ранее указывали другие авторы (E. O'Neill et al., 2007). В тоже время следует отметить наличие выраженной внутривидовой вариабельности данного признака, о чем свидетельствовали широкие диапазоны варьирования БПО у клинических изолятов *S. aureus* и *S. epidermidis* (соответственно  $0,20-0,93$  и  $0,31-2,06$  усл. ед.).

Оценивая влияние синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 на формирование биопленок клиническими штаммами *S. aureus* и *S. epidermidis*, можно констатировать, что независимо от родовой принадлежности стафилококков под действием данного пептида у изученных бактерий наблюдалось ингибирование способности к БПО: в среднем на 22,2% – для золотистого стафилококка (с  $0,44 \pm 0,04$  до  $0,36 \pm 0,04$  усл. ед.) и на 33,8% – для эпидермального стафилококка (с  $0,87 \pm 0,14$  до  $0,65 \pm 0,10$  усл. ед.).

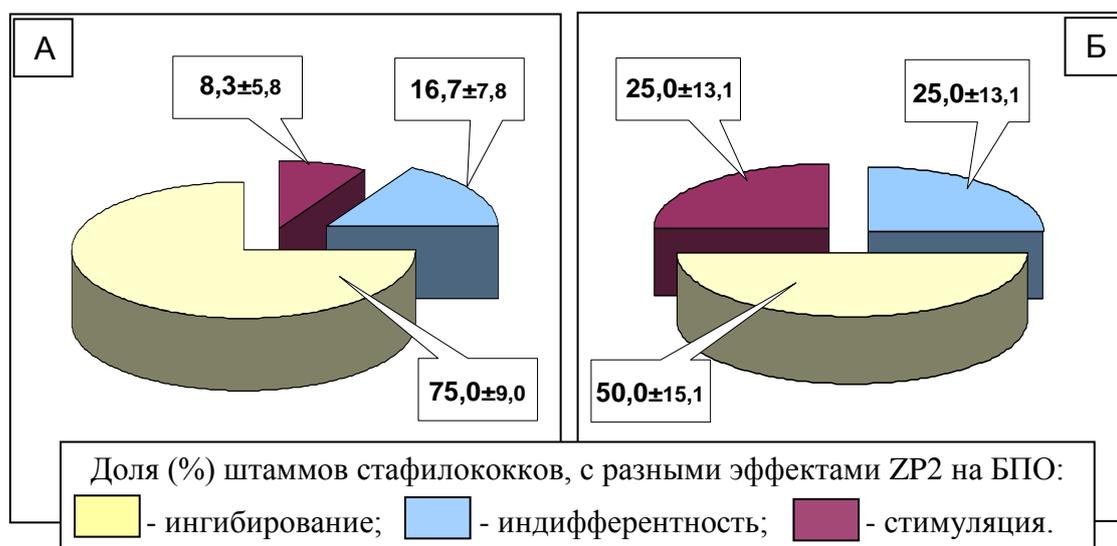
Вместе с тем, при детальном анализе влияния синтетического пептида ZP2 на биопленкообразование отдельными штаммами стафилококков (в парах контроль – опыт) было отмечено, что данный пептид оказывал разнонаправленное действие на способность формировать биопленки как клиническими изолятами *S. aureus*, так и культурами *S. epidermidis* (рисунок 3).

В структуре клинических штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis* кроме изолятов стафилококков, у которых выявлялся ингибирующий эффект синтетического пептида ZP2 на БПО, имелись культуры бактерий (16,7 и 25,0% соответственно) с индифферентной реакцией на него, а также определенная доля штаммов золотистых и эпидермальных стафилококков, у которых под действием данного пептида происходила стимуляция способности к формированию биопленок (8,3 и 25,0% соответственно).

Эти результаты свидетельствовали о выраженной внутривидовой вариабельности стафилококков разных родов не только по способности к формированию биопленок, но и по реакции на действие синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2, что может быть связано с наличием в изученных выборках разных клоновых линий стафилококков, у которых генетическая детерминация БПО может иметь существенные отличия (E. O'Neill et al., 2007).

Исследования показали, что синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ – ZP2 угнетал формирование биопленок у  $75,0 \pm 9,0\%$  штаммов *S. aureus* и  $50,0 \pm 15,1\%$  штаммов *S. epidermidis* со средним уровнем ингибирования формирования биопленок на  $25,1 \pm 3,8$  и  $50,4 \pm 6,0\%$  соответственно (рисунок 3).

Вместе с тем, среди клинических изолятов стафилококков встречалось 8,3-25,0% штаммов, у которых под действием пептида в данной концентрации наблюдалась стимуляция образования биопленок на 14,9-48,5%, а также 16,7-25,0% культур, у которых формирование биопленок не изменялось (таблица 10). [1,16, 37,43, 45]



**Рисунок 3 – Структура клинических штаммов *S. aureus* (А) и *S. epidermidis* (Б) с учетом влияния синтетического пептида ZP2 на формирование у них биопленок (доля штаммов стафилококков, %)**

**Таблица 10 - Влияние синтетического пептида ZP2 на биообразование (БПО) клиническими штаммами стафилококков**

Параметры биообразования (БПО) бактерий	Значения параметров у разных видов стафилококков	
	<i>S. aureus</i> (n=24)	<i>S. epidermidis</i> (n=12)
Количество штаммов бактерий, у которых ZP2 ингибировал БПО, абс. (%)	18 (75,0±9,0)	6 (50,0±15,1)
Диапазон ингибирования БПО (min-max, %)	6,6-24,4	31,7-69,8
Средние значения уровня ингибирования БПО (%):	25,1±3,8	50,4±6,0*
Количество штаммов бактерий, у которых ZP2 не изменял БПО, абс. (%)	4 (16,7±7,8)	3 (25,0±13,1)
Количество штаммов бактерий, у которых ZP2 стимулировал БПО, абс. (%)	2 (8,3±5,8)	3 (25,0±13,1)
Диапазон стимуляции БПО (min-max, %)	18,1-21,6	28,6-48,5
Средние значения уровня стимуляции БПО (%):	19,9±1,8	39,8±5,9*

*Примечание:* \* - достоверность отличий между группами,  $p < 0,05$ ; ZP2 – синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ.

