

На правах рукописи

ДОБРЫНИНА МАРИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**ИММУННЫЕ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ
СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА ГРАНУЛОЦИТАРНО-
МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА
В СИСТЕМЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КЛЕТКА-ПЕПТИД-
ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ**

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Екатеринбург – 2019

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

Научные руководители:

Академик РАН, доктор медицинских наук,
профессор,

**Черешнев
Валерий Александрович**

Доктор медицинских наук, профессор

**Гриценко
Виктор Александрович**

Официальные оппоненты:

Академик РАН, доктор медицинских наук,
профессор, директор ФГБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

**Тотолян
Арег Артемович**

Доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Калуцкий
Павел Вячеславович**

Ведущая организация: Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук (г.Пермь)

Защита состоится «___» _____ 2019 года в ___ 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://vak2.ed.gov.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2019 года

Ученый секретарь Совета Д 004.027.02
на базе ИИФ УрО РАН,
д.м.н., проф., ЗДН РФ

И.А. Тузанкина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Одной из важных задач современной иммунологии является получение новых химических соединений, обладающих плейотропной, в том числе иммуномодулирующей, активностью. Необходимость создания новых иммуноактивных соединений на основе эндогенных пептидных регуляторов обусловлена ключевой ролью иммунной системы в определении развития, течения и исхода большинства патологических процессов, возникающих в макроорганизме (Черешнев В.А., Гусев Е.Ю., 2001; Черешнев В.А., Юшков Б.Г., 2005; Черешнев В.А. и соавт., 2008; Хаитов Р.М. и соавт., 2009; Ярилин А.А., 2010). В этой связи особый интерес представляют биологически активные регуляторные молекулы, продуцируемые иммунокомпетентными клетками для поддержания гомеостаза организма, которые могут стать основой для создания лекарственных препаратов, позитивно влияющих на поврежденные звенья иммунной системы. К таким веществам/препаратам относятся различные цитокины, в частности, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), нашедший широкое применение в клинической практике лечения лейкозов (Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008; Козлов В.А. и соавт., 2009; Зурочка А.В. и соавт., 2018; van Nieuwenhuijze A. et al., 2013; Cruz A.F. et al., 2014). В конце XX века из активного центра ГМ-КСФ были получены пептиды, обладающие активностью, идентичной таковой цельной молекулы ГМ-КСФ (Зурочка А.В. и соавт., 1995; Жемчугов В.Е. и соавт., 1996-2005). Эти исследования позволили создать основу для дальнейшего изучения иммунобиологических свойств синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ.

В то же время такие пептиды, как и некоторые цитокины (например, IL-26, IFN- β и др.), могут обладать более широким спектром биологических эффектов, в частности, проявлять антимикробную активность (Зурочка В.А., 2016; Meller S. et al., 2015; Kaplan A. et al., 2017). Последнее особенно актуально, поскольку продолжается интенсивное использование в клинической практике антибиотиков, сопровождающееся формированием антибиотикорезистентных микроорганизмов, циркуляция которых представляет опасность не только для больных, инфицированных ими, но и для лиц, контактирующих с такими пациентами (Крылов А.В. и соавт., 2007). И разработка новых противомикробных препаратов, в том числе, на основе эндогенных антимикробных пептидов (АМП), представляется весьма перспективной (Ганковская О.А. и соавт., 2008; Кокряков В.Н. и соавт., 2010; Loose C. et al., 2006; Garcia A.E. et al., 2008).

АМП обладают важными преимуществами по сравнению с традиционными антибиотиками, которые состоят в более широком диапазоне антибактериального действия, проявляют активность при значительно более низких концентрациях, малой выраженностью способности возбудителей формировать устойчивость к ним, а также в возможности синтеза аналогов природных пептидов с направленно-измененными биологическими свойствами (Волкова Л.В. и соавт., 2005; Шамова О.В. и соавт., 2013). При исследовании ряда синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ (в том числе, ZP2 с химической формулой: THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO) выявлено, что они в широком диапазоне концентраций обладают выраженной антибактериальной активностью в отношении

разных видов стафилококков, причем, не только подавляют рост и размножение бактерий, но и снижают их биопленкообразование (Зурочка В.А., 2016; Зурочка А.В. и соавт., 2018). Однако действие синтетического пептида ZP2 на грамотрицательные бактерии изучено достаточно фрагментарно. Кроме того, требуют дальнейшего анализа биологические эффекты данного пептида в системе взаимодействия фагоциты-пептид-грамотрицательные бактерии.

Аналізу данных вопросов посвящено настоящее исследование.

Цель исследования. Выявление новых иммуностимулирующих и антимикробных эффектов синтетического пептида ZP2 в системе взаимодействия клетка-пептид-грамотрицательные бактерии.

Для достижения поставленной цели были определены следующие **задачи**:

1. Оценить влияние синтетического пептида ZP2 на пролиферацию и апоптоз мононуклеарных клеток иммунной системы.

2. Оценить влияние синтетического пептида ZP2 на хемотаксис и хемокинез нейтрофилов и моноцитов человека в системе взаимодействия пептид-фагоциты-грамотрицательные бактерии.

3. Проанализировать особенности действия синтетического пептида ZP2 на цитокинопродукцию нейтрофилами, в том числе при фагоцитозе грамотрицательных бактерий.

4. Выявить особенности антибактериального действия синтетического пептида ZP2 и созданного на его основе косметического препарата «Ацеграм-спрей» на грамотрицательные микроорганизмы разной таксономической принадлежности.

Методология и методы исследований. Методологической основой диссертации стали принципы научного анализа биологических систем (комплексность, структурность, системность, объективность, достоверность) с применением современных модельных, иммунологических, микробиологических и статистических методов, адекватных характеру решаемых задач. Работа выполнена в рамках Плана научно-исследовательской деятельности ИИФ УрО РАН г. Екатеринбург (№ Гос. регистрации АААА-А18-118020690020-1, дата регистрации 06.02.2018) и научно-исследовательской деятельности ФГАОУ ВО «ЮУрГУ (НИУ)» г. Челябинск (проект госзадания № 40.8095.2017/БЧ). Исследования выполнялись согласно Хельсинской Декларации ВМА (2000 г.) и протокола Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине (1999 г.).

Согласно поставленным цели и задачам в условиях *in vitro* проанализировано влияние синтетического пептида ZP2 на пролиферативную активность лимфоцитов, хемотаксис и хемокинез фагоцитов, продукцию нейтрофилами цитокинов, рост/размножение и биопленкообразование грамотрицательных бактерий разных видов, в том числе, в системе взаимодействия фагоциты-пептид-микроорганизмы.

Степень достоверности, апробация результатов, личное участие автора. Достоверность полученных результатов исследования определена использованием широкого спектра современных лабораторных методов исследования, достаточным объемом фактического материала, его корректной статистической обработкой, а также подтверждена проверкой достоверности первичной документации

экспертами ИИФ УрО РАН (акт проверки от 14.06.2019 г.).

Основные материалы диссертационной работы представлены и обсуждены на следующих конференциях: Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Дни иммунологии в Сибири» (г. Абакан, 2011), конференциях иммунологов Урала (Тюмень, 2012; Сыктывкар, 2013; Екатеринбург, 2014; Пермь, 2015; Калининград, 2016), Объединенном иммунологическом форуме (Нижний Новгород, 2013), «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (г. Санкт-Петербург, 2015), 9-13 Всероссийских конференциях с международным участием «Иммунологические чтения в г. Челябинске» (Челябинск, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018).

Личный вклад соискателя складывается из ее непосредственного участия на всех этапах диссертационного исследования. Основная идея, планирование научной работы, цели и задачи, определение методологии и общей концепции диссертации вырабатывались совместно с научными руководителями академиком РАН, д.м.н., проф. В.А. Черешневым и д.м.н., проф. В.А. Гриценко. Автором лично проведены все эксперименты; часть опытов выполнена совместно с сотрудниками ООО «Тюменский филиал института клинической иммунологии» (директор, д.м.н., проф. Суховой Ю.Г., сотрудники д.м.н., проф. Петров С.А., к.б.н., Костоломова Е.Г.), с сотрудниками лаборатории иммунологии воспаления ИИФ УрО РАН (в.н.с., д.м.н., профессор Зурочка А.В., д.м.н., с.н.с. Зурочка В.А., м.н.с. В.В. Дукардтом), лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН Федерального государственного бюджетного учреждения науки Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН (аспирант Тяпаева Я.В., аспирант Белозерцева Ю.П.), Научно-исследовательского института Особо чистых биопрепаратов ФМБА России (научный руководитель института, член-корр. РАН, д.м.н., проф. Симбирцев А.С., д.б.н. Колобов А.А.).

Анализ зарубежной и отечественной литературы по исследуемой проблеме цитокинов и, в частности, ГМ-КСФ и его синтетических аналогов проведен лично диссертантом.