Полученные данные, с одной стороны, свидетельствуют о межвидовых отличиях *S. aureus* и *S. epidermidis* по способности формировать биопленки, подтверждая хорошо известное гено- и фенотипическое своеобразие коагулазопозитивных и коагулазонегативных стафилококков (Д.Г.Дерябин, 2000; I.V. Ivanov et al. 2010), с другой стороны, указывают на возможность наличия видовых особенностей генетической

детерминации или регуляции экспрессии биопленкообразования у стафилококков разной таксономической принадлежности (D.Mack et al., 2004; J.O'Gara , 2007; E.A. Izano et al., 2008).

Выявленная внутривидовая вариабельность стафилококков, по выраженности данного свойства, вполне согласуется с последним предположением и, очевидно, отражает не только экологическую детерминированность биофильей бактерий (О.В.Бухарин, В.А. Гриценко, 2000), но и присутствие в изученных выборках клинических штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis* различных клоновых линий, отличающихся между собой по совокупности биологических характеристик, включая их антибиотикорезистентность, факторы патогенности/вирулентности и персистентные свойства, в том числе БПО, на что неоднократно указывали разные авторы (О.В. Бухарин и соавт. 1997; S. Croes et al., 2009).

Нельзя исключить, что именно с этими причинами связана описанная выше вариабельность эффектов синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 в отношении способности клинических изолятов стафилококков формировать биопленки.

Сложная (вероятно, поликомпонентная) система генетического контроля за продукцией биопленок стафилококками (в частности, *S. aureus* и *S. epidermidis*) пока не позволяет четко определить точку приложения («биомишень») синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2. Возможно, действие данного синтетического пептида на стафилококки реализуется не по одному, а по нескольким «каналам воздействия», для выяснения чего требуется проведение дальнейших исследований.

Таким образом, синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ – ZP2 оказывает на формирование биопленок клиническими штаммами стафилококков разнонаправленное, но преимущественно ингибирующее действие, выраженность которого характеризуется меж- и внутривидовой (штаммовой) вариабельностью.

Учитывая полученные данные, было проведено дополнительное сравнение векторов изменения репродуктивного потенциала клеток и их биопленкообразования по штаммам микроорганизмов. Такое сравнение выявило, что, несмотря на наличие штаммового разнообразия пептид ZP2 у всех исследуемых штаммов или снижал рост и размножение бактерий или их биопленкообразование, при этом штаммы *S. aureus*, как правило, имели сочетание этих двух эффектов, а у *S. epidermidis* наблюдался либо тот, либо другой эффект. При этом у всех изученных клинических изолятов стафилококков не выявлено сочетание индифферентных или стимулирующих ответов.

Таким образом, синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ - ZP2, обладает антибактериальной активностью, и имеет как минимум 2 механизма действия на бактерии: снижает их репродуктивный потенциал и биопленкообразование, при этом оба этих механизма не взаимосвязаны. Полученные данные служат перспективной основой для применения данного вещества в качестве антибактериального средства против широкого спектра микроорганизмов как, безусловно, патогенных, так и условно-патогенных.

В то же время оставалось не совсем ясным, какой биологический смысл имеет столь широкое разнообразие биологических иммунотропных и одновременно антимикробных

эффектов? Одним из таких возможных знаменателей служит поддержание постоянства внутренней среды организма - а именно восстановление поврежденных тканей (или активация репаративно-пластических процессов).

### **III. Репаративные эффекты синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ**

С целью изучения репаративно-пластических процессов, было изучено влияние синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ, обладающих иммуностропным и антибактериальным действием в сравнении с различными биологически активными веществами, имеющими антибактериальные свойства на репарацию ран в эксперименте. В первой серии экспериментов были проведены сравнительные изучение репарации ран на беспородных мышах. Препараты с разным действующим веществом наносили на раны шпателем. Исследуемые препараты наносили на раны через день в количестве 100 мкл. в течение 5 дней.

Исследование проведено на 56 лабораторных мышах, самцах, возрастом 4-6 месяцев. Животные были разделены на 7 равных групп: 6 – опытных и 1 контрольную. В качестве тестируемых биологически активных веществ были выбраны 6 препаратов – антибиотик пептид HNP1-3, антибиотик пептид LL37, тромбодифенсин, интерцид, ZP1 (химическая формула – LYS-GLY-PRO-LEU-THR-NLE-NLE-ALA-SER-HIS-TYR-LYS-GLN-HIS-CYS-PRO) и ZP2 (химическая формула – THR-NLE-NLE-ALA-SER- HIS-TYR-LYS-GLN-HIS-CYS-PRO), приготовленных на гелевой основе. Контрольным животным рану обрабатывали гелевым раствором.

Результаты показали, что все исследуемые препараты не оказывали статистически значимого влияния на вес животных в течение всего процесса наблюдения. Исследование температуры тела выявило, что в течение первых суток после нанесения раны, с одной стороны, у всех опытных животных температура тела повысилась на 0,5-0,7°C, с другой – все тестируемые препараты в той или иной степени способствовали снижению температуры тела у опытных животных относительно контрольных. К 11 суткам после нанесения раны температура тела у всех животных практически стабилизировалась.

Из результатов измерения площади раневой поверхности было выявлено, что у контрольных животных фаза острого воспаления длится 2 суток, фаза пролиферации – 4 суток (с пиком активности на 4 сутки), фаза эпителизации – 10 суток (пик активности на 7 сутки). 100% эпителизация раневой поверхности у животных из контрольной группы произошла на 16 сутки.

Под влиянием HNP фаза воспаления длилась 3 суток (на 1 сутки больше, чем в контроле), фаза пролиферации 2 суток (с пиком активности на 4 сутки), а фаза эпителизации – растянута на 8 суток (на 2 суток меньше, чем в контроле). 100% эпителизация раневой поверхности у животных из данной группы произошла на 15 сутки, что на 1 сутки меньше, чем в контроле.

Под влиянием LL37 фаза воспаления длилась 3 суток (на 1 сутки больше, чем в контроле), фаза пролиферации 3 суток (пик активности приходился на 5 сутки), фаза

эпителизации – 8 суток (на 2 суток меньше, чем в контроле). 100% эпителизация раны у животных из данной группы произошла на 15 сутки.

Действие препарата тромбодифенсина на процессы репарации несколько отличается от действия предыдущих веществ. Под влиянием тромбодифенсина фазы воспаления и пролиферации длятся по 2 суток, а фаза эпителизации растянута на 12 суток. 100% эпителизация раны у животных из данной группы произошла на 17 сутки, то есть больше на 1 сутки, чем у контрольных животных.

Под влиянием интерцида самая высокая активность процессов репарации характерна для фазы воспаления, которая длится 1 сутки и практически в 2 раза выше, чем у контрольных животных. Фаза пролиферации длится 3 суток (пик активности на 4 сутки), а фаза эпителизации растянута на 12 суток. 100% эпителизация раны у животных из данной группы произошла на 18 сутки, то есть на 2 суток позже, чем у контрольных животных.

Под влиянием препарата ZP1 фаза воспаления длится одни сутки, между фазой воспаления и пролиферации не происходит снижения активности репаративных процессов, и фаза воспаления плавно переходит в фазу пролиферации, которая длится 2 суток. Процесс эпителизации начинается на 5 сутки с максимумом активности на 6 сутки. 100% эпителизация раны у животных из данной группы произошла на 15 сутки, то есть на 1 сутки раньше, чем у контрольных животных.

Под влиянием синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ- ZP2 фаза воспаления и пролиферации протекают взаимосвязано и очень активно около 3 суток. При этом процесс эпителизации начинается очень рано – на 3 сутки с максимумом активности на 4 сутки. 100% эпителизация раны у животных из данной группы произошла на 11 сутки, то есть на 5 суток раньше, чем у контрольных животных (на 31% быстрее).

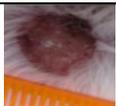
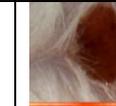
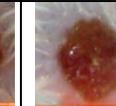
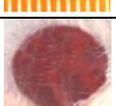
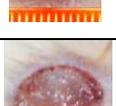
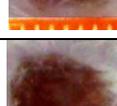
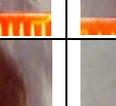
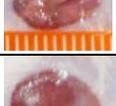
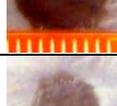
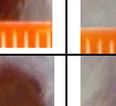
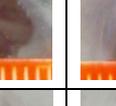
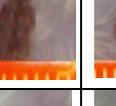
При оценке ран всех исследуемых животных в динамике репаративного процесса можно отметить следующие особенности течения репаративного процесса: у животных из контрольной группы на 1-2-3-4 сутках поверхность раны у 40% животных имела мокнувший вид, а на 5 сутки у них были выделения гноя и крови. У 20% животных из опытной группы с тестируемым пептидом HNP1-3 на 11 сутки появился струп, который сохранялся до 19 суток. У части животных (20%) из опытной группы с испытуемым препаратом тромбодифенсин на 1-2-3 сутки поверхность раны имела мокнувший характер, а на 5 сутки у них появлялись гнойные выделения с примесью крови. У животных из опытной группы с тестируемым препаратом интерцид на 13 сутки после нанесения раны сформировался небольшой рубец, который сохранился до конца срока наблюдения (21 сутки). В этой же группе восстановление шерстного покрова также было замедлено.

У животных из опытной группы под влиянием препарата ZP-2 процесс эпителизации сопровождается быстрым восстановлением шерстного покрова без образования рубцов. У животных из остальных групп на протяжении всего процесса заживления раны были сухие, без образования рубцов, с формированием нормального шерстного покрова, других особенностей течения репаративного процесса у них не отмечено.

Таким образом, проведенное исследование показало, что биологически активное вещество ZP2 является наиболее активным с целью получения ранозаживляющего препарата.

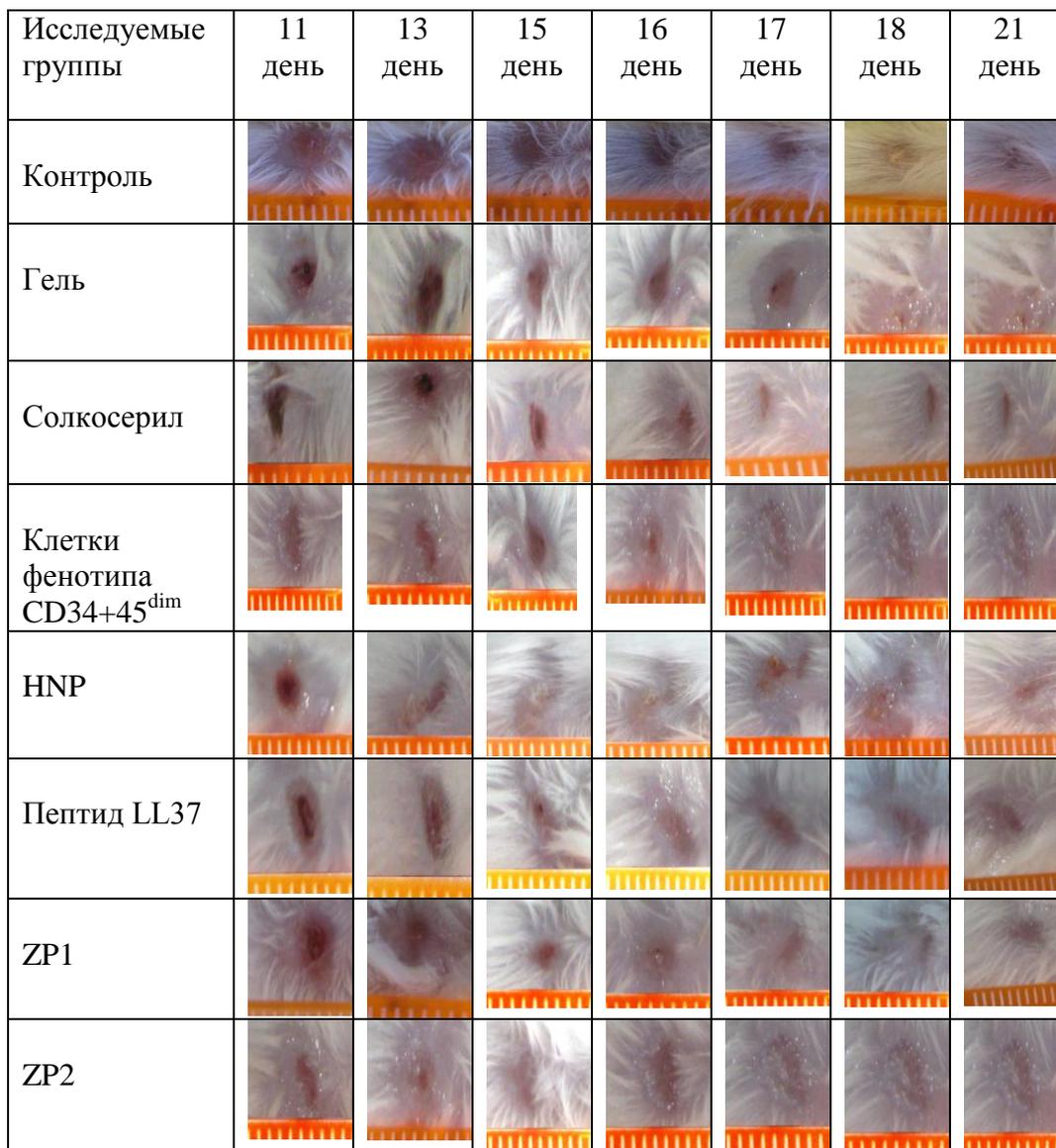
Для оценки эффективности ZP2 была проведена следующая серия экспериментов:

Исследование проведено на 80 лабораторных мышах, самцах, возрастом 3-4 месяца, весом 20-25 гр. В эксперименте животные были разделены на 8 экспериментальных групп (по 10 мышей в каждой): группа 1 – контроль: без лечения; группа 2 – опыт № 1: раны, обработанные основой для геля (2% раствор целлюлозы); группа 3 – опыт № 2: раны, обработанные лекарственной мазью «Солкосерил»; группа 4 – опыт № 3: раны, обработанные гелем, содержащим фетальные клетки фенотипа CD34+45<sup>dim</sup>; группа 5 – опыт № 4: раны, обработанные гелем с дефенсином LL37; группа 6 – опыт № 5: раны, обработанные гелем с дефенсином HNP1-3; группа 7 – опыт № 6: раны, обработанные гелем с пептидом ZP1 (химическая формула – LYS-GLY-PRO-LEU-THR-NLE-NLE-ALA-SER-HIS-TYR-LYS-GLN-HIS-CYS-PRO) и группа 8 – опыт № 7: раны, обработанные гелем с пептидом ZP2 (химическая формула – THR-NLE-NLE-ALA-SER-HIS-TYR-LYS-GLN-HIS-CYS-PRO).

Исследуемые группы	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день	6 день	7 день	8 день
Контроль								
Гель								
Солкосерил								
Клетки фенотипа CD34+45 <sup>dim</sup>								
HNP								
Пептид LL37								
ZP1								
ZP2								

**Рисунок 4 - Сравнительные изменения площади ран у животных в исследуемых группах в динамике репаративного процесса с 1 по 8 день**

Полученные данные показали, что гелевая основа не оказывает значимого влияния на скорость заживления ран. При обработке раны «Солкосерилом» репаративный процесс сокращается на 2 дня. Обработка ран различными дефенсинами, ZP1 также не оказывали существенного влияния на активность репарационного процесса. Раны же в двух группах, а именно, обработанные препаратом клеток фенотипа CD34+45<sup>dim</sup> и ZP2 (активный центр ГМ-КСФ, состоящий из 12 аминокислот) заживали значительно быстрее, чем в контрольных группах. Уже на 10-13 сутки эксперимента в этих двух группах наблюдалась эпителизация ран, в отличие от контрольных и других групп, в которых заживление ран наблюдалось только к 15-17 суткам после нанесения травмы.



**Рисунок 5 - Сравнительные изменения площади ран у животных в исследуемых группах в динамике репаративного процесса с 11 по 21 день**

Проведенные гистологические исследования взятых образцов показывают, что в контроле и опытных группах № 2,4,5,6, где использовали для лечения мазь «Солкосерил» и

другие контрольные препараты, процессы заживления ран проходят медленно (замедление фибропластической реакции) и с вторичным заносом инфекции.

Отличительной особенностью опытных групп № 3 и 7 (с использованием препарата клеток фенотипа CD34+45<sup>dim</sup> и синтетического пептида ГМ-КСФ) является более раннее отторжение некроза, чем в остальных группах и отсутствие воспалительной реакции во все сроки исследования. Показано, что препарат клеток фенотипа CD34+45<sup>dim</sup> и пептид ГМ-КСФ быстро и эффективно останавливает паренхиматозное кровотечение, способствует уменьшению массы некротизированной ткани и заживлению раневой поверхности без нагноения.

Так, на 1 сутки в экспериментальных группах раневой дефект сохраняет свои размеры (1,0±0,1 см в диаметре). Вокруг раны сохраняется умеренная гиперемия кожи, стенки раны мягкие при пальпации, дно раны покрыто налетом фибрина, гноя нет. На 3 сутки наблюдается уменьшение размеров дефекта ткани, рана покрыта струпом бледно – серого цвета, вокруг располагается очаг эпителизации до 2,5-3,0 мм в диаметре. Гиперемия и инфильтрация вокруг раны не определяется. При гистологическом исследовании в ране определяется рыхлая соединительная ткань с небольшой лейкоцитарной инфильтрацией, единичными укрупненными фибробластами, лимфоцитами, плазмócитами, эозинофилами и моноцитами. Очаги пролиферации эндотелия сосудов без просвета, с многорядностью расположения ядер. На 5 сутки дефект кожи отсутствует, определяется очаг эпителизации до 0,5 см в диаметре. Микроскопически поверхность покрыта многослойным плоским эпителием, подэпителиально определяется лимфоплазмócитарная инфильтрация.

На 10-13 сутки эксперимента констатирована полная эпителизация раневого дефекта с его оволосением. Гистологически отмечается пролиферативная активность клеток фибробластического ряда, трубчатая пролиферация фибробластов и эндотелия сосудов. В подкожной клетчатке определяются неповрежденные нервные стволы, что соответствует гистологической картине эпителизации раны с сохранением всех функционирующих структур.

В контроле и опытных группах № 2, 4, 5, 6 на 1 сутки раны также сохраняют свои размеры. При этом стенки ран сохраняют свою плотность, спаяны с окружающими тканями, вокруг раны сохраняется плотный инфильтрат, при механическом воздействии из раны выделяется гной, дно раны покрыто гнойной пленкой.