Лабораторные исследования проводились на базе лаборатории иммунологии воспаления ИИФ УрО РАН, лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН Федерального государственного бюджетного учреждения науки Оренбургского федерального исследовательского центра УрО РАН (*далее – ФГБУН ОФИЦ УрО РАН*).

Сбор первичных данных, их статистическая обработка, интерпретация полученных результатов, аналитическая проработка, написание и оформление рукописи диссертации, представление результатов исследований в научных статьях и докладах на конференциях осуществлялись соискателем лично.

Научные положения, выносимые на защиту:

1. Синтетический пептид ZP2 обладает пролиферативной и антиапоптотической активностью в отношении моноклеональных клеток иммунной системы.

2. Иммуностропная активность синтетического пептида ZP2 выражается в

активации хемотаксиса и хемокинеза гранулоцитов и моноцитов периферической крови в условиях взаимодействия фагоцит-пептид-грамотрицательные микроорганизмы.

3. Синтетический пептид ZP2 стимулирует продукцию гранулоцитами периферической крови человека ряда цитокинов (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-17A, TNF- α , MIP-1 β) сильнее, чем грамотрицательные микроорганизмы и супернатанты их суточных бульонных культур, в то время как при комбинированном воздействии на фагоциты пептида и микроорганизмов (или их супернатантов) уровень цитокинопродукции имеет промежуточные значения.

4. Синтетический пептид ZP2 обладает антибактериальной активностью в отношении широкого спектра грамотрицательных бактерий, включающего как музейные, так и клинические штаммы *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* и *P. aeruginosa*, что проявляется преимущественно в ингибировании их роста и размножения, а также формирования ими биопленок.

Научная новизна работы. Получены новые данные при исследовании иммуностропных и антибактериальных свойств синтетического пептида ZP2 в условиях *in vitro*. Показано, что синтетический пептид ZP2 в широком диапазоне концентраций (10-300 мкг/мл) обладает способностью усиливать пролиферацию лимфоцитов в РБТЛ, снижать апоптоз культуры клеток моноцитов, а также стимулировать хемотаксис и хемокинез нейтрофилов и моноцитов периферической крови человека, в том числе в системе взаимодействия фагоциты-пептид-грамотрицательные бактерии. Кроме того, установлено, что синтетический пептид ZP2 способен индуцировать продукцию гранулоцитами периферической крови человека ряда цитокинов (IL-17A, IL-1 β , IL-4, IL-6, TNF- α , IL-8, MIP-1 β) сильнее, чем грамотрицательные микроорганизмы и супернатанты их суточных бульонных культур, а при комбинированном действии на фагоциты пептида и микроорганизмов (или их супернатантов) уровень их цитокинопродукции имеет промежуточные значения.

Впервые охарактеризованы особенности антибактериального действия синтетического пептида ZP2 на грамотрицательные микроорганизмы различной видовой принадлежности в условиях *in vitro*. Выявлен дозозависимый ингибирующий эффект синтетического пептида ZP2 в отношении развития тест-штамма *E. coli* в бульонной культуре, а также показано, что указанный пептид и созданное на его основе косметическое средство «АЦЕГРАМ-спрей» преимущественно снижают рост и размножение клинических изолятов *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* и *P. aeruginosa* и их биопленкообразование.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы заключается в выявлении у синтетического пептида ZP2 новых иммуностропных эффектов, связанных как с его изолированным влиянием на иммунокомпетентные клетки человека (лимфоциты, нейтрофилы и моноциты) и грамотрицательные микроорганизмы разных видов, так и с его сочетанным действием в системе фагоциты-пептид-грамотрицательные бактерии, а также с антибактериальной активностью в отношении ряда грамотрицательных бактерий (эшерихии, клебсиеллы, псевдомонады, ацинетобактеры).

Полученные данные расширяют наши представления о механизмах действия

синтетического пептида ZP2, а выявленные дополнительные свойства легли в основу разработки и создания косметических средств [«АЦЕГРАМ-спрей» и «АЦЕГРАМ-гель» (РОСС RU.АВ66.Н00566 (№ 0203563) и РОСС RU.АВ66.Н00565 (№ 0203562) от 30.10.2017], которые предназначены для наружного местного использования и могут применяться при инфекционно-воспалительных поражениях кожи и слизистых оболочек. Полученные данные служат предпосылками для расширения спектра применения указанных косметических препаратов, обладающих комбинированными иммуностропными и антибактериальными эффектами, в том числе, в отношении грамотрицательных бактерий разных видов.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 17 печатных работы, в том числе: 11 статей в журналах из перечня ВАК (3 – Scopus, РИНЦ, 8 – РИНЦ), 4 статьи в рецензируемых журналах, не входящих в перечень ВАК (4 – РИНЦ), получено 2 патента РФ на изобретения.

Внедрение результатов исследования в практику. Результаты исследования внедрены в научно-исследовательскую деятельность лаборатории иммунологии воспаления ИИФ УрО РАН (г. Екатеринбург), лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН (г. Оренбург), ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России (г. Санкт-Петербург), в учебный процесс кафедры микробиологии и вирусологии № 1 ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Ростов-на-Дону), в производственную деятельность ООО «НПФ Верта» (Санкт-Петербург), в медицинскую практику работы ООО «Академический инновационный научный центр» (г. Челябинск), ООО «Медицинский лабораторный центр «Фамилия» (г. Челябинск).

Объем и структура диссертационного исследования. Диссертация изложена на 161 странице машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, 2 глав собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы, включающего 212 источников, из них 143 иностранных и 69 отечественных. Работа иллюстрирована 14 таблицами и 10 рисунками, содержит приложение.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследований. Исследования были проведены с использованием синтетического пептида ZP2, иммунокомпетентных клеток (лимфоциты, нейтрофилы), полученных из периферической крови 50 здоровых доноров методом центрифугирования на двойном градиенте фиколл-верографина, клеток культуры ТНР-1 (клетки моноцитарной лейкемии человека), 2 музейных штаммах бактерий - *Escherichia coli* K12 (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* 209P (ATCC 6538-P), 10 клинических изолятах *Staphylococcus aureus* и 71 клиническом изоляте грамотрицательных микроорганизмов разных видов (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*).

Синтез пептидов. Синтез пептида активного центра ГМ-КСФ (с учетом известной его аминокислотной последовательности) проводился твердофазным способом на синтезаторе «Applied Biosystems 430A» по методу *in situ* с

использованием N α -Вос-защищенных производных аминокислот (Зурочка В.А., 2016). Конечные продукты охарактеризованы аналитической ОФ ВЭЖХ, данными аминокислотного и масс-спектрального анализов. Аминокислотный состав полученных соединений и их молекулярный вес соответствовали теоретическим, чистота по данным аналитической ОФ ВЭЖХ была не менее 95 %. Был синтезирован пептид активного центра ГМ-КСФ: ZP2 – THR NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO с м.м. 1397 дальтон.

В ряде иммунологических экспериментов в качестве дополнительных контролей были использованы рекомбинантные пептиды HNP 1-3 (представитель семейства альфа-дефенсинов человека) и LL37 (представитель семейства кателицидинов) производства компании NuCult biotechnology (Нидерланды).

Методы исследования иммуотропной активности синтетического пептида ZP-2

Оценка пролиферативной активности синтетических пептидов.

Оценивали пролиферативное действие пептида ZP2 (концентрация 10 мкг/мл) в РБТЛ методом проточной цитометрии (справочник «Медицинские лабораторные технологии...», 1999; Зурочка А.В. и соавт., 2018). В качестве контроля использованы: ФГА («Дифко», США) в стандартных для РБТЛ концентрациях – 1 и 10 мкг/мл; интерлейкин 2 (ИЛ-2) в концентрации 10 мкг/мл; коммерческие дефенсины LL37 и HNP в концентрации 10 мкг/мл.

Оценка влияния синтетического пептида ZP2 на апоптоз клеток культуры моноцитов человека. В качестве объекта изучения использовали клетки моноцитарной лейкемии человека (культура ТНР-1) в среде RPMI-1640 в концентрации 2×10^6 клеток/мл. Для индукции апоптоза клеток *in vitro* использовали йодацетат, который добавляли в финальных концентрациях 10 и 15 μ М. Синтетический пептид ZP2 вносили в конечных концентрациях 10, 20, 100 и 200 мкг/мл либо изолированно, либо в комбинации с йодацетатом. Время инкубации в присутствии стимуляторов составляло 24 часа при 37°C в атмосфере 5 % CO₂. Оценку жизнеспособности клеток осуществляли при помощи двух ДНК-связывающих флюоресцентных красителей – йодида YO-PRO-1 и йодистого пропидия (Idziorek T. et al. 1995). Подробно методика описана Надеевым А.Д. и соавт., 2015 и Зурочкой А.В. и соавт., 2014, 2018. Для анализа состояния клеток использовали проточный цитофлуориметр Navios™ («Beckman Coulter», США); в каждом образце оценивали не менее 20000 одиночных клеток. Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.1.2 (Beckman Coulter, США).

Оценка влияния синтетического пептида ZP2 на миграционную активность нейтрофилов и моноцитов периферической крови человека. Для анализа хемотаксиса и хемокинеза нейтрофилов и моноцитов периферической крови человека использовался метод (Nelson R.D. et al., 1975), основанный на оценке миграционной активности лейкоцитов под агарозным гелем. Оценивали влияние на хемотаксис и хемокинез фагоцитов синтетического пептида ZP2 (диапазон концентраций 10-300 мкг/мл) и грамотрицательных бактерий, в том числе при их сочетанном действии.

Оценка влияния синтетического пептида ZP2 на продукцию цитокинов нейтрофилами. При определении продукции цитокинов нейтрофилами под воздействием разных факторов количество фагоцитов средой RPMI-1640 доводили до концентрации 5×10^6 клеток/мл; в опытные образцы изолированно добавляли синтетический пептид ZP2 (концентрация 20 мкг/мл), взвесь *E. coli* (концентрация 10^8 КОЕ/мл) или супернатанты суточных бульонных культур этих бактерий (в соотношении 1:10), а также комбинации данного пептида с бактериями или их супернатантами. После часовой инкубации при 37°C образцы центрифугировали, фильтровали и в супернатантах с помощью прибора MagPix-100 (USA) и иммунофлюоресцентных мультиплексных наборов компании БиоРад (США) определяли концентрацию 17 цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α , MCP-1, MIP-1beta). Контролями служили среда RPMI-1640 и среда RPMI-1640 с синтетическим пептидом в той же концентрации.

Методы исследования антибактериальной активности синтетического пептида ZP-2

Оценка антимикробной активности синтетического пептида ZP2 диско-диффузионным методом. Бактерицидная активность фракций супернатантов клеток оценивалась по общепринятой методике «Определение чувствительности микробов к антибиотикам методом диффузии в агар с применением бумажных дисков». В стерильные чашки Петри заливали 20 мл 2 % стандартного мясо-пептонного агара. На подсушенную поверхность среды засеивали сплошным газоном клинические штаммы *S. aureus* 155, *E. coli* 2290 и *Candida albicans* путем равномерного распределения стерильным шпателем 0,2 мл бактериальной взвеси (2×10^9 КОЕ/мл); на засеянную поверхность раскладывали диски, обработанные синтетическим пептидом ZP2 (концентрации 3, 10 и 30 мкг/мл) путем их погружения в растворы до полного пропитывания. Зоны подавления роста микроорганизмов учитывали через 18 часов инкубации при 37°C, измеряя их диаметр (мм) вокруг дисков линейкой (Справочник по микробиологическим..., 1982; Волкова Л.В. и соавт., 2004).

Оценка влияния синтетического пептида ZP2 и косметического средства «АЦЕГРАМ-спрей» на кинетику развития бактериальных культур. Опыты *in vitro* были проведены на музейном тест-штамме *Escherichia coli* K12 (ATCC 25922) и 48 клинических изолятах разных видов грамотрицательных бактерий (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*) из коллекции ИКВС УрО РАН. Для сравнения использовался тест-штамм *Staphylococcus aureus* 209P (ATCC 6538-P). В опытах был использован синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ – ZP2 и созданное на его основе косметическое средство «АЦЕГРАМ-спрей».

Оценка влияния синтетического пептида ZP2 на рост музейных тест-штаммов стафилококков и энтеробактерий, а также 12 клинических изолятов *E. coli*, выделенных из ран у больных с синдромом диабетической стопы и отделяемого из влагалища у женщин с миомой матки (из коллекции ИКВС УрО РАН), осуществлялась путем инкубации бактериальных культур в течение 24 часов в

микрочайках стерильной пластиковой планшеты в присутствии ZP2 с градиентом концентраций: 10, 30 и 100 мкг/мл. В опытах с использованием «АЦЕГРАМ-спрея» последний добавлялся в среду инкубации бактерий. Развитие бактерий в жидкой питательной среде оценивалось по динамике оптической плотности культуры (ОД), измеряемой в каждой микрочайке при длине волны (λ) 492 нм на Multiscan Ascent (Thermo Labsystems, Финляндия). Измерение ОД культур проводилось на 0 (исходный уровень), 2, 4, 6 и 24 часах инкубации. Каждый вариант опыта и контроля делался в 5 повторях.

Для определения степени влияния ZP2 на рост бактериальных культур рассчитывали Индекс ингибирования (ИИ) по формуле:

$$\text{ИИ} = \frac{\text{ОДк} - \text{ОДо}}{\text{ОДк}} * 100\%,$$

где ИИ – Индекс ингибирования (%); ОДк и ОДо – оптическая плотность контрольной и опытной культур соответственно. Индекс ингибирования развития бактериальных популяций оценивался на 2, 4, 6 и 24 часах.

Оценка влияния синтетического пептида ZP2 на биопленкообразование бактерий. Опыты *in vitro* проводились на 12 клинических штаммах *E.coli* и 12 клинических штаммах *K. pneumoniae*, выделенных из ран у больных с синдромом диабетической стопы и отделяемого из влагалища у женщин с субмукозной миомой матки (из коллекции ИКВС УрО РАН).

Анализ влияния синтетического пептида ZP2 на биопленкообразование (БПО) клиническими штаммами энтеробактерий осуществлялся с помощью «планшетного метода» с незначительными модификациями путем их выращивания в стерильной 96-луночной полистироловой планшете (Christensen G.D. et al., 1985; Stepanovic S. et al., 2007). Для выявления биопленок измеряли оптическую плотность (OD) при длине волны 540 нм с помощью планшетного фотометра Multiscan ascent (Thermo Electron Co., China). Интенсивность окрашивания надосадка, рассчитанная путем вычитания из значения OD (биопленка) значения OD отрицательного контроля (лунка с МПБ без культуры бактерий), соответствовала степени биопленкообразования (БПО, усл. ед.) исследуемыми культурами энтеробактерий.

Эксперименты делали в трех препаративных повторностях, высчитывая средние значения БПО.

Методы статистической обработки результатов

Результаты исследований обрабатывались на ПК с использованием пакета прикладных программ "Statistica for Windows 6.0" (Лакин Г.Ф., 1990; Медик В.А. и соавт., 2000; Трухачева Н.В., 2012). Высчитывали значения средней арифметической вариационного ряда (M) и ошибки средней арифметической (m). Различия показателей в сравниваемых группах оценивали параметрическими и непараметрическими методами (соответственно по *t*-критерию Стьюдента и по *U*-критерию Mann-Whitney); статистически значимыми считались изменения при $p < 0,05$. Корреляционный анализ выполнен с использованием модуля «Nonparametrics. Correlations Spearman, значимыми считались коэффициенты корреляции на уровне, принятом для медико-биологических исследований ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы нами были проанализированы иммуномодулирующие эффекты синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ.

В серии экспериментов *in vitro* была дана оценка влияния синтетического пептида ZP2 (концентрации 10, 30 и 300 мкг/мл) на реакцию бластной трансформации лимфоцитов (РБТЛ), которая считается стандартной для выявления иммуностропных свойств у различных химических соединений.

Синтетический пептид ZP2 отличался значительно более высокой активностью по сравнению как с другими пептидами, так и стандартным митогеном ФГА и ИЛ-2 ($p < 0,05$).

Кроме того, в специальной серии опытов нами была проведена сравнительная оценка иммуностропной активности синтетического пептида ZP2 (концентрации 30 и 300 мкг/мл), дефенсина LL37 и кателицидина HNP, как известно, обладающих фагоцит-стимулирующей и антибактериальной активностями. Полученные данные свидетельствовали о том, что в отличие от указанных дефенсина и кателицидина, которые практически не влияли на РБТЛ, синтетический пептид ZP2 ее стимулировал (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние синтетического пептида ZP2, дефенсина LL37 и кателицидина HNP на РБТЛ

№	Исследуемые вещества	Концентрация (мкг/мл)	Содержание бластных клеток, % (n=10)
1	Спонтанная РБТЛ	-	10,3 ± 0,4
2	Синтетический пептид ZP2	30	67,0 ± 0,5*
3	Синтетический пептид ZP2	300	65,0 ± 0,8*
4	Дефенсин LL37	300	12,3±0,1
5	Кателицидин HNP	300	10,2±0,1

Примечание: * $p < 0,05$ – по отношению к спонтанной РБТЛ, дефенсину LL37 и кателицидину HNP.

Таким образом, синтетические пептиды стимулировали бластную трансформацию лимфоцитов, что указывало на их выраженную иммуностропную активность, в частности, на способность активировать процессы пролиферации иммунных клеток (лимфоциты).