У животных этих групп раны сохраняют свои размеры до 10 суток эксперимента, а при гистологическом исследовании определяется отек, лимфогистиоцитарная инфильтрация и дистрофически-дегенеративные изменения подкожной клетчатки, мышечного слоя. У них прослеживаются все фазы течения раневого процесса: экссудация, пролиферация и регенерация. Закрытие раневого дефекта происходит к 18-21 суткам с формированием грубого соединительно-тканого рубца, гистологически в эти сроки сохраняются дистрофически-дегенеративные изменения подкожной клетчатки и мышц, дегенеративные изменения нервных стволиков.

Из полученных данных видно, что скорость репаративных процессов в 3 и 7 опытных группах значительно опережают заживление ран в контроле и других опытных группах (рисунок 4). [2, 10, 11, 12, 15, 16, 18, 20, 23, 28, 29, 36, 39, 42].

Возможный механизм такого действия во многом связан с уникальными свойствами пептидов активного центра ГМ-КСФ: одновременной иммуностимулирующей и антибактериальной активностью, что, например, характерно для дериватов стволовых клеток.

Клинический эффект применения аллогенных прогениторных клеток и синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ позволяет сделать вывод об индуцирующем влиянии данных препаратов на течение процессов репаративной регенерации. Важно отметить, что действие пептида активного центра ГМ-КСФ (ZP2) аналогично действию прогениторных клеток; возможно, механизм репаративного действия пептида связан и с активацией мезенхимальных, и кроветворных стволовых клеток (на которых имеются рецепторы к ГМ-КСФ, и через которые данный пептид может активировать эти клетки или привлекать в очаг поражения стволовые клетки более высоких порядков).

Резюмируя полученные данные, можно отметить следующее – выявленный синтетический пептид (ZP2) с химической формулой – THR-NLE-NLE-ALA-SER-HIS-TYR-LYS-GLN-HIS-CYS-PRO обладает выраженными иммуностимулирующими, антимикробными и репаративными свойствами, что позволяет рекомендовать его как основу для создания лекарственных препаратов нового направления, обладающих плеiotропными эффектами, которые могут найти широкое применение в клинике при лечении иммунозависимых, инфекционно-воспалительных заболеваний, а также в репаративной терапии при раневой инфекции, термической и механической травмах. На основе полученных данных были разработаны лечебные косметические препараты АЦЕГРАМ-спрей и АЦЕГРАМ-гель.

## **ВЫВОДЫ**

1. Среди синтезированных различных гомологов пептидной природы активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора выявлен пептид: химическая формула – THR-NLE-NLE-ALA-SER-HIS-TYR-LYS-GLN-HIS-CYS-PRO (ZP2), обладающий максимальным спектром иммунобиологической активности (иммуностимулирующей, антибактериальной и репаративной).

2. Пептид активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ZP2) усиливает пролиферацию лимфоцитов в реакции бластной трансформации лимфоцитов, по активности сравнимую со стандартным стимулятором – фитогемагглютинином и другими иммуномодуляторами (ИЛ-2, дефенсины LL37 и HNP, супернатант CD34+CD45dim клеток); вызывает дифференцировку стволовых клеток в сторону гранулоцитопоэза, не влияя на другие ростки лейкопоэза; обладает

свойствами хемоаттрактанта, усиливая *in vitro* хемотаксис и хемокинез гранулоцитов и моноцитов периферической крови человека, имеющие хемотаксический рецептор к данному пептидному соединению.

3. Синтетический пептид активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ZP2) усиливает секрецию 12 цитокинов гранулоцитами периферической крови человека (G-CSF, GM-CSF, IL-12p70, INF- $\gamma$ , IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-7, TNF- $\alpha$ , IL-8, MIP-1 $\beta$ ), наиболее выраженное усиление секреции выявлено для 5 цитокинов: IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, MIP-1  $\beta$ .

4. Синтетический пептид активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ZP2) обладает выраженной антибактериальной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов в условиях *in vitro*, сопоставимой с действием известных дефенсинов (HNP, LL 37), но не влияет на развитие грибов рода *Candida*

5. Синтетический пептид активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ZP2) ингибировал рост и размножение музейных штаммов и клинических изолятов стафилококков различных видов, а также снижал их биопленкообразование, он в большей степени подавлял репродуктивный потенциал и биопленкообразование патогенных (*S. aureus*) и в меньшей степени - условно-патогенных (*S. epidermidis*) стафилококков.

6. Синтетический пептид активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ZP2) более чем в 2 раза ускорял репарацию ран, которые заживали с восстановлением кожного и шерстяного покрова; гистологически выявлено, что при воздействии препарата значительно сокращалась длительность стадий экссудации и эмиграции, пролиферации и репарации, за счет чего ускорялась скорость восстановления нормальной ткани в зоне раневого повреждения у экспериментальных животных.

7. Созданы новые косметические средства, обладающие одновременно иммуностимулирующей, антибактериальной и репарационной активностью (АЦЕГРАМ-спрей, АЦЕГРАМ-гель).

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Разработанные косметические средства ACEGRAM-GEL (АЦЕГРАМ-ГЕЛЬ) и ACEGRAM-SPREY (АЦЕГРАМ-СПРЕЙ) используются для улучшения свойств кожного покрова и слизистых оболочек, в том числе при их повреждении, а также при лечении воспалительных заболеваний кожи и слизистых.

Гель и спрей применяется при любых повреждениях кожи и слизистых у взрослых и детей старше 3 месяцев для ускорения регенерации тканей и заживления без образования

рубцов, путем нанесения на кожу и слизистые 3-4 раз в день до улучшения состояния кожного покрова и слизистых оболочек, длительность применения зависит от объема повреждения ткани, но не более 14 дней. Повторный курс применения средства возможен через 10 дней.

Косметические гель и спрей может быть применен в научных целях, для выявления новых, не известных ранее свойств и механизмов действия синтетических пептидов активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### *Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК*

1. Анализ чувствительности клинических изолятов стафилококков к синтетическому пептиду активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) / **В.А. Зурочка**, А.В. Зурочка, М.А. Добрынина, Е.Б. Зуева, В.А. Гриценко, Я.В. Тяпаева, Ю.П. Белозерцева // Российский иммунологический журнал. 2015. Т.9 (18), № 3(1). С.82-85 (РИНЦ – 0,447).