На следующем этапе нами оценивалось влияние синтетического пептида ZP2 (в градиенте конечных концентраций 10-200 мкг/мл) на состояние клеток в культуре ТНР-1 (клетки моноцитарной лейкемии человека) в модели цитотоксической гипоксии, вызванной внесением в среду для культивирования йодацетата (конечные концентрации 10 и 15 μM). Эта методика позволяет не только регистрировать факт запуска апоптоза, но выявлять различные его стадии.

Установлено, что при совместном культивировании клеток с йодацетатом и синтетическим пептидом ZP2 наблюдается увеличение относительного содержания живых клеток, причем эффект носит дозозависимый характер. Так, на фоне

индукции апоптоза йодацетатом в финальной концентрации 10 μM ($62,1 \pm 2,0\%$ живых клеток) внесение синтетического пептида ZP2 в конечных концентрациях 10, 20, 100 и 200 $\mu\text{кг/мл}$ сопровождалось достоверным градиентным увеличением относительного содержания живых клеток ($69,7 \pm 1,5$; $73,3 \pm 1,1$; $85,6 \pm 1,5$ и $93,0 \pm 0,4\%$ соответственно, $p < 0,05$). При индукции апоптоза 15 μM йодацетата добавление пептида ZP2 в концентрациях 10 и 20 $\mu\text{кг/мл}$ не изменяло долю живых клеток, но при повышении его концентрации в среде до 100 и 200 $\mu\text{кг/мл}$ наблюдался отчетливый тренд с достоверным увеличением относительного содержания жизнеспособных клеток (с $2,1 \pm 1,1\%$ до $19,8 \pm 9,0$ и $73,5 \pm 1,4\%$, соответственно; $p < 0,05$).

Кроме того, добавление в среду культивирования клеток линии ТНР-1 синтетического пептида ZP2 изменяло количество клеток, находящихся на ранних и поздних стадиях апоптоза, индуцированного йодацетатом. Так, инкубация клеток в присутствии 10 и 15 μM йодацетата приводила к увеличению доли популяции клеток на ранней стадии апоптоза ($1,3 \pm 0,3\%$ против $12,7 \pm 2,3$ и $12,7 \pm 5,5\%$), тогда как дополнительное внесение в среду синтетического пептида ZP2 (особенно, при концентрациях 100 и 200 $\mu\text{кг/мл}$) частично нивелировало этот эффект. Параллельно с этим, под влиянием данного пептида на фоне действия йодацетата, уменьшалось относительное содержание клеток на поздних стадиях апоптоза и в некрозе. Причем, указанный «протективный» (антиапоптотический) эффект синтетического пептида ZP2 более четко проявлялся в опытах с инкубацией клеток в присутствии 10 μM йодацетата, а в экспериментах с 15 μM йодацетата достоверные отличия опытных образцов (с пептидом) от контролей отмечены только при его использовании в высокой концентрации – 200 $\mu\text{кг/мл}$.

Таким образом, синтетический пептид ZP2 в широком диапазоне концентраций обладает антиапоптотическим эффектом, который, вероятно, реализуется через активацию клеточных рецепторов к данному цитокину.

Для подтверждения этого предположения и уточнения механизмов влияния синтетического пептида ZP2 на иммунокомпетентные клетки нами в условиях *in vitro* проанализировано его влияние на локомоторную функцию нейтрофилов и моноцитов периферической крови человека, в том числе при воздействии на них грамотрицательных бактерий, с помощью методики Nelson R.D. et al. (1975).

Как показали результаты проведенных опытов, пептид ZP2 в широком диапазоне концентраций (10, 30, 100, 300 $\mu\text{кг/мл}$) обладал свойствами хемоаттрактанта, не только вызывая целенаправленное движение клеток гранулоцитарно-макрофагального ростка кроветворения против градиента концентраций пептида, но и стимулируя их хемотаксис (в 1,5-1,6 раза).

Полученные данные, с одной стороны, свидетельствовали о способности синтетического пептида ZP2 вызывать хемотаксис фагоцитов (а значит, привлекать их в место введения препарата), с другой стороны, косвенно подтверждали наличие на поверхности этих клеток хемотаксических рецепторов к данному пептиду, как аналогу активного центра ГМ-КСФ, на что ранее указывал В.Е. Жемчугов (2004), считавший, что подобные пептиды взаимодействуют с гранулоцитами и макрофагами через основной рецептор к указанному цитокину.

Учитывая эти обстоятельства, а также данные Л.Я. Эберта и соавт. (1985),

А.В. Зурочки и И.И. Долгушина (1988) о наличии явления хемотаксической деактивации, когда после предварительной инкубации нейтрофилов с бактериями у них развивается отрицательный хемотаксис на микроорганизмы того же вида, с каким проводился контакт фагоцитов, важно было оценить, как меняется хемотаксическая активность гранулоцитов на бактерии при дополнительном воздействии синтетического пептида ZP2 на систему фагоцит-микроорганизм.

Исследования показали, что при изолированном или сочетанном воздействии пептида ZP2 и грамотрицательных бактерий (*E. coli*) на интактные нейтрофилы наблюдалась положительная хемотаксическая реакция. При оценке хемотаксиса фагоцитов, соинкубированных с *E. coli*, развивается хемотаксическая деактивация на эшерихии, что согласуется с вышеописанными литературными данными. В то же время пептид ZP2 отменял хемотаксическую деактивацию фагоцитов во всех вариантах опыта: добавление во взвесь бактерий пептида в качестве хемоаттрактанта (восстановление хемотаксиса); введение пептида в смесь нейтрофилов с бактериями (восстановление хемокинеза) (таблица 2).

Эти данные, очевидно, указывают на то, что синтетический пептид ZP2 способен взаимодействовать с хемотаксическими рецепторами фагоцитов, активируя их локомоторную активность, и, возможно, с их Toll-подобными рецепторами, которые инактивируются при фагоцитозе бактерий, так как последнее характерно для нативной молекулы ГМ-КСФ (O'Mahony D.S. et al., 2008; Tanimoto A. et al., 2008). Развитие инфекционного процесса, вызываемого бактериальными агентами, в частности, грамотрицательными микроорганизмами, сопровождается ответной реакцией организма с выработкой иммунокомпетентными клетками различных цитокинов, выполняющих регуляторную функцию (Иммунология: структура и функции иммунной системы / под ред. Р.М. Хаитова. Москва, 2013.).

Таблица 2 – Оценка влияния синтетического пептида ГМ-КСФ (ZP2) на хемотаксис нейтрофилов при инкубации их с энтеробактериями *in vitro*

Индекс хемотаксиса	Группы (хемоаттрактанты)			
	Контроль (среда 199) Спонтанная миграция	Опыт 1: пептид ZP2 (10 мкг/мл)	Опыт 2: <i>E. coli</i> (10 ⁸ бакт./мл)	Опыт 3: пептид ZP2 (10 мкг/мл) + <i>E. coli</i> (10 ⁸ бакт./мл)
Нейтрофилов	1,01±0,05	1,54±0,12*	1,38±0,11*	1,58±0,13*
Нейтрофилов инкубированных с энтеробактериями	1,01±0,05	1,55±0,11*	0,66±0,08*	1,48±0,12*
Нейтрофилов инкубированных с энтеробактериями и пептидом ZP2	1,01±0,03	1,56±0,13*	1,48±0,12*	1,49±0,12*

Примечание: *р - достоверность различий между исследуемыми группами и спонтанной миграцией клеток, р < 0,05. n=10.

Одними из первых в инфекционно-воспалительный процесс вовлекаются фагоцитарные клетки и, прежде всего, нейтрофилы. Эти клетки являются удобной моделью для оценки влияния различных веществ и грамотрицательных бактерий, принадлежащих к разным таксонам, на секрецию цитокинов фагоцитами (Зурочка А.В. и соавт., 2015). Поскольку энтеробактерии, в частности, эшерихии (*E. coli*),

принадлежат к комменсальной, потенциально патогенной микрофлоре макроорганизма и способны вызывать эндогенные бактериальные инфекции (Гриценко В.А. и соавт., 2012), важным представлялось оценить влияние этих микроорганизмов (и их метаболитов) на продукцию цитокинов нейтрофилами в условиях *in vitro*, а также на модуляцию этого процесса синтетического пептида ZP2.

В этой связи в серии экспериментов *in vitro* нами был проанализирован характер влияния синтетического пептида ZP2, клинических изолятов *E. coli* и супернатантов их суточных бульонных культур, в том числе в разных комбинациях, на секрецию нейтрофилами человека широкого спектра цитокинов (таблица 3).

На первом этапе оценивалось влияние бактериальных клеток и супернатантов культур *E. coli* на секрецию/продукцию цитокинов этими клетками. Установлено, что нейтрофилы, активированные клетками эшерихий или их метаболитами, секретировали в среду инкубации следующие 7 цитокинов: GM-CSF, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p70, IL-17A, MIP-1 β . При сочетанном действии бактериальных клеток их метаболитов (супернатанты суточных культур) нейтрофилы увеличивали спектр секретируемых цитокинов, в среде инкубации определялось достоверное увеличение уровней уже 10 цитокинов: GM-CSF, G-CSF, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-12p70, IL-17A, MIP-1 β , TNF- α .

Следует отметить, что в сравнении со спонтанной продукцией фагоцитами цитокинов (контроль) эшерихии и супернатанты их суточных культур стимулировали секрецию в среде нейтрофилами человека, преимущественно, провоспалительных цитокинов, таких как: IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-17A, IL-8, TNF- α и MIP-1 β .

Не менее важным было проанализировать влияние синтетического пептида ZP2 на секрецию цитокинов нейтрофилов, в том числе в комбинации с бактериями и их метаболитами (супернатанты суточных культур).

Как показали результаты экспериментов, пептид ZP2 значительно усиливал продукцию/секрецию нейтрофилами практически всех изученных цитокинов – G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, TNF- α , MIP-1 β (14 из 17 изученных) в сравнении с контролем (супернатант интактных нейтрофилов).

При комбинированном влиянии на нейтрофилы пептида ZP2 с живыми бактериями наблюдалось усиление секреции/продукции фагоцитами практически тех же цитокинов, что и при изолированном действии пептида 11 из 17 изученных (за исключением IL-10, IL-13 и IFN- γ). Аналогичная картина наблюдалась при действии метаболитов суточных культур бактерий в комбинации с пептидом ZP2 (исключением были 3 цитокина – GM-CSF, IL-10 и IL-13). Иначе говоря, в обоих случаях отмечалось сохранение основного пула цитокинов, продукция которых была повышена.

Вместе с тем, следует отметить, что комбинированное воздействие указанных факторов отличалось от их изолированного влияния на продукцию/секрецию нейтрофилами цитокинов по уровню выраженности регистрируемых эффектов. Во всех проанализированных вариантах комбинаций бактерии и их метаболитов

уменьшалось выраженное стимулирующее действие пептида ZP2 на цитокиновую продукцию нейтрофилов периферической крови человека. В частности, при совместном действии пептида ZP2 и эшерихий наблюдалось снижение секреции нейтрофилами следующих цитокинов: G-CSF, IL-12p70, IFN- γ , IL-13, IL-17A, IL-4, IL-6, IL-7, TNF- α , IL-8 и MIP-1 β , а при комбинации данного пептида с метаболитами этих бактерий снижались – G-CSF, GM-CSF, IL-12p70, IFN- γ , IL-13, IL-17A, IL-1 β , IL-4, TNF- α , IL-8 и MIP-1 β .

Таблица 3 – Сравнительная характеристика содержания цитокинов в контрольных и опытных пробах, в том числе при добавлении к нейтрофилам синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2, *E.coli*, супернатантов суточных культур *E.coli*. (M \pm m) n=10

Цитокины	Среда RPMI-1640 (контроль 1)	Супернатант нейтрофилов (контроль 2)	Супернатант нейтрофилов + ZP2 (опыт 3)	Супернатант нейтрофилов + ZP2+ <i>E.coli</i> (опыт 4)	Супернатант нейтрофилов + ZP2+ супернатант <i>E.coli</i> (опыт 5)
G-CSF пкг/мл	16,1 \pm 1,5	19,1 \pm 1,6	34,6 \pm 2,7 p ₁ , p ₂ <0,05	23,0 \pm 1,0 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05	24,7 \pm 0,9 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05
GM-CSF пкг/мл	210,3 \pm 6,2	250,2 \pm 5,6 p ₁ <0,05	277,6 \pm 7,3 p ₁ , p ₂ <0,05	263,0 \pm 4,6 p ₁ , p ₂ <0,05	259,2 \pm 5,4 p ₁ , p ₃ <0,05
IL-10 пкг/мл	32,1 \pm 2,6	35,3 \pm 3,4	42,3 \pm 4,3 p ₁ , p ₂ <0,05	41,7,0 \pm 0,9 p ₁ <0,05	38,2 \pm 1,0 p ₁ <0,05
IL-12p70 пкг/мл	13,2 \pm 1,7	23,4 \pm 1,6 p ₁ <0,05	60,5 \pm 4,2 p ₁ , p ₂ <0,05	33,8 \pm 0,2 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05	41,3 \pm 2,4 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05
IFN- γ пкг/мл	13,3 \pm 1,3	13,6 \pm 1,5	23,6 \pm 2,7 p ₁ , p ₂ <0,05	16,3 \pm 0,7 p ₃ <0,05	18,0 \pm 1,2 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05
IL-13 пкг/мл	10,2 \pm 1,1	11,3 \pm 1,3	18,6 \pm 3,8 p ₁ , p ₂ <0,05	12,3 \pm 0,3 p ₃ <0,05	13,0 \pm 0,6 p ₃ <0,05
IL-17A пкг/мл	29,4 \pm 2,6	62,4 \pm 5,6 p ₁ <0,05	337,8 \pm 11,8 p ₁ <0,001, p ₂ <0,01	139,7 \pm 1,7 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05	172,8 \pm 12,6 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05
IL-1 β пкг/мл	13,3 \pm 1,5	42,4 \pm 3,4 p ₁ <0,05	287,5 \pm 16,8 p ₁ , p ₂ <0,01	211,7 \pm 51,5 p ₁ , p ₂ <0,05	240,8 \pm 42,5 p ₁ , p ₂ <0,05
IL-2 пкг/мл	35,4 \pm 3,5	38,5 \pm 4,5	49,2 \pm 6,8	39,7 \pm 1,5	42,2 \pm 1,6
IL-4 пкг/мл	17,2 \pm 1,8	23,4 \pm 2,4	53,5 \pm 5,9 p ₁ , p ₂ <0,05	33,7 \pm 0,3 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05	37,8 \pm 2,5 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05
IL-5 пкг/мл	9,2 \pm 1,1	9,4 \pm 1,3	12,7 \pm 2,3	10,3 \pm 0,3	10,7 \pm 0,3
IL-6 пкг/мл	17,7 \pm 1,8	122,4 \pm 9,7 p ₁ <0,05	1574,6 \pm 76,8 p ₁ , p ₂ <0,001	709,2 \pm 106,8 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05	1265,7 \pm 196,4 p ₁ , p ₂ <0,05
IL-7 пкг/мл	10,2 \pm 1,2	12,6 \pm 1,6	18,6 \pm 2,2 p ₁ , p ₂ <0,05	14,3 \pm 0,3 p ₁ , p ₃ <0,05	16,3 \pm 0,7 p ₁ , p ₂ <0,05
TNF- α пкг/мл	15,4 \pm 1,8	16,1 \pm 1,9	67,7 \pm 6,7 p ₁ , p ₂ <0,05	40,5 \pm 1,5 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05	35,3 \pm 4,8 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05
IL-8 пкг/мл	13,3 \pm 2,3	320,8 \pm 14,5 p ₁ <0,01	3541,7 \pm 211,4 p ₁ , p ₂ <0,001	1160,3 \pm 113,7 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05	1789,2 \pm 363,9 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05
MCP-1 пкг/мл	12,6 \pm 1,8	12,5 \pm 1,9	19,4 \pm 3,7	14,7 \pm 0,3	14,7 \pm 0,9
MIP-1 β пкг/мл	40,8 \pm 4,8	1492,7 \pm 72,7 p ₁ <0,01	12538,2 \pm 768,9 p ₁ , p ₂ <0,001	5929,7 \pm 282,1 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05	6988,8 \pm 292,4 p ₁ , p ₂ , p ₃ <0,05

Примечание: p₁ - достоверность различий по отношению к среде RPMI-1640 (контроль 1);
p₂ - достоверность различий по отношению к супернатантам нейтрофилов (контроль 2).
p₃ – достоверность по отношению к супернатантам нейтрофилов активированных ZP2

При этом степень подавления цитокинопродукции нейтрофилами была более

выражена при комбинированном влиянии на фагоциты эшерихий и пептида ГМ-КСФ – ZP2, чем при сочетанном воздействии на них супернатантов суточных бульонных культур *E. coli* и пептида ZP2 (таблица 3).

Таким образом, как синтетический пептид ZP2, так и бактерии вида *E. coli* и их метаболиты способны усиливать секрецию нейтрофилами широкого спектра провоспалительных цитокинов (11-14 из 17 исследованных цитокинов), причем, стимулирующая активность пептида была выше, чем у бактерий и их метаболитов. С другой стороны, комбинированное воздействие бактерий и их метаболитов с синтетическим пептидом ZP2 на фагоциты сопровождалось снижением секреции нейтрофилами цитокинов в сравнении с таковой при изолированной стимуляции гранулоцитов данным пептидом. Возможно, указанный эффект способствует выживанию и персистенции данных микроорганизмов в организме человека, в том числе при развитии инфекционного процесса, вызванного *E. coli* и другими энтеробактериями, а также грамотрицательными бактериями иных видов.

В дальнейшем нами была исследована антибактериальная активность синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ в отношении грамотрицательных бактерий разной таксономической принадлежности.