2. Антибактериальные, иммуностропные и репарационные свойства синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ, различных дефенсинов и веществ, полученных из супернатантов CD34+CD45- клеток предшественников гемопоэза / А.В. Зурочка, **В.А. Зурочка**, Е.Г. Костоломова, М.А. Добрынина, Ю.Г. Суховой, В.А. Гриценко // Российский иммунологический журнал. 2012. Т.6 (14), № 3(1). С.78-79 (РИНЦ – 0,447).

3. Антибактериальные свойства синтетических пептидов активного центра GM-CSF / А.В. Зурочка, **В.А. Зурочка**, Ю.Г. Суховой, М.А. Добрынина, С.А. Петров, И.Г. Унгер, Е.Г. Костоломова, Е.Г. Аргунова, А.М. Субботин, А.А. Колобов, А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. 2010. Т.9, № 4. С.32-34 (РИНЦ – 0,450).

4. Влияние клеток фенотипа CD34+CD45<sup>dim</sup> и синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ на дифференцировку стволовых клеток *in vitro* / **В.А. Зурочка**, А.В. Зурочка, Е.Г. Костоломова, Ю.Г. Суховой // Российский иммунологический журнал. 2012. Т.6 (14), № 3(1). С.80-81 (РИНЦ – 0,447).

5. Влияние синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 на кинетику развития популяций грамположительных кокков и энтеробактерий в культуре / А.В. Зурочка, В.А. Гриценко, **В.А. Зурочка**, М.А. Добрынина, Е.Б. Зуева // Российский иммунологический журнал. 2015. Т. 9 (18), № 2(2). С.30-35 (РИНЦ – 0,447).

6. Влияние стафилококков на продукцию цитокинов нейтрофилами периферической крови человека / А.В. Зурочка, **В.А. Зурочка**, Е.Б. Зуева, М.А. Добрынина, В.В. Дукардт, Я.В. Тяпаева, В.А. Гриценко // Российский иммунологический журнал. 2016. Т.10 (19), № 1. С.73-80 (РИНЦ – 0,447).

7. Дозозависимые эффекты антибактериального действия синтетического пептида активного центра GM-CSF / А.В. Зурочка, Ю.Г. Суховой, **В.А. Зурочка**, М.А. Добрынина,

Е.Г. Костоломова, А.А. Колобов, А.С. Симбирцев // Инфекция и иммунитет. 2012. Т. 2, № 3. С.657-660 (РИНЦ – 0,477).

8. **Зурочка В.А.** Влияние клеток фенотипа CD34+CD45<sup>dim</sup>, различных дефенсинов и синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ на РБТЛ *in vitro* / В.А. Зурочка, А.В. Зурочка, Е.Г. Костоломова // Вестник уральской медицинской академической науки. 2012. № 4 (41). С. 200-201 (РИНЦ – 0,146).

9. **Зурочка В.А.** Изучение свойств пептидов активного центра ГМ-КСФ и веществ, полученных из супернатантов CD34+CD45<sup>-</sup> клеток предшественников гемопоэза / В.А. Зурочка, Е.Г. Костоломова, М.А. Добрынина // Вестник уральской медицинской академической науки. 2011. № 4/1. С.135-136 (РИНЦ – 0,146).

10. Зурочка А.В., **Зурочка В.А.** Плейотропные эффекты синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ // Вестник уральской медицинской академической науки. 2013. №2 (44). С. 78-81 (РИНЦ – 0,146).

11. Изучение влияния АЦЕГРАМ-спрея (синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ) на характер регенеративно-пластических процессов шейки матки и микрофлору влагалища после процедуры-иссечения аномальной ткани шейки у женщин с цервикальной интраэпителиальной неоплазией / Е.Б. Зуева, И.А. Гольцова, А.В. Зурочка, **В.А. Зурочка**, К.И. Мякишев, Л.Ф. Зайнетдинова // Российский иммунологический журнал. 2015. Т.9 (18), № 2(1). С.387-390 (РИНЦ – 0,447).

12. Изучение комбинированных эффектов веществ, полученных из супернатантов CD34+CD45<sup>-</sup> клеток предшественников гемопоэза и синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ / **В.А. Зурочка**, А.В. Зурочка, Е.Г. Костоломова, М.А. Добрынина, Ю.Г. Суховой, В.А. Гриценко // Российский иммунологический журнал. 2013. Т.7 (16), № 2-3(1). С.50-51 (РИНЦ – 0,447).

13. Иммунотропные и биологические эффекты синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ / А.В. Зурочка, **В.А. Зурочка**, Ю.Г. Суховой, М.А. Добрынина, Е.Г. Костоломова, В.А. Гриценко, Ю.Н. Студеникина // Вестник уральской медицинской академической науки. 2011. №2/2 (35). С.23-24 (РИНЦ – 0,146).

14. Исследование антибактериальных свойств синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ, различных дефенсинов и веществ, полученных из супернатантов CD34+45<sup>-</sup> клеток предшественников гемопоэза / А.В. Зурочка, **В.А. Зурочка**, Е.Г. Костоломова, М.А. Добрынина, Ю.Г. Суховой, В.А. Гриценко // Вестник уральской медицинской академической науки. 2012. № 2 (39). С. 12-13 (РИНЦ – 0,146).

15. Новые подходы к изучению спектра биологической активности синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ / А.В. Зурочка, **В.А. Зурочка**, М.А. Добрынина, Е.Б. Зуева, И.А. Гольцова, В.А. Гриценко // Российский иммунологический журнал. 2014. Т. 8 (17), № 3. С.690-693 (РИНЦ – 0,447).

16. Оценка влияния различных комбинаций синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ и биологически-активных веществ (дефенсинов, лизоцима, интерцида и супернатантов клеток CD34<sup>+</sup>) на антибактериальные, иммунотропные и репарационные

свойства / **В.А. Зурочка**, А.В. Зурочка, М.А. Добрынина, Е.Б. Зуева, В.А. Гриценко // Российский иммунологический журнал. 2015. Т.9 (18), № 2(1). С.239-240 (РИНЦ – 0,447).

17. Продукция цитокинов нейтрофилами периферической крови человека при воздействии синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ), бактерий и их супернатантов / А.В. Зурочка, **В.А. Зурочка**, Е.Б. Зуева, М.А. Добрынина, В.В. Дукардт, Я.В. Тяпаева, Ю.В. Белозерцева, В.А. Гриценко // Российский иммунологический журнал. 2016. Т.10 (19), № 2(1). С.429-432 (РИНЦ – 0,447).