В серии предварительных опытов диско-диффузионным методом была протестирована антимикробной активности синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ – ZP1 и ZP2 (концентрации 3, 10 и 30 мкг/мл) в отношении клинических штаммов *S. aureus* 155, *E. coli* 2290 и *Candida albicans*, в том числе в сравнении с коммерческими дефенсином LL 37 и кателицидином HNP, при растворении всех соединений как в фосфотно-солевом буфере, так и физиологическом растворе.

Полученные результаты указывали на наличие у синтетических пептидов ZP1 и ZP2, а также дефенсинов LL 37 и HNP антимикробной активности в отношении бактерий (но не грибов *C. albicans*), спектр и выраженность которой зависели от тестируемых препаратов, их концентрации (дозо-зависимый эффект) и вида растворителя. Так, при растворении изученных соединений в фосфатно-солевом буфере в концентрации 10 мкг/мл они подавляли рост штаммов *S. aureus* 155 и *E. coli* 2290 примерно в одинаковой степени, в то время как при их разведении в физиологическом растворе антибактериальная активность в отношении обоих штаммов бактерий выявлялась лишь у пептида ZP2, тогда как коммерческие дефенсин и кателицидин ее не проявляли.

Таким образом, из числа исследованных соединений наиболее выраженным антибактериальным действием в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов обладал пептид ZP2, который проявлял ингибирующую их рост активность вне зависимости от вида растворителя.

Вместе с тем антибактериальное действие пептида ZP2 в отношении клинических изолятов грамотрицательных бактерий разной видовой принадлежности охарактеризовано весьма фрагментарно. Для ликвидации этого

пробела нами была поставлена серия экспериментов *in vitro*.

Было проведен сравнительный анализ влияния синтетического пептида ZP2 (градиент концентраций – 3-300 мкг/мл) на рост музейных штаммов *E. coli* K12 (АТСС 25922) и *S. aureus* 209P (АТСС 6538-P) в жидкой питательной среде (мясопептонный бульон – МПБ).

Полученные данные свидетельствовали, что внесенный в МПБ синтетический пептид ZP2 ингибировал рост изученных тест-штаммов бактерий – *E. coli* K12 (АТСС № 25922) и *S. aureus* 209P (АТСС № 6538-P), дозо-зависимо снижая биомассу опытных культур в процессе развития бактериальных популяций (рисунок 1).

При этом характер ингибирующего действия синтетического пептида ZP2 на рост оцениваемых тест-штаммов бактерий зависел от вида микроорганизмов. Отличие, в частности, касалось динамики Индекса ингибирования (ИИ, %) роста *E. coli* K12 и *S. aureus* 209P в процессе развития контрольных и опытных культур: если у эшерихии максимальные значения ИИ регистрировались на 2 часах от начала культивирования (12,2-34,0 %), а затем прогрессивно снижались, достигая к 24 часам минимальных значений (6,9-12,6 %), то у золотистого стафилококка ИИ с 2 до 6 часов постепенно нарастал (с 2,3-12,0 до 11,4-25,7 %, соответственно), а затем к 24 часам снижался (3,2-17,8 %). Подобная закономерность наблюдалась вне зависимости от использованных концентраций синтетического пептида ZP2 и, скорее всего, была связана с видовыми особенностями строения клеточных стенок грамотрицательных и грамположительных бактерий (*E. coli* и *S. aureus*), архитектура и физико-химические свойства которых могут меняться на разных этапах развития периодических культур. Следует отметить, что на 6 часах культивирования значения ИИ роста *E. coli* K12 и *S. aureus* 209P существенно не отличались между собой в диапазоне концентраций пептида ГМ-КСФ – ZP2 3-100 мкг/мл, хотя в опытах с более высокой его концентрацией (300 мкг/мл) уровень ингибирования роста эшерихий был несколько выше, чем подавление золотистого стафилококка ($28,8 \pm 0,4$ против $25,7 \pm 0,5$ %, $p < 0,05$).

Учитывая известные данные об ингибирующем действии пептида ZP2 на способность клинических изолятов стафилококков образовывать биопленки (Зурочка В.А., 2016), важным представлялось оценить его влияние на биопленкообразование (БПО, усл. ед.) тест-штаммом *E. coli* K12 (АТСС № 25922) и клиническими изолятами эшерихий.

В экспериментах *in vitro* на тест-штамме *E. coli* K12 было установлено, что синтетический пептид ZP2 в диапазоне изученных концентраций (3-300 мкг/мл) дозо-зависимо снижал способность эшерихий формировать биопленки.

Как видно из рисунка 1, в опыте достоверное снижение БПО тест-штаммом кишечной палочки (на 10,3 % от контроля, $p < 0,05$) наблюдалось уже при концентрации синтетического пептида ZP2 10 мкг/мл, которое по мере увеличения в питательной среде концентрации пептида возрастало, достигая максимальных

значений (снижение на 28,4 %, $p < 0,05$) при концентрации 300 мкг/мл.

При этом анализ взаимосвязи уровня БПО эшерихиями с биомассой (ОД) микроорганизмов на 24 часах показал прямую зависимость с относительно высоким коэффициентом корреляции ($r=0,89$) между указанными параметрами бактериальных культур.

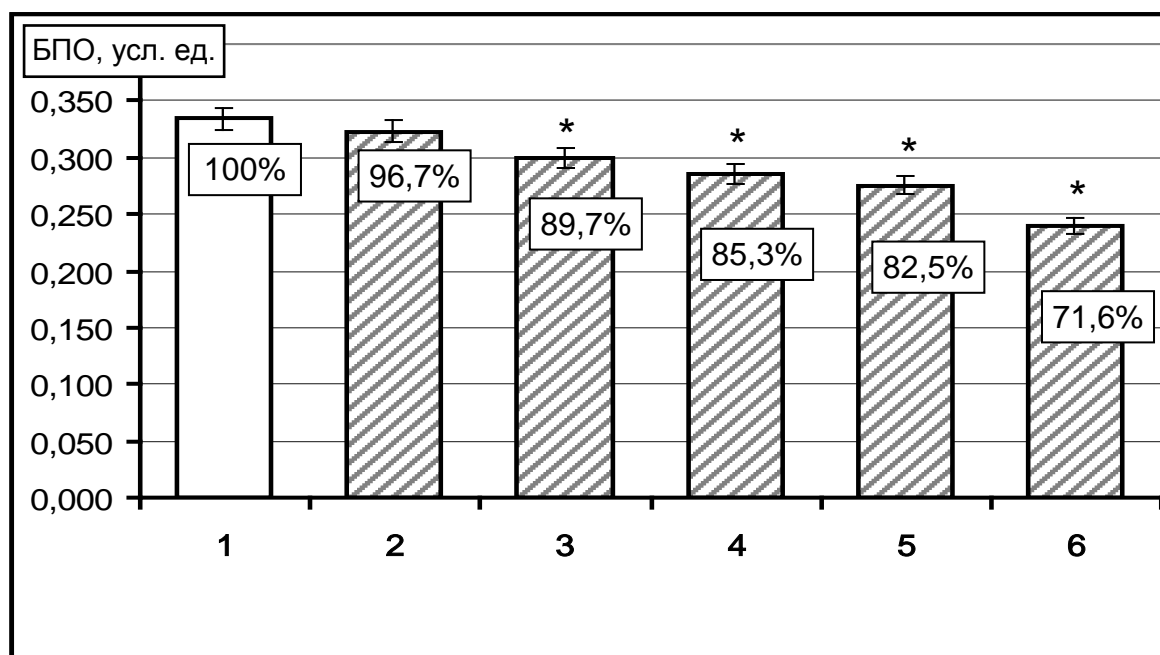


Рисунок 1 – Биопленкообразование (БПО, усл. ед.) тест-штаммом *E. coli* K12 в зависимости от концентрации пептида ZP2: 1 – Контроль; 2 – 3 мкг/мл; 3 – 10 мкг/мл; 4 – 30 мкг/мл; 5 – 100 мкг/мл; 6 – 300 мкг/мл. * - достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$) ($n=12$)

В следующей серии опытов было решено проанализировать влияние синтетического пептида ZP2 в концентрации 10 мкг/мл на рост и БПО клинических штаммов энтеробактерий (эшерихии и клебсиеллы). Выбор этой концентрации пептида ZP2 обусловлен несколькими моментами: во-первых, вышеприведенными результатами, указывающими на то, что она является минимально, но достоверно действующей на тест-штамм *E. coli* K12; во-вторых, известными экспериментальными данными о влиянии этой концентрации пептида ГМ-КСФ – ZP2 на рост клинических штаммов стафилококков и их биопленкообразование (Зурочка В.А. и соавт., 2015; Гриценко В.А. и соавт., 2015); в-третьих, имеющейся информацией о ее репарационном действии и эффективной иммуностропной активности в отношении разных иммунокомпетентных клеток (Зурочка В.А., 2016, Зурочка В.А. и соавт., 2016).

Полученные результаты свидетельствовали о том, что синтетический пептид ZP2 в концентрации 10 мкг/мл существенно подавлял рост к 4 и 6 часам инкубации, примерно, у половины клинических штаммов *E. coli* (58,3 и 50,0 %, соответственно) и у трети (33,3 %) клинических изолятов *K. pneumoniae*. При этом Индексы ингибирования роста клинических штаммов энтеробактерий вне зависимости от изученных видов колебались в широком диапазоне (от -11,0 до +20,8 %), что отражало внутривидовое (межштаммовое) разнообразие энтеробактерий по уровню их чувствительности к пептиду - ZP2.

В то же время анализ особенностей подавления пептида на рост штаммов

энтеробактерий из группы чувствительных бактериальных изолятов (то есть тех, у которых ингибирующий эффект превышал 5 %) показал, что средние значения ИИ роста клинических штаммов эшерихий и клебсиелл на 4-6 часах между собой существенно не отличались (7,2-9,1 и 8,1-8,5 %, соответственно), но были в 1,32-1,98 раза ниже, чем аналогичные параметры тест-штамма *E. coli* K12.

Наличие отрицательных значений Индекса ингибирования роста на 4 и 6 часах, зафиксированные у небольшого числа изученных клинических штаммов эшерихий и клебсиелл (у $8,3 \pm 8,3$ %), указывало на то, что в использованной концентрации (10 мкг/мл) пептид ZP2 способен оказывать не только ингибирующее, но и стимулирующее действие на отдельные клинические изоляты энтеробактерий. Аналогичный (стимулирующий) эффект пептида ZP2 ранее был описан при изучении его влияния на рост в жидкой питательной среде микрококка (Зурочка В.А. и соавт., 2015). Подобное действие могут оказывать и иные антибактериальные вещества, например, лейкоцитарный катионный пептид «Интерцид», в присутствии которого тест-штамм *E. coli* K12 демонстрировал более высокий темп роста на ранних стадиях развития культуры в сравнении с контролем (Бухарин О.В., Гриценко В.А., 2000).

Таким образом, представленные данные свидетельствовали о том, что синтетический пептид ZP2 в относительно низкой концентрации (10 мкг/мл) на 4 и 6 часах роста энтеробактерий в периодических культурах оказывал на них ингибирующее действие, которому было подвержено от 33,3 % изолятов клебсиелл до 58,3 % штаммов эшерихий.

Так, среди эшерихий группа штаммов, у которых синтетический пептид ZP2 подавлял образование биопленок, включала $33,3 \pm 14,2$ % изолятов, в то время как в выборке клебсиелл доля таких изолятов была в 1,5 раза больше и составила $50,0 \pm 15,1$ %. Индифферентно реагирующие на пептид ZP2 штаммы среди клебсиелл встречались в 2 раза чаще, чем среди эшерихий ($33,3 \pm 14,2$ против $16,7 \pm 11,2$ %), тогда как доля штаммов, у которых увеличивалась БПО, была, наоборот, в 3 раза меньше, чем в выборке эшерихий ($16,7 \pm 11,2$ против $50,0 \pm 15,1$ %, $p < 0,05$).

Эти данные указывают не только на внутривидовое (межштаммовое) разнообразие клинических изолятов эшерихий и клебсиелл, но и на наличие выраженных межвидовых отличий энтеробактерий по их реакции (например, в виде изменения у них способности формировать биопленки) на действие пептида ZP2, причины и механизмы которых предстоит выяснить в дальнейших исследованиях. Возможно, это связано с исходными различиями эшерихий и клебсиелл в способности к БПО, так как в контроле клебсиеллы формировали в 1,5 раза более выраженные биопленки, чем эшерихии ($0,37 \pm 0,02$ против $0,25 \pm 0,05$ усл. ед., $p < 0,05$).

Кроме того, нами было замечено, что ингибирующий или стимулирующий эффекты пептида ZP2 на способность эшерихий формировать биопленки зависели от исходных значений БПО клинических штаммов *E. coli* в контроле, о чем свидетельствовали относительно высокие коэффициенты корреляции между соответствующими показателями ($r = 0,89$ и $r = -0,74$).

Наличие у данного синтетического пептида ZP2 уникальной комбинации иммунобиологических свойств позволило создать на его основе новое косметическое средство «АЦЕГРАМ», выпускаемое в виде спрея и геля (Зурочка

А.В. и соавт., 2016; Зурочка В.А., 2016). Однако его влияние на клинические штаммы грамотрицательных бактерий не тестировалось.

В этой связи нами была проведена оценка антибактериальной активности косметического средства «АЦЕГРАМ-спрей», основу которого составляет синтетический пептид ZP2, в отношении таких грамотрицательных бактерий, как *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*.

Опыты *in vitro* проведены на 24 клинических штаммах грамотрицательных бактерий видов *K. pneumoniae* (n=8), *A. baumannii* (n=8) и *P. aeruginosa* (n=8), выделенных из гнойных ран у больных с синдромом диабетической стопы, из отделяемого влагалища у женщин с миомой матки, из желчи и аспириата нижних дыхательных путей у больных с хирургической патологией.

Выявлено, что косметическое средство «АЦЕГРАМ», в целом, ингибировало рост грамотрицательных бактерий изученных таксонов, однако уровень и характер его антибактериальной активности зависели от их видовой принадлежности и штаммовых особенностей (таблица 4). Так, клинические изоляты *K. pneumoniae* существенно медленнее развивались в МПБ при добавлении в него косметического средства «АЦЕГРАМ-спрей» (опыт), чем в контроле, на что указывало снижение в 2,55 раза удельной скорости роста (μ) бактерий в опыте на начальном этапе (0-4 часа) развития бактериальных популяций – $0,113 \pm 0,023$ против $0,287 \pm 0,021$ ч⁻¹ в контроле.

Таблица 4 – Индексы ингибирования (ИИ, %) роста грамотрицательных бактерий в МПБ «АЦЕГРАМ» (на разных этапах культивирования)

Время культивирования	Индексы ингибирования (ИИ, %) роста бактерий разной таксономической принадлежности*		
	<i>K. pneumoniae</i> (n=8)	<i>A. baumannii</i> (n=8)	<i>P. aeruginosa</i> (n=8)
4 часа	49,3±2,6	47,6±4,0	18,2±3,1 ^{1,2}
24 часа	36,7±12,1	77,1±7,7 ¹	2,2±4,7 ^{1,2}

Примечание: * - достоверные отличия (p<0,05): 1 – в сравнении с *K. pneumoniae*; 2 – в сравнении с *A. baumannii*.

При этом на более позднем этапе развития культур (4-24 часа) удельные скорости роста клинических штаммов *K. pneumoniae* в опыте и контроле практически не отличались – $0,053 \pm 0,003$ и $0,053 \pm 0,012$ ч⁻¹, соответственно, что, очевидно, указывало на способность клебсиелл адаптироваться к ингибирующему действию синтетического пептида ZP2. Однако такая «адаптация» не обеспечивала им к 24 часам инкубации накопление биомассы (по ОД), сопоставимой по размеру с контролем, о чем свидетельствовали относительно высокие значения Индекса ингибирования как на 4 часах, так и 24 часах культивирования – $49,3 \pm 2,6$ и $36,7 \pm 12,1$ %, соответственно.

Еще более выраженный ингибирующий эффект косметическое средство «АЦЕГРАМ-спрей» оказывало на рост в МПБ клинических штаммов *Acinetobacter baumannii*, тогда как клинические изоляты *Pseudomonas aeruginosa* проявляли к нему большую устойчивость, чем изученные штаммы *K. pneumoniae* и *A. baumannii*.

Увеличение биомассы псевдомонад (ОД) тормозилось лишь на начальных этапах (0-4 часа) развития опытных культур микроорганизмов, что подтверждалось

снижением в 1,35 раза ($p < 0,05$) удельной скорости их роста в сравнении с контрольными значениями этого параметра – $0,196 \pm 0,005$ против $0,264 \pm 0,019$ ч⁻¹. Это обеспечивало среднее значение Индекса ингибирования роста *P. aeruginosa* на 4 часах инкубации всего на уровне $18,2 \pm 3,1$ %, который был в 2,7 и 2,6 раза ниже, чем аналогичный показатель для *K. pneumoniae* и *A. baumannii* соответственно. Кроме того, на более позднем этапе развития культур (4-24 часа) средняя удельная скорость роста (μ_{4-24}) штаммов *P. aeruginosa* в опыте несколько превышала контрольные значения – $0,077 \pm 0,006$ против $0,068 \pm 0,004$ ч⁻¹, что нивелировало их отставание в накоплении биомассы, наблюдаемое на начальном этапе при сравнении с контролем, и приводило к снижению среднего значения Индекса ингибирования на 24 часах до $2,2 \pm 4,7$ % ($p > 0,05$), которое можно было расценивать как способность псевдомонад «ускользнуть» от антибактериального действия синтетического пептида ZP2, входящего в состав косметического средства «АЦЕГРАМ-спрей». В этом плане клинические изоляты *P. aeruginosa* вели себя аналогично изученным штаммам *K. pneumoniae*, однако их «адаптация» к пептиду ZP2 была еще более выражена, чем у клебсиелл.

Совокупность полученных данных позволяет поставить микроорганизмы изученных видов с учетом показателей их чувствительности к антибактериальному действию синтетического пептида ZP2 (удельная скорость роста и Индекс ингибирования) в следующий ряд: *A. baumannii* > *K. pneumoniae* > *P. aeruginosa*.

Итак, синтетический пептид ZP2 и созданное на его основе косметическое средство «АЦЕГРАМ» в условиях *in vitro* оказывали преимущественно ингибирующее действие на рост клинических штаммов энтеробактерий (*E. coli* и *K. pneumoniae*) и грамотрицательные микроорганизмы иной видовой принадлежности (*P. aeruginosa* и *A. baumannii*), параллельно подавляя их способность к биопленкообразованию. При этом данные бактерии отличаются не только высокой устойчивостью ко многим антимикробным препаратам с разными механизмами действия, но и способностью формировать биопленки. Важно, что указанные бактерии демонстрировали, с одной стороны, выраженную меж- и внутривидовую вариабельность по реакции на действие синтетического пептида ZP2, с другой стороны, способность «адаптироваться» к ингибирующему действию указанного пептида, что определяет необходимость дальнейшего изучения механизмов взаимодействия в системе «пептид – грамотрицательные бактерии».

Тем не менее, полученные экспериментальные данные уже сейчас позволяют рекомендовать косметическое средство «АЦЕГРАМ» (спрей/гель) для местного применения при наличии раневых инфекций, вызванных указанными патогенами (например, гнойные осложнения при синдроме диабетической стопы), а также для профилактики послеоперационных раневых инфекций в хирургии и гинекологии.

В заключение, резюмируя полученные данные, необходимо отметить, что полученные нами данные о том, что синтетический пептид ZP2 (химическая формула: THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO) обладает выраженными иммуностимулирующими, антимикробными свойствами против широкого спектра грамотрицательных бактерий, позволяющими его рекомендовать как основу для создания лекарственных препаратов нового поколения, обладающих плеiotропными эффектами, которые могут найти широкое

применение в клинике инфекционных заболеваний при бактериальной инфекции и иммунодисфункциях различной этиологии.

ВЫВОДЫ

1. Синтетический пептид активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора – ZP2 (химическая формула: THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO) усиливает пролиферацию лимфоцитов в РБТЛ и обладает выраженным антиапоптотическим действием на фагоцитарные клетки в широком диапазоне концентраций (10-300 мкг/мл).

2. Синтетический пептид ZP2 активизирует хемотаксис и хемокинез гранулоцитов и моноцитов периферической крови в условиях взаимодействия фагоцит-пептид-грамотрицательные микроорганизмы.

3. Синтетический пептид ZP2 стимулирует продукцию гранулоцитами периферической крови человека ряда цитокинов (IL-17A, IL-1 β , IL-4, IL-6, TNF- α , IL-8, MIP-1 β) сильнее, чем грамотрицательные микроорганизмы и супернатанты их суточных бульонных культур, в то время как при комбинированном воздействии на фагоциты пептида и микроорганизмов (или их супернатантов) уровень цитокинопродукции имеет промежуточные значения.

4. Синтетический пептид ZP2 в условиях *in vitro* снижает рост, размножение и биопленкообразование тест-штамма *E. coli* K12 (ATCC 25922) и клинических изолятов *E. coli* и *K. pneumoniae*.

5. Синтетический пептид ZP2 – основа косметического средства АЦЕГРАМ-спрей, обладает антибактериальной активностью в отношении широкого спектра грамотрицательных бактерий, включая клинические изоляты *K. pneumoniae*, *A. baumannii* и *P. aeruginosa*.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанные на основе синтетического пептида ZP2 косметические средства «АЦЕГРАМ» (спрей, гель) могут быть использованы у взрослых и детей старше 3 месяцев для местного применения при обработке раневых инфекций, вызванных грамотрицательной микрофлорой (например, гнойные осложнения при синдроме диабетической стопы), а также для профилактики послеоперационных раневых инфекций в хирургии и гинекологии, путем нанесения на кожу и слизистые оболочки 3-4 раз в день до проявления эффекта (но не более 14 дней). Повторный курс применения средства возможен через 10 дней.

2. Указанное косметическое средство (спрей, гель) можно использовать в научных исследованиях для оценки в модельных экспериментах на животных их эффективности при лечении раневых инфекций, вызванных различными патогенами.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и индексируемых в международной базе данных Scopus, PubMed:

1. Дозозависимое влияние синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ – ZP2) на индуцированный апоптоза моноцитов / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, Е.Б. Зуева, М.А. Добрынина, В.В. Дукардт, В.А. Гриценко, И.В. Кудрявцев, М.К. Серебрякова, А.С. Трулев, В.А. Черешнев // Российский иммунологический журнал. 2016. Т. 10 (19), № 3. С.265-269 (РИНЦ – 0,389, PubMed).

2. 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 – 0,634).

3. 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. 266-266 (Scopus – N/A, РИНЦ – 0,457).

4. Оценка влияния различных комбинаций синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ и биологически-активных веществ (дефенсинов, лизоцима, интерцида и супернатантов клеток CD34⁺) на антибактериальные, иммуностропные 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 – 0,634).

5. 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. 63-65 (РИНЦ – 0,462).

6. Изучение комбинированных эффектов веществ, полученных из супернатантов CD34+CD45⁻ 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. 50-52 (РИНЦ – 0,332).

7. Исследование различной биологической активности синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ и веществ, полученных из супернатантов CD34+CD45⁻ 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. 141-141 (РИНЦ – 0,332).

8. Доза-зависимые 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 (Scopus – N/A, РИНЦ – 0,265).

9. 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 (Scopus – N/A, РИНЦ – 0,739).

10. Сравнительная характеристика антибактериальных свойств различных синтетических пептидов активного центра GM-CSF и веществ полученных из супернатантов CD34+CD45^{dim} 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 – 0,816).

11. Характеристика антибактериальных, иммуностропных и репарационных свойств синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ, различных дефенсинов и веществ, полученных из супернатантов CD34+CD45^{dim} 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 – 0,149).

Патенты РФ

12. Патент РФ на изобретение № 2448725. 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 // Бюл. 2012. № 12. Оpubл. 27.04.2012.

13. Патент РФ на изобретение № 2465001. 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 // Бюл. 2012. № 30. Оpubл. 27.10. 2012.

Публикации в других изданиях

14. Оценка влияния синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора – ZP2 на рост и биопленкообразование клинических изолятов энтеробактерий *in vitro* / М.А. Добрынина, А.В. Зурочка, Я.В. Тяпаева, Ю.П. Белозерцева, В.А. Гриценко // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2018. № 4. С. 1-17. (DOI: 10.24411/2304-9081-2018-14011) (РИНЦ – 0,364).

15. Антибактериальная активность косметического средства «Ацеграм» в отношении грамотрицательных бактерий / М.А. Добрынина, А.В. Зурочка, Я.В. Тяпаева, Ю.П. Белозерцева, Т.М. Мругова, В.А. Гриценко // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2017. № 4. С. 1-13. (DOI: 10.24411/2304-9081-2017-00030) (РИНЦ – 0,366).

16. Феномен наличия уникальной комбинации иммунобиологических свойств у синтетического аналога активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, М.А. Добрынина, Е.Б. Зуева, В.В. Дукардт, В.А. Гриценко, Я.В. Тяпаева, В.А. Черешнев // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН: [электр. журн.]. 2016. № 2. С. 1-30. (РИНЦ – 0,330).

17. 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 (РИНЦ – 0,258).

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

ИЛ/IL 1-n – интерлейкины 1-n

ФГА - фитогемагглютинин

G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

IFN γ – интерферон γ

MIP-1 β – миграцию ингибирующий фактор 1 β

TNF- α – фактор некроза опухоли α

ДОБРЫНИНА МАРИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

ИММУННЫЕ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА (ГМ-КСФ) В СИСТЕМЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КЛЕТКА-ПЕПТИД-ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ БАКТЕРИИ

14.03.09 - клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Подписано в печать 11.10.2019.

Формат 60 × 84 ¹/₁₆. Усл. печ. л. 1,0.

Бумага офсетная. Гарнитура Times New Roman суг.

Печать лазерная. Тираж 100 экз. Заказ № 2578/19.

Отпечатано в ПЦ «ПРИНТМЕД» (ИП Шарифулин Р. Г.)

454080, г. Челябинск, ул. Энтузиастов, 25а. Тел. +7 351 230-67-37. E-mail: rinmed@mail.ru