18. Синтетический пептид активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) как основа для создания лекарств нового поколения с комбинированными свойствами / А.В. Зурочка, **В.А. Зурочка**, Е.Б. Зуева, М.А. Добрынина, В.В. Дукардт, В.А. Гриценко // Российский иммунологический журнал. 2016. Т.10 (19), № 2(1). С.433-435 (РИНЦ – 0,447).

19. Систематизация подходов к изучению спектра биологической активности синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ / А.В. Зурочка, **В.А. Зурочка**, М.А. Добрынина, Е.Б. Зуева, И.А. Гольцова, В.А. Гриценко // Российский иммунологический журнал. 2014. Т.8 (17), № 2(1). С.63-66 (РИНЦ – 0,447).

20. Сравнение влияния клеток фенотипа CD34+CD45<sup>dim</sup>, различных дефенсинов, солкосерила и синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ на процессы репарации кожной раны в эксперименте / **В.А. Зурочка**, А.В. Зурочка, Е.Г. Костоломова, Ю.Г. Суховой // Вестник уральской медицинской академической науки. 2012. № 2 (39). С. 52-53 (РИНЦ – 0,146).

21. Сравнительная характеристика антибактериальных свойств пептидов активного центра ГМ-КСФ и веществ, полученных из супернатантов CD34+CD45- клеток предшественников гемопоэза / А.В. Зурочка, **В.А. Зурочка**, Е.Г. Костоломова, М.А. Добрынина, Ю.Г. Суховой, В.А. Гриценко // Гигиена и санитария. 2012. № 3. С.71-72 (РИНЦ – 0,496).

22. Сравнительная характеристика антибактериальных свойств различных синтетических пептидов активного центра GM-CSF и веществ, полученных из супернатантов CD34+CD45<sup>dim</sup> клеток предшественников гемопоэза / А.В. Зурочка, **В.А. Зурочка**, Е.Г. Костоломова, М.А. Добрынина, Ю.Г. Суховой, В.А. Гриценко, А.А. Колобов, А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. 2012. Т.11, № 2. С.96-99 (РИНЦ – 0,450).

23. Сравнительные эффекты клеток фенотипа CD34+CD45<sup>dim</sup> и синтетических пептидов активного центра GM-CSF на процессы репарации кожной раны в эксперименте / **В.А. Зурочка**, А.В. Зурочка, Е.Г. Костоломова, Ю.Г. Суховой, А.А. Колобов, А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. 2012. Т.11, № 4. С.21-25 (РИНЦ – 0,450).

24. Характеристика антибактериальных, иммуностропных и репарационных свойств синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ, различных дефенсинов и веществ, полученных из супернатантов CD34+CD45<sup>dim</sup> клеток предшественников гемопоэза /

А.В. Зурочка, **В.А. Зурочка**, Е.Г. Костоломова, М.А. Добрынина, В.А. Гриценко // Вестник уральской медицинской академической науки. 2012. №4 (41). С. 201-202 (РИНЦ – 0,146).

\*\*\*

25. Влияние пептида активного центра ГМ-КСФ на реакцию бласттрансформации лимфоцитов / А.В. Зурочка, **В.А. Зурочка**, Ю.Г. Суховой, Е.Г. Костоломова, Е.Б. Зуева // Медицинская иммунология. 2009. Т.11, № 4-5. С.316-317 (РИНЦ – 0,411).

26. Зурочка А.В., **Зурочка В.А.** Применение стандартизованной технологии количественной оценки лейкоцитов методом проточной цитометрии для изучения малых субпопуляций лимфоцитов периферической крови в клинической практике // Российский иммунологический журнал. 2013. Т.7 (16), № 2-3. С.174-175 (РИНЦ – 0,447).

27. Изучение влияния синтетического пептидного активного центра ГМ-КСФ на регенерацию эпителия при лечении эрозии шейки матки / А.В. Зурочка, Е.Б. Зуева, И.А. Гольцова, **В.А. Зурочка** // Цитокины и воспаление. 2014. Т.13, № 1. С.97 (РИНЦ – 0,450).

28. Изучение действия синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ на регенеративные процессы шейки матки и микрофлоры влагалища после проведения петлевой электроэксцизионной процедуры-иссечения аномальной ткани шейки у женщин с цервикальной интраэпителиальной неоплазией / Е.Б. Зуева, А.В. Зурочка, И.А. Гольцова, **В.А. Зурочка**, К.И. Мякишев, Л.Ф. Зайнетдинова // Медицинская иммунология. 2015. Т.17. С. 265-266 (РИНЦ – 0,411).

29. Изучение репаративных свойств синтетических пептидов, полученных из активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора / Ю.Г. Суховой, **В.А. Зурочка**, М.А. Добрынина, И.Г. Унгер // Вестник уральской медицинской академической науки. 2010. № 2/1 (29). С.74-75 (РИНЦ – 0,146).

30. Иммунобиологические свойства синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ и их возможный спектр применения / А.В. Зурочка, Ю.Г. Суховой, **В.А. Зурочка**, М.А. Добрынина, С.А. Петров, Е.Г. Костоломова // Российский иммунологический журнал. 2010. Т.4 (13), № 4. С.386 (РИНЦ – 0,447).

31. Иммунологические свойства синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ / **В.А. Зурочка**, А.В. Зурочка, Ю.Г. Суховой, М.А. Добрынина, С.А. Петров, И.Г. Унгер, Е.Г. Костоломова // Цитокины и воспаление. 2010. Т.9, № 3. С.53 (РИНЦ – 0,450).

32. Исследование различной биологической активности синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ и веществ, полученных из супернатантов CD34+CD45<sup>-</sup> клеток предшественников гемопоэза / **В.А. Зурочка**, А.В. Зурочка, Е.Г. Костоломова, М.А. Добрынина, Ю.Г. Суховой, В.А. Гриценко // Российский иммунологический журнал. 2013. Т.7 (16), № 2-3. С.141 (РИНЦ – 0,447).

33. Исследование различной биологической активности синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ и их комбинаций с другими биологически активными веществами / **В.А. Зурочка**, А.В. Зурочка, М.А. Добрынина, Е.Б. Зуева, В.А. Гриценко // Медицинская иммунология. 2015. Т.17. С. 266 (РИНЦ – 0,411).

34. Механизмы антибактериального действия синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ в комбинации с веществами, полученными из супернатантов CD34+CD45-клеток предшественников гемопоэза / Зурочка А.В., **В.А. Зурочка**, Е.Г. Костоломова, М.А. Добрынина, Ю.Г. Суховой, В.А. Гриценко // Инфекция и иммунитет. 2012. Т.2, № 1-2. С.270 (РИНЦ – 0,477).

35. Плейотропные эффекты синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ / А.В. Зурочка, Ю.Г. Суховой, **В.А. Зурочка**, М.А. Добрынина, С.А. Петров, Е.Г. Костоломова // Вестник уральской медицинской академической науки. 2010. № 2/1 (29). С.35 (РИНЦ – 0,146).

36. Препараты с комбинированными свойствами – новое направление в иммунотерапии и репаративной медицине / А.В. Зурочка, **В.А. Зурочка**, Е.Г. Костоломова, М.А. Добрынина, Е.Б. Зуева, И.А. Гольцова, Ю.Г. Суховой // Цитокины и воспаление. 2014. Т.13, № 1. С.97 (РИНЦ – 0,450).

#### *Патенты РФ*

37. Патент № 2448725 С2 (Россия). Способ повышения бактерицидной активности / А.В. Зурочка, Ю.Г. Суховой, **В.А. Зурочка**, М.А. Добрынина, С.А. Петров, И.Г. Унгер, Е.Г. Костоломова; патентообладатель Тюмен. НЦ СО РАН. - № 2010129033/15; заявл. 13.07.2010; опубл. 20.01.2012, Бюл. № 12. – 7 с.

38. Патент № 2465001 С2 (Россия). Способ повышения пролиферативной активности лимфоцитов периферической крови / А.В. Зурочка, Ю.Г. Суховой, **В.А. Зурочка**, М.А. Добрынина, С.А. Петров, И.Г. Унгер, Е.Г. Костоломова; патентообладатель Тюмен. НЦ СО РАН. - № 2010129032; заявл. 13.07.2010; опубл. 27.10.2012, Бюл. № 30. – 6 с.

39. Патент № 2455020 С2 (Россия). Способ повышения репаративной активности / А.В. Зурочка, Ю.Г. Суховой, **В.А. Зурочка**, М.А. Добрынина, С.А. Петров, И.Г. Унгер, Е.Г. Костоломова; патентообладатель Тюмен. НЦ СО РАН. - № 2010129035; заявл. 13.07.2010; опубл. 10.07.2012, Бюл. № 19. 8 с.

#### *Публикации в других изданиях*

40. Влияние синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) на продукцию цитокинов нейтрофилами периферической крови человека / А.В. Зурочка, **В.А. Зурочка**, Е.Б. Зуева, М.А. Добрынина, В.В. Дукардт, С.В. Черкасов, В.А. Гриценко // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН: электр. журн. 2015. № 4. С.1-11; <http://www.elmag.uran.ru> (РИНЦ – 0,124).

41. Влияние синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) на формирование биопленок клиническими изолятами стафилококков / В.А. Гриценко, **В.А. Зурочка**, А.В. Зурочка, М.А. Добрынина, Е.Б. Зуева, Я.В. Тяпаева, Ю.В. Белозерцева, П.П. Курлаев //

Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН: электр. журн. 2015. № 4. С.1-13; <http://www.elmag.uran.ru> (РИНЦ – 0,124).

42. Влияние супернатантов клеток человека и активных центров цитокинов на репаративную активность на модели механической травмы / А.В. Зурочка, **В.А. Зурочка**, Ю.Г. Суховей, Е.Г. Костоломова, М.А. Добрынина // Дни иммунологии в Сибири: материалы Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. Абакан, 2011. С.56-58.

43. Некоторые биологические эффекты иммуномодуляторов естественного и синтетического происхождения *in vitro* как основа создания новых лекарственных средств для борьбы с эндогенными инфекциями / В.А. Гриценко, Д.Л. Аламин, А.В. Зурочка, **В.А. Зурочка**, Ю.Б. Иванов // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН: электр. журн. 2012. №3. С.1-17; <http://www.elmag.uran.ru> (РИНЦ – 0,124).

44. Особенности влияния синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ на рост грамположительных кокков *in vitro* / **В.А. Зурочка**, М.А. Добрынина, А.В. Зурочка, В.А. Гриценко // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН: электр. журн. 2015. № 1. С.1-10; <http://www.elmag.uran.ru> (РИНЦ – 0,124).

45. Сравнительный анализ влияния синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора-ZP2 на рост музейных культур бактерий родов *Staphylococcus* и *Escherichia* *in vitro* / М.А. Добрынина, **В.А. Зурочка**, А.В. Зурочка, В.А. Гриценко // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН: электр. журн. 2015. № 2. С.1-10; <http://www.elmag.uran.ru> (РИНЦ – 0,124).

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ - антиген

АТ - антитело

ГМ-КСФ - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

ИИ - индекс ингибирования

ИФА - иммуноферментный анализ

МНК - мононуклеары крови

МПБ - мясо-пептонный бульон

ФГА - фитогемагглютинин

CD (cluster of differentiation) - кластер дифференцировки

G-CSF - гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

GM-CSF - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

HLA, MHC – главный комплекс гистосовместимости

HNP1-3 – человеческий нейтрофильный пептид, дефенсин

IL-12p70 – интерлейкин 12p70

IL-17A – интерлейкин 17 А

IL-1 $\beta$  – интерлейкин 1 бетта

IL-2 – интерлейкин 3

IL-4 – интерлейкин 4

IL-5 – интерлейкин 5

IL-6 – интерлейкин 6

IL-7 – интерлейкин 7

IL-8 – интерлейкин 8

IL-10 – интерлейкин 10

IL-13 – интерлейкин 13

INF $\gamma$  – интерферон  $\gamma$

LL 37 – эндогенный антимикробный пептид (кателицидин), дефенсин

MCP-1 – моноцитарный хемоаттрактантный протеин 1

MIP-1beta – макрофагальный воспалительный белок 1 бетта

NK - натуральные киллеры

TLR - Толл-подобные рецепторы

TNF-alfa - фактор некроза опухоли альфа

ZP – синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ

**Зурочка Владимир Александрович**

**ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА  
СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ АКТИВНОГО ЦЕНТРА  
ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО  
КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА (ГМ-КСФ)**

14.03.09 - Клиническая иммунология, аллергология  
(медицинские науки)

Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